Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Manoela Lopes Carvalho

Estudo do músculo esquelético de camundongos C57BL/6 com síndrome metabólica

Rio de Janeiro
2010

Manoela Lopes Carvalho

Estudo do músculo esquelético de camundongos C57BL/6 com síndrome metabólica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Laís de Carvalho

Coorientadora: Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C331 Carvalho, Manoela Lopes.
Estudo do músculo esquelético de camundongos C57BL/6 com síndrome metabólica / Manoela Lopes Carvalho – 2010.
62f.

Orientadora: Laís de Carvalho.
Coorientador: Márcia Barbosa Águila.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Músculo esquelético. 2. Síndrome metabólica. 3. Dieta hiperlipídica. I. Carvalho, Laís de. II. Águila, Márcia Barbosa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 611.7

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Manoela Lopes Carvalho

Estudo do músculo esquelético de camundongos C57BL6 com síndrome metabólica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de julho de 2010.

Coorientadora: Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Laís de Carvalho (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Helene Santos Barbosa

Fundação Oswaldo Cruz

_____

Prof.ª Dra. Márcia Barbosa Águila

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido pai Roberto (*in memorian)* pelo exemplo de caráter, coragem e à minha mãe Maria Luzia, por sua incondicional dedicação e amor. Obrigada por me amarem acima de tudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado, me dando forças para superar todos os obstáculos.

À Dra. Laís de Carvalho, minha orientadora, por toda a sua incondicional dedicação, profissionalismo e carinho que me fizeram crescer muito durante todos esses anos de convívio. Obrigada por ter acreditado em mim e me incentivado em momentos importantes. Você é uma pessoa especial na minha vida.

À Dra. Márcia Barbosa Águila, minha co-orientadora, por ter sido fundamental para a realização desse trabalho, contribuindo para a minha formação científica. Muito obrigada.

Ao Dr. Carlos Aberto Mandarim-de-Lacerda, cuja participação foi muito importante no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por estar sempre disposto a ajudar e repassar seus conhecimentos.

À Dra Helene Santos Barbosa, pelas suas importantes considerações no meu Exame de qualificação, contribuindo para a finalização desse trabalho e pelo auxílio que foi indispensável para a realização da citoquímica ultraestrutural.

À Dra. Ana Carolina Stumbo Machado, professora do Departamento de Histologia e Embriologia, por tudo o que me ensinou desde o meu primeiro dia no Laboratório Cultura de Células e por estar sempre disposta a ajudar no que for preciso.

À professora do Departamento de Histologia e Embriologia Alessandra Alves Thole, por estar sempre disposta a contribuir e por levar sua alegria contagiante ao ambiente de trabalho.

À Dra. Érika Cortez que por sua competência sempre foi um exemplo a ser seguido. Obrigada pelo apoio.

À querida amiga, Simone Nunes de Carvalho, doutoranda do Laboratório de Cultura de Células. Obrigada por ter me ajudado em todos os momentos durante todo esse tempo trabalhando juntas. Você é uma pessoa muito especial.

Ao amigo Thiago Silva Torres, doutorando do Laboratório de Morfometria e Morfologia Cardiovascular, por seu profissionalismo, competência e dedicação que foram imensamente importantes. A sua participação foi essencial para a realização desse trabalho.

À aluna de mestrado do Laboratório Cultura de Células, Mariana de Freitas Oliveira. Obrigada pelo apoio e amizade durante essa caminhada na qual compartilhamos desafios e conquistas.

À Dalvaci Cunha Lira Neves, mestranda do Laboratório Cultura de Células, por não medir esforços para me auxiliar sempre que precisei e por proporcionar agradáveis momentos de descontração.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório Cultura de Células, Camila Luna, Daniela Caldas, Fabiano Pinheiro e Genilza Pereira por poder contar com a ajuda de vocês. Obrigada também à querida Michele Silva por sua doçura e pelos momentos agradáveis que nos proporcionou enquanto estagiou no laboratório.

À bióloga do Departamento de Histologia e Embriologia Ana Lúcia Rosa Nascimento, obrigada pela competência na realização dos cortes ultrafinos que foram necessários para a realização desse trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Microscopia Eletrônica Alan César Nunes de Moraes, pela paciência e ajuda na operação do microscópio eletrônico de transmissão que tornaram possível a captura das inúmeras imagens.

À técnica Patrícia Martinez, pela operação do microscópio confocal de fluorescência Zeiss LSM 510 META da UERJ.

À amiga, companheira e confidente de todas as horas Juliana Tobar, obrigada pela convivência durante o nosso tempo de iniciação científica dentro e fora do laboratório e por ter aturado com meiguice as minhas “malcriações” de vez em quando.

A todos os professores do Programa de pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, agradeço pelos ensinamentos que foram muito importantes para a minha formação.

Aos outros alunos, funcionários e professores do Departamento de Histologia e Embriologia que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

À minha família: mãe, avó, tias e primos que sempre exerceram um importante papel na minha vida.

Ao meu querido vovô José (por ter me acolhido como uma verdadeira neta). Obrigada pelo exemplo de caridade e por ter me acolhido desde sempre.

À Fabíola Derossi, Daniel Mancebo, Rafael Guimarães, Camila Mourão (e todos os outros) queridos amigos dos quais tanto orgulho. Vocês são pessoas mais do que especiais que o destino colocou em meu caminho. A amizade de vocês é um presente.

Às amigas de graduação Cláudia Levy, Michele Rocha e Elisângela Feitosa. Obrigada pela amizade durante todos esses anos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Dai-me Senhor a perseverança das ondas do
mar, que fazem de cada recuo um ponto de partida para
um novo avanço.

Gabriela Mistral

RESUMO

CARVALHO, Manoela Lopes. *Estudo do músculo esquelético de camundongos C57BL/6 com síndrome metabólica*. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A síndrome metabólica é um conjunto de fatores de risco cardiometabólicos que incluem a obesidade, a resistência à insulina, a hipertensão e a dislipidemia. Em camundongos C57BL/6 a dieta hiperlipídica causa um aumento no ganho de massa corporal e potencialmente aumenta outros fatores de risco associados com a síndrome metabólica. O acúmulo de lipídeos em células não adiposas pode causar uma disfunção celular ou morte celular via apoptose, este processo é geralmente definido como "lipotoxicidade". Com o objetivo de examinar os possíveis efeitos de uma dieta hiperlipídica na morfologia do músculo esquelético, vinte camundongos C57BL/6 machos, com treze semanas de idade foram separados em dois grupos e foram alimentados durante três meses com: a) uma dieta hiperlipídica (grupo HF, 60% das calorias provenientes de lipídeos) ou b) dieta padrão para roedores (grupo SC, 10% das calorias provenientes de lipídeos). Os camundongos foram sacrificados e o sangue foi coletado para análise bioquímica. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais nos níveis plasmáticos de glicose, porém os níveis plasmáticos de insulina, colesterol e triglicerídeos estavam aumentados no grupo HF e, além disso, esses animais apresentaram um maior índice de resistência à insulina e aumento na massa corporal. Para estudo ultraestrutural de rotina, o músculo gastrocnêmico foi dissecado, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% e os cortes ultrafinos foram observados no microscópio eletrônico de transmissão (MET). Para detecção de inclusões lipídicas através de citoquimica ultraestrutural, os fragmentos de músculo esquelético foram fixados em GA 2,5% e processados utilizando a técnica do tampão Imidazol. Para a posterior quantificação dessas inclusões por estereologia foram selecionados aleatoriamente três blocos de Epon de cada animal, os cortes ultrafinos foram observadas MET e as eletromicrografias aleatórias foram examinadas para a realização da quantificação. O aumento do acúmulo intramiocelular de lipídeos foi observado no grupo HF quando comparado com o grupo SC ($P<0.0001$) e as mitocôndrias apresentaram-se com alterações morfológicas. Para detecção de Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA1), fragmentos de músculo esquelético de ambos os grupos experimentais foram congelados em nitrogênio líquido e os cortes obtidos em criostato foram imunomarcados com anticorpo anti-SERCA1, seguido da incubação com o anticorpo secundário conjugado com Alexa 488. Posteriormente, esses cortes foram observados em microscópio confocal e os resultados mostraram um aumento da expressão de Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA1) no grupo HF. Portanto, nós demonstramos que uma dieta HF promove o desenvolvimento de um conjunto de desordens metabólicas, caracterizando o típico modelo de síndrome metabólica, e, além disso, modifica a ultraestrutura das fibras musculares esqueléticas, aumentando o número de inclusões lipídicas, alterando a morfologia mitocondrial e aumentando a expressão de Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Síndrome metabólica. Dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

CARVALHO, Manoela Lopes. *Skeletal muscle study of C57BL/ 6 mice with metabolic syndrome.* 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Metabolic syndrome is a collection of cardiometabolic risk factors that includes obesity, insulin resistance, hypertension and dyslipidemia. A high-fat diet causes body mass gain and potentially increase other risk factors associated with metabolic syndrome in C57BL/6 mice. The lipid accumulation in non-adipose cells can cause cell dysfunction or cell death via apoptosis, and these processes have been broadly defined as „lipotoxicity". In order to examine the possible effects of a high-fat diet in the skeletal muscle morphology, twenty male C57BL/6 mice at 13 weeks of age were allocated to feed one of the two diets during 16 weeks: high-fat chow (HF group, 60% calories from fat) or b) standard chow diet (SC group, 10% calories from fat. The mice were sacrificed blood samples were obtained by cardiac puncture for biochemistry analyzes. The results showed that plasma TC and TG were higher in HF group than SC group. No difference was found to FG between the groups, but FI was higher in HF animals in comparison to SC ones. The HF animals also showed higher HOMA-IR than SC animals and the HF group had major BM gain. In order to analyze the skeletal muscle ultrastructure, the mice gastrocnemius muscles were dissected and samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde and ultrathin n sections were examined in a 906 Zeiss transmission electron microscope. In order to realize the lipid droplet quantification, muscle samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde, washed Imidazol buffer and three Epon blocks of each mouse were randomly selected and the grids were observed using a transmission electron microscope (EM 906 Zeiss). Transmission electron microscopy revealed changes in the skeletal muscle ultrastructure of the HF group, as enhancement of the lipid droplets deposition and large and altered intermyofibrillar mitochondria. Lipid droplet quantification revealed elevated intramyocellular lipids deposition in HF group compared with SC group ($P< 0.0001$). Muscle sections obtained of both experimental groups were also immunolabeled with anti-mouse SERCA1 (sarco/endoplasmic reticulum $Ca2^{+}$ ATPase) primary antibody and the confocal microscopy revealed an increased expression of SERCA1 in skeletal muscle fibers HF group when compared with the SC group. Therefore, the results indicate that a HF diet influence the ultrastructure of muscle fibers, increasing the number of lipid droplets, changing the mitochondrial morphology and increasing the expression of SERCA1. In addition promotes the development of a collection of metabolic disorders, characterizing the typical metabolic syndrome shape.

Keywords: Muscle. skeletal. Metabolic syndrome. Diet, High-fat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização de miofibrilas e sarcômeros na célula muscular esquelética..... 15

Figura 2 - Organização do músculo estriado esquelético..... 16

Figura 3 - Estrutura e a posição dos filamentos finos e grossos do sarcômero..... 17

Figura 4 - Organização de tríades e sarcômeros do músculo esquelético..... 18

Figura 5 - Relação entre a obesidade, a resistência à insulina, a inflamação e doença vascular aterosclerótica..... 20

Figura 6 - Obesidade e alterações no tecido adiposo..... 23

Figura 7 - Balanço energético e o acúmulo ectópico de lipídeos..... 24

Figura 8 - Recrutamento de macrófagos na obesidade..... 25

Figura 9 - Resistência à insulina induzida pela obesidade..... 25

Figura 10 - Distribuição intracelular de inclusões lipídicas..... 27

Figura 11 - Principais componentes do retículo sarcoplasmático (RS) na tríade do músculo esquelético..... 28

Figura 12 - Modelo da bomba Ca^{2+} ATPase (SERCA1)..... 29

Figura 13 - Evolução da massa corporal dos grupos SC e HF..... 40

Figura 14 - Níveis plasmáticos de TG nos grupos SC e HF..... 40

Figura 15 - Níveis plasmáticos de colesterol total nos grupos SC e HF..... 40

Figura 16 - Glicemia de jejum nos grupos SC e HF..... 41

Figura 17 - Insulina de jejum nos grupos SC e HF..... 41

Figura 18 - HOMA-IR..... 41

Figura 19 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de rotina (grupos SC e HF)..... 43

Figura 20 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de rotina (grupos SC e HF)..... 44

Figura 21 - Citoquímica Ultraestrutural para detecção de lipídeos (grupos SC e HF)..... 45

Figura 22 - Citoquímica Ultraestrutural para detecção de lipídeos (grupos SC e HF)..... 46

Figura 23 - Quantificação de gotículas lipídicas (grupos SC e HF)..... 48

Figura 24 - Microscopia de varredura confocal a laser de fibras musculares esqueléticas do grupo SC marcadas com SERCA1..... 50

Figura 25 - Microscopia de varredura confocal a laser de fibras musculares esqueléticas do grupo HF marcadas com SERCA1..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das dietas controle (grupo SC) e hiperlipídica (grupo HF) 33

Tabela 2 - Mistura de vitaminas acrescentada em 1 Kg de dieta 34

Tabela 3 - Mistura de minerais acrescentada em 1 kg de dieta 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	*Adenosine-5'-triphosphate (Adenosina Trifosfato)*
BM	*Body mass* (Massa corporal)
BSA	*Bovine Serum Albumine* (Albumina de Soro Bovino)
CT	Colesterol total
DAPI	*4',6 – Diamino -2- phenylindole*
DCV	Doenças cardiovasculares
DMT2	Diabetes melitus tipo 2
DNA	D*eoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucléico)
FG	*Fasting plasma glucose* (Glicemia de jejum)
FI	*Fasting plasma insulin* (Insulina de jejum)
GA	Glutaraldeído
HF	*High-fat* (Hiperlipídica)
HOMA-IR	*Homeostasis model of assement of insulin resistance* (Modelo de determinação da resistência à insulina)
L	Inclusão lipídica
MC	Massa corporal
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mRNA	*Messenger Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucléico mensageiro)
OsO_4	Tetróxido de Ósmio
PBS	*Phosphate Buffer Saline* (Tampão Salina fosfato)
RI	Resistência à insulina
RIA	Radioimunoensaio
RS	Retículo sarcoplasmático
SC	*Standard-chow* (Ração padrão)
SERCA	*Sarco(endo)plasmic reticulum* Ca^{2+} *ATPase* (Ca^{2+} ATPase de retículo sarco(endo)plasmático)
CT	Colesterol total
TG	Triglicerídeos

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 14

1 **JUSTIFICATIVA** 30

2 **OBJETIVO GERAL** 31

2.1 **Objetivos específicos** 31

3 **METODOLOGIA** 32

3.1 **Protocolo experimental** 32

3.2 **Eutanásia** 36

3.3 **Análises metabólicas** 36

3.4 **Processamento de rotina para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)** 36

3.5 **Citoquímica Ultraestrutural para detecção de lipídeos** 37

3.6 **Estereologia: quantificação de inclusões lipídicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão** 37

3.7 **Detecção de Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA1) por microscopia de confocal** 38

3.8 **Análise dos dados** 38

4 **RESULTADOS** 39

4.1 **Massa corporal** 39

4.2 **Perfil lipídico** 39

4.3 **Níveis plasmáticos de glicose e de insulina** 39

4.4 **Ultraestrutura do músculo esquelético** 42

4.5 **Estereologia: quantificação de inclusões lipídicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão** 47

4.6 **Expressão de SERCA1** 49

5 **DISCUSSÃO** 52

CONCLUSOES. 56

REFERÊNCIAS 57

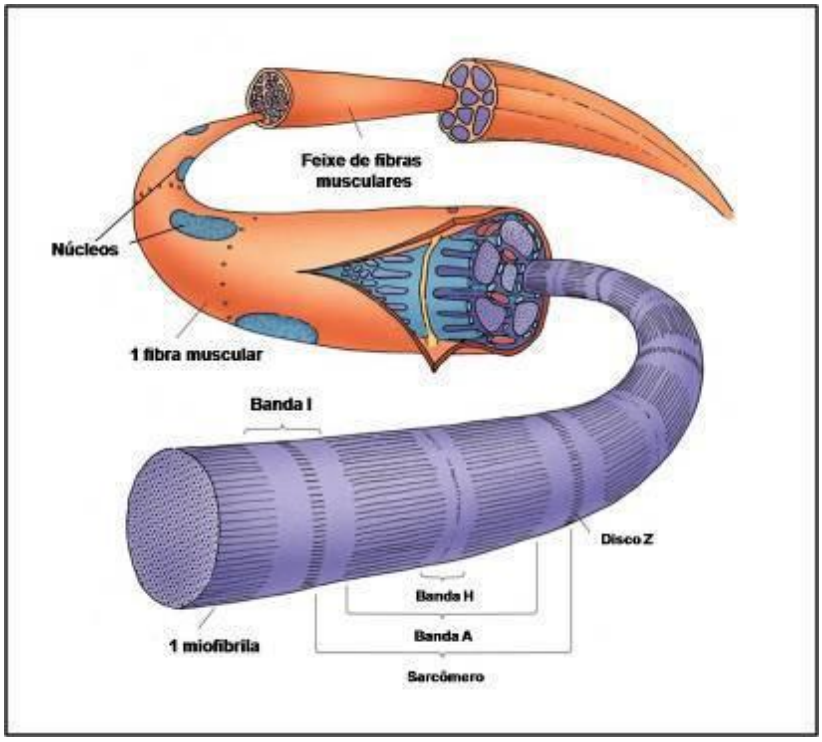
INTRODUÇÃO

Histologia do tecido muscular esquelético

As células musculares têm origem mesodérmica e a sua diferenciação é decorrente da síntese de proteínas filamentosas, concomitante com o alongamento dessas células. Portanto, o tecido muscular é formado por células alongadas, que contêm grande quantidade de filamentos citoplasmáticos de proteínas contráteis, que fornecem as forças necessárias para que ocorra a contração desse tecido, utilizando a energia contida nas moléculas de ATP. As características morfológicas e funcionais permitem a classificação de três tipos de tecido muscular: músculo estriado esquelético, músculo estriado cardíaco e músculo liso. O músculo estriado esquelético é formado por feixes de células cilíndricas bastante alongadas e multinucleadas, dotadas de estriações transversais. Funcionalmente, essas células, ou fibras caracterizam-se por realizar uma contração rápida e vigorosa, sujeita ao controle voluntário.

O tecido muscular esquelético é formado pela fusão de células embrionárias, os miócitos, sendo constituído por feixes de células cilíndricas muito longas denominadas de fibras musculares esqueléticas, as quais possuem numerosos núcleos periféricos. Essas fibras musculares podem chegar até 30 centímetros e possuem numerosos miofilamentos os quais se organizam em miofibrilas (Figura 1).

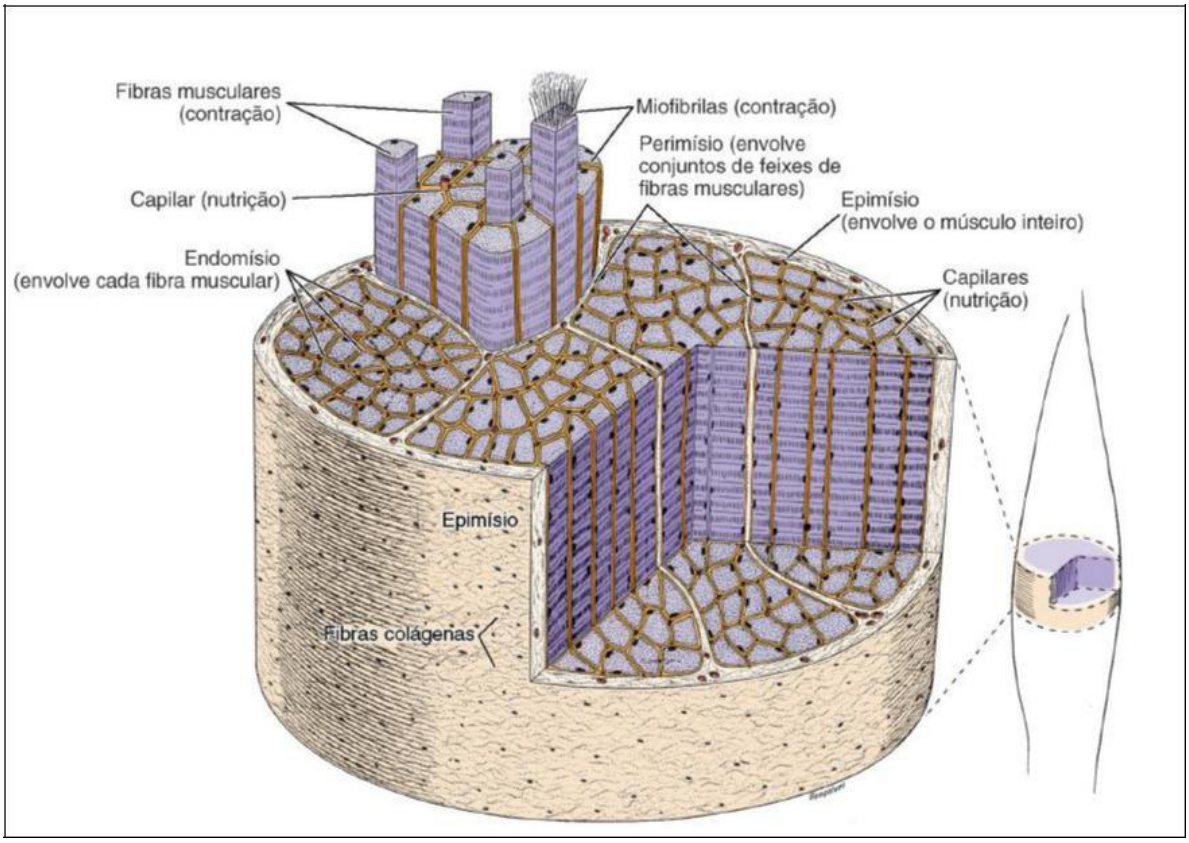
Figura 1- Organização de miofibrilas e sarcômeros na célula muscular esquelética



Adaptado de Gartner e Hiatt (2007)

As fibras musculares esqueléticas estão organizadas em grupos de feixes. O conjunto total de feixes, ou seja, o músculo inteiro é envolvido por uma camada de tecido conjuntivo, o epimísio e, desta camada, partem septos de tecido conjuntivo para o interior do músculo, o perimísio que separa o músculo em feixes. Por fim cada fibra muscular esquelética é envolvida individualmente pelo endomísio, que por sua vez é formado pela lâmina basal da fibra muscular juntamente com fibras reticulares (Figura 2).

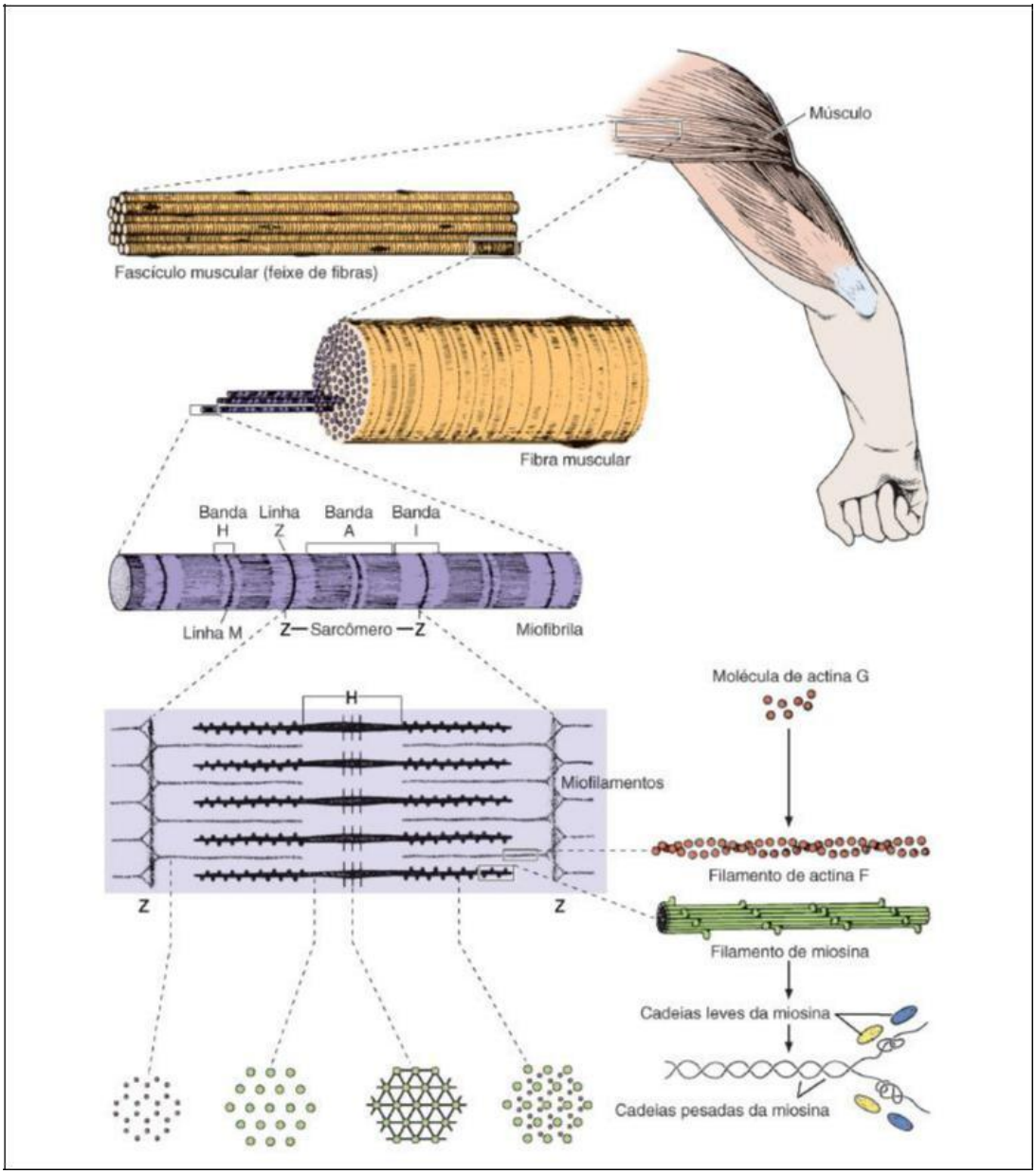
Figura 2- Organização do músculo estriado esquelético



(Junqueira e Carneiro, 2008)

As miofibrilas são feixes cilíndricos de filamentos finos (actina) e filamentos grossos (miosina) que se mantém organizados graças a proteínas como, por exemplo, a desmina. Da mesma maneira, os filamentos se mantêm presos ao sarcolema por proteínas com a distrofina, por exemplo. Além dos filamentos de actina e dos filamentos de miosina, também estão presentes filamentos de troponina e de tropomiosina. Os filamentos que compõem as miofibrilas se dispõem de maneira característica nas bandas que formam os sarcômeros. As fibras musculares esqueléticas são caracterizadas por apresentarem estriações transversais, essas estriações são devidas à presença de repetições de unidades iguais, os sarcômeros, os quais são formados pela parte da miofibrila que fica entre duas linhas Z sucessivas e contém uma banda A, separando duas semibandas I. A banda A apresenta uma banda mais clara no seu centro, a banda H (Figura 3).

Figura 3- Estrutura e a posição dos filamentos finos e grossos do sarcômero

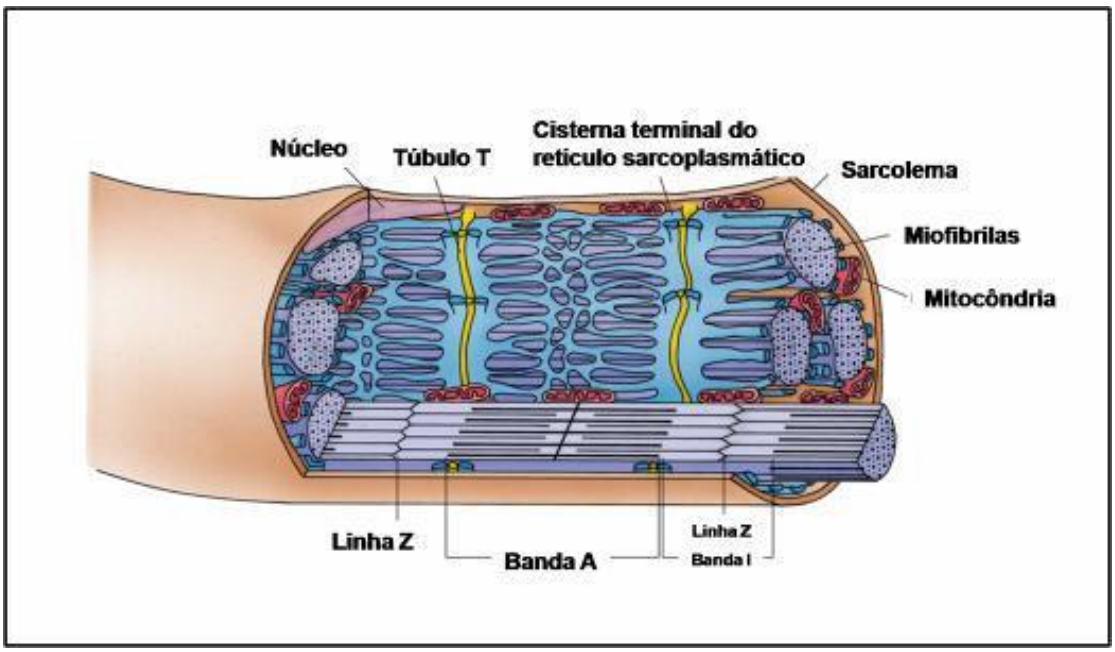


(Junqueira e Carneiro, 2008)

O retículo sarcoplasmático (RS) armazena e regula o fluxo de íons Ca^{2+}, tendo um importante papel na contração muscular. O RS consiste de uma rede de cisternas de retículo endoplasmático liso que envolve grupos de miofilamentos. No momento da despolarização decorrente do estímulo nervoso que se inicia na placa motora, os canais de Ca^{2+} presentes na membrana do RS se abrem liberando passivamente para o citoplasma íons Ca^{2+} que se encontram depositados nas cisternas do RS, iniciando a contração muscular. Quando cessa a despolarização, a membrana do RS transfere ativamente o Ca^{2+} para o interior das cisternas, interrompendo a atividade contrátil (Figura 4).

A contração muscular ocorre de maneira uniforme devido à presença de uma rede de invaginações tubulares da membrana plasmática da fibra esquelética (sarcolema), denominada de sistema de túbulos transversais ou sistema T. Em cada lado de cada túbulo T existe uma extensão ou uma cisterna terminal de RS. Assim, um túbulo T juntamente com duas expansões de RS forma a tríade, local onde a despolarização do sarcolema é transmitida ao RS (Figura 4) (Junqueira e Carneiro, 2008).

Figura 4- Organização de tríades e sarcômeros do músculo esquelético



A tríade está localizada na junção da banda A e banda I, permitindo a liberação de íons de cálcio na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático na região onde a interação de filamentos finos e grossos produzem o encurtamento do sarcômero. Adaptado de Gartner e Hiatt (2007).

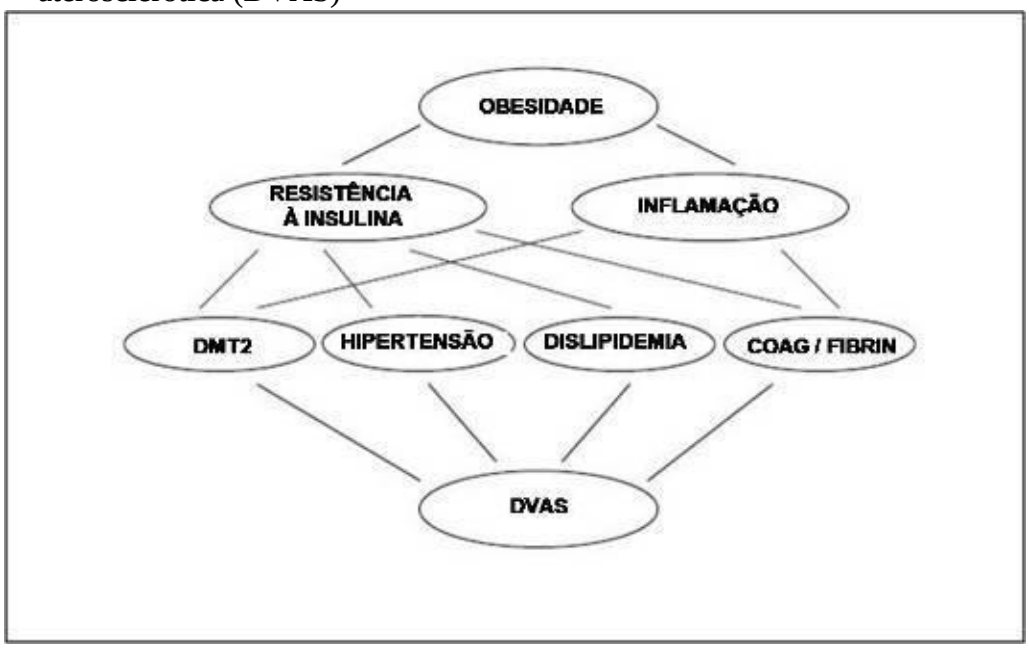
Síndrome metabólica

Em 1988, Gerald Reaven introduziu o conceito de “Síndrome X” para um grupo de fatores de risco cardiovasculares, tais como hipertensão arterial, intolerância à glicose, hipertrigliceridemia e baixa concentração de HDL-C (*high density lipoprotein cholesterol*). Esses fatores são encontrados em indivíduos com predisposição para desenvolverem doenças cardiovasculares (DCV) e propôs como denominador comum dessa síndrome a resistência à insulina (RI) (Reaven, 1997). A síndrome X também pode ser denominada de “síndrome da resistência à insulina”, “síndrome cardiovascular” ou “síndrome metabólica” (Aguilera, Diaz *et al.*, 2004). Desse modo, a síndrome metabólica representa uma desordem multifatorial que é caracterizada por resistência à insulina, dislipidemia, obesidade e hipertensão. Portanto, esse conjunto de fatores condiciona a um grande aumento do risco de desenvolvimento de Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (Moller e Kaufman, 2005).

Nos últimos anos, o estudo da síndrome metabólica tem gerado grande interesse, uma vez que a incidência da obesidade, do metabolismo alterado e DMT2 vêm atingindo proporções epidêmicas, constituindo um sério problema na saúde pública atual (Holloszy, 2009). A condição clínica que caracteriza a síndrome metabólica é marcada pelo sobrepeso aliado a alterações no metabolismo da glicose, no metabolismo de lipídeos e à hipertensão (Grassi, Arenare *et al.*, 2009). Já está amplamente descrito que a obesidade é uma consequencia natural do consumo elevado de alimentos altamente calóricos e do sedentarismo e, quando persistente, desregula processos metabólicos, incluindo a ação da insulina sob o metabolismo da glicose e de ácidos graxos livres. Essa desregulação afeta de maneira severa processos de controle da glicose, da pressão sanguínea e de níveis plasmáticos de lipídeos e, como consequência, tem início um conjunto de manifestações clínicas como: disglicemia, dislipidemia, hipertensão arterial e o chamado estágio de procoagulação (Grundy, 2003). A prevalência da obesidade e da síndrome metabólica tem crescido rapidamente nos países em desenvolvimento, levando ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), aumentando, por conseguinte, a morbidade e a mortalidade (Misra e Khurana, 2008).

Outras anormalidades metabólicas também estão associadas com a síndrome metabólica, como por exemplo, a microalbuminemia, alterações na fibrinólise e na coagulação (Lapidus, Bengtsson *et al.*, 1994; Yudkin, 1999). Pacientes que desenvolvem a chamada hiperinsulinemia, que é uma característica da RI e também um dos sintomas da síndrome metabólica, possuem predisposição a apresentarem alterações na coagulação. A hiperinsulinemia é responsável por criar um estado procoagulante, tanto em indivíduos diabéticos quanto em indivíduos não diabéticos. Isto ocorre devido ao aumento dos níveis de fator procoagulante, que por sua vez aumenta a geração de trombina, elevando níveis plasmáticos de fatores de coagulação VII e VIII e a ativação de plaquetas (Boden e Rao, 2007; Boden, Vaidyula *et al.*, 2007) (Figura 5).

Figura 5- Relação entre a obesidade, a resistência à insulina, a inflamação e doença vascular aterosclerótica (DVAS)



A obesidade causa a resistência à insulina e um estado caracterizado por um baixo-grau de inflamação. Ambas as condições contribuem para o desenvolvimento de uma série de desordens, incluindo diabetes melitus tipo 2 (DMT2), a hipertensão, a dislipidemia e desordens na cogulação (COAG) e na fibrinólise (FIBRIN), os quais são fatores de risco independentes para o desenvolvimento de DVAS. Adaptado (Boden, 2008).

O outro fator importante relacionado às manifestações clínicas da síndrome metabólica é o fato de indivíduos obesos com RI apresentarem alterações na fibrinólise devido a um aumento nas concentrações plasmáticas de ativador do inibidor do plasminogênio, que, por

sua vez, é o principal inibidor da fibrinólise. Portanto, níveis elevados de ácidos graxos livres levam à RI e, por conseguinte, à hiperinsulinemia, promovendo um aumento do risco de ocorrência da trombose e de eventos vasculares agudos (Festa, D'agostino *et al.*, 2002; Pannacciulli, De Mitrio *et al.*, 2002; Sobel e Schneider, 2004) caracterizando, assim, um importante fator de risco que compõe essa síndrome. Outras manifestações clínicas da síndrome metabólica foram descritas como a disfunção endotelial, alterações arteriais, hipertrofias cardíacas e ativação simpática (Grassi e Diez, 2009).

Resistência à insulina

A resistência à insulina pode ser definida como uma falta de sensibilidade de tecidos alvo a níveis fisiológicos desse hormônio, esta condição é considerada uma das disfunções primárias no desenvolvimento do DM2 (Virkamaki, Ueki *et al.*, 1999). Sabe-se que a insulina age através do receptor de insulina (RI), um receptor de membrana plasmática do tipo tirosina quinase. Quando ocorre a ligação da insulina, o receptor é autofosforilado nos seus resíduos de tirosina e pode desta forma, fosforilar outras proteínas promovendo, assim, a transdução do sinal (Saltiel e Kahn, 2001).

A produção anormal de moléculas bioativas de lipídeos contribui para a ocorrência de mudanças patofisiológicas associadas com a obesidade. O aumento de diacilglicerol tem sido apontado como uma das causas da resistência à insulina, além disso, dados têm sugerido que esfingolipídeos também exercem um papel em doenças metabólicas como obesidade, diabetes e aterosclerose. Dados recentes mostraram que a elevação nos níveis de ácidos graxos livres promove uma produção e composição anormal de esfingolipídeos em uma diversidade de tecidos como o músculo esquelético, o pâncreas e adipócitos (Cowart, 2009).

Existe uma forte correlação entre o acúmulo intramuscular de triacilglicerol e a resistência à insulina, devido à provável ligação funcional entre lipídeos intramiocelulares e a sensibilidade à insulina no músculo esquelético. Os estoques aumentados de lipídeos no músculo esquelético são considerados como o principal fator de risco para o desenvolvimento da resistência à insulina no músculo esquelético e/ou DMT2 (Goodpaster e Brown, 2005).

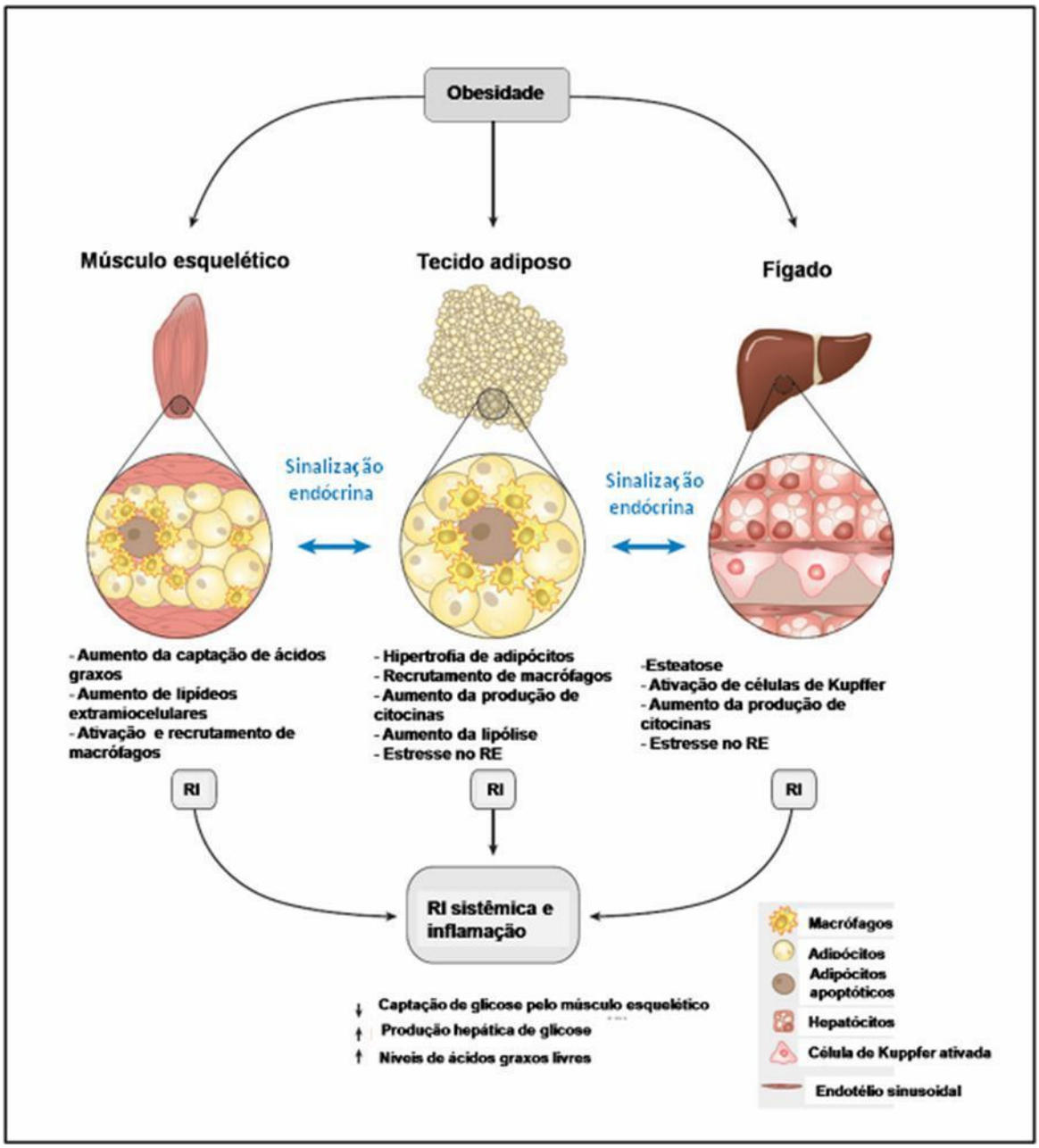
A redução da sensibilidade à insulina no músculo esquelético está ligada a um alto nível de triglicerídeos no músculo estando interligada a uma diminuição da capacidade oxidativa e da síntese de ATP mitocondriais (Petersen, Befroy *et al.*, 2003). A redução da

eficiência mitocondrial e do *turnover* de lipídeos podem facilitar a síntese de metabólitos lipídicos deletérios e fomentar a peroxidação de lipídeos, resultando em metabólitos citotóxicos altamente reativos que lesam o DNA e proteínas, prejudicando a capacidade oxidativa da mitocôndria (Kelley, He *et al.*, 2002; Russell, Gastaldi *et al.*, 2003).Tem sido hipotetizado que a resistência à insulina no músculo esquelético, induzida por dietas hiperlipídicas, é mediada por uma deficiência da mitocôndria que limita a oxidação de ácidos graxos e resulta em um acúmulo intracelular de lipídeos (Vianna, Huntgeburth *et al.*, 2006).

Acúmulo de lipídeos em tecidos não adiposos

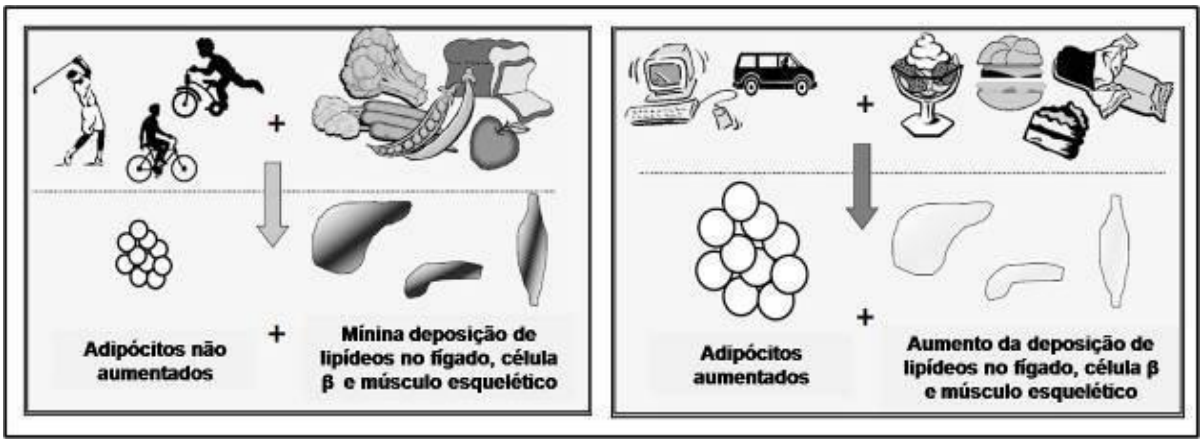
Por definição, o desenvolvimento da obesidade e do sobrepeso é caracterizado por um balanço energético positivo que acarreta um aumento da quantidade de triglicerídeos (TG) (Vianna, Huntgeburth *et al*., 2006) no tecido adiposo. Entretanto, os TG também podem ser estocados em tecidos não adiposos, como o músculo esquelético, o fígado, o pâncreas e o coração (Figura 6). A obesidade leva a uma deposição excessiva de TG nestes órgãos, sendo tal condição denominada de deposição ectópica de gordura ou esteatose. Nessas condições inclusões lipídicas se acumulam no citoplasma das células e este acúmulo excessivo de lipídeos pode levar a uma disfunção celular ou ainda a morte desta célula, caracterizando o fenômeno conhecido como lipotoxicidade (Schrauwen, 2007a). A obesidade é geralmente resultado de uma alimentação inadequada associada ao sedentarismo. Neste contexto, os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres são frequentemente elevados, uma vez que o tecido adiposo encontra-se aumentado e, desta forma, libera mais ácidos graxos livres. Porém a utilização desses ácidos graxos pode estar reduzida (Boden, 1997; Tataranni e Ortega, 2005). Portanto, existe uma forte correlação entre o balanço energético positivo e o acúmulo de lipídeos em tecidos não adiposos, pois quando o consumo e o gasto de energia encontram-se equilibrados, não ocorre aumento no tamanho dos adipócitos e não ocorre a deposição ectópica de lipídeos (Heilbronn, Smith *et al.*, 2004). (Figura 7).

Figura 6 - Obesidade e alterações no tecido adiposo



Adaptado de (Olefsky e Glass, 2010).

Figura 7- Balanço energético e o acúmulo ectópico de lipídeos.

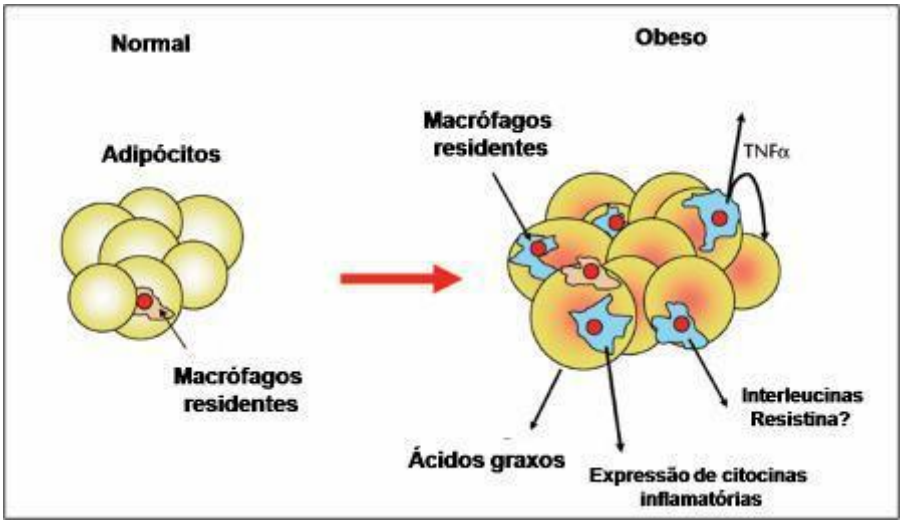


(a) Quando o consumo e o gasto energético estão balanceados, o consumo de gordura equivale à oxidação da mesma e adipócitos pequenos são predominantes. (b) Quando o consumo energético é maior do que o gasto, o excesso de gordura proveniente da dieta causa hipertrofia nos adipócitos e a estocagem de gordura em sítios ectópicos como o fígado, o músculo esquelético e as células β pancreáticas. A deposição ectópica (intracelular) de lipídeos diminui a ação da insulina, levando à hiperinsulinemia, predispondo ao desenvolvimento de DMT2. Adaptado (Heilbronn, Smith *et al.*, 2004).

O acúmulo ectópico de lipídeos pode ocorrer devido a um aumento na captação de ácidos graxos livres, da síntese de lipídeos nos tecidos envolvidos ou ainda de uma redução da oxidação desses ácidos graxos (Shulman, 1999).

Foram propostos dois mecanismos através dos quais o aumento do tecido adiposo antagoniza a ação da insulina em tecidos periféricos. Um dos mecanismos seria o fato de que quando os adipócitos excedem a sua capacidade de estocagem, a gordura começa a se acumular em tecidos que não são apropriados para a estocagem de lipídeos, levando à formação de metabólitos específicos que atuam inibindo a transdução do sinal da insulina. Um segundo mecanismo seria o disparo de um estado de inflamação crônica, decorrente da obesidade, durante o qual citocinas são liberadas de adipócitos e de macrófagos infiltrantes no tecido adiposo. Tais citocinas antagonizam a ação da insulina (Figuras 8 e 9) (Summers, 2006)

Figura 8- Recrutamento de macrófagos na obesidade



Sob condições saudáveis (sem a obesidade) os adipócitos são pequenos e apresentam poucos macrófagos residentes, os quais são relativamente inativos. Na obesidade, novos macrófagos são recrutados para o tecido adiposo e liberam grandes quantidades de moléculas inflamatórias podendo agir em sítios distantes do corpo ou podem ativar adipócitos a secretarem TNFα.

Figura 9- Resistência à insulina induzida pela obesidade

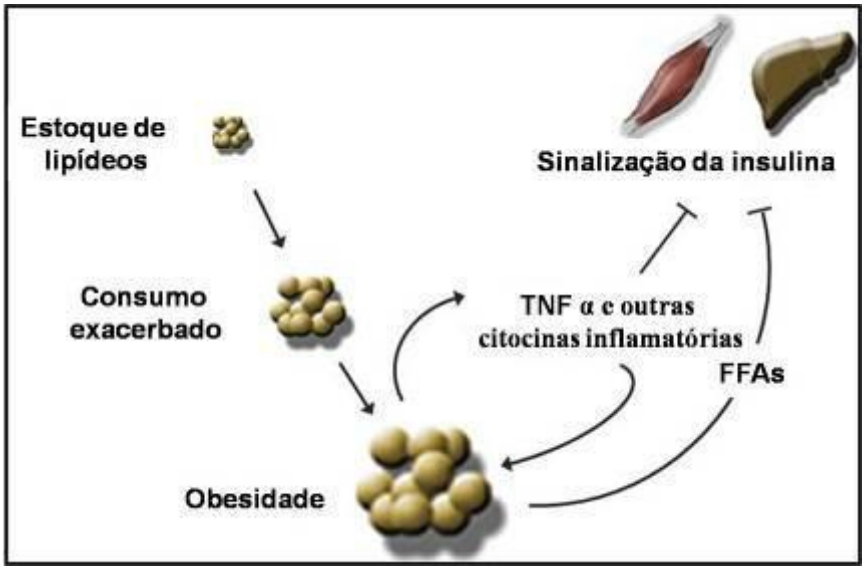


Diagrama esquemático descrevendo a relação entre o aumento de depósitos adiposos, citocinas inflamatórias e a resistência à insulina. Adaptado de (Summers, 2006).

O aumento da estocagem de lipídeos em tecidos não adiposos leva ao acúmulo de moléculas intermediárias do metabolismo lipídico como o diacilglicerol e acetil-CoA, que são moléculas conhecidas por interferir na cascata de sinalização da insulina nesses tecidos (Schrauwen-Hinderling, Roden *et al.*, 2007).

No fígado, o sobrepeso e a obesidade são fortes fatores de risco para o desenvolvimento da doença hepática não alcoólica e a prevalência da obesidade está tomando proporções pandêmicas, uma vez que uma significante parte da população será afetada pela esteatose hepática. O acúmulo de gordura no fígado está geralmente associado a um conjunto de anormalidades metabólicas, relacionadas com a síndrome metabólica. Sabe-se também que o aumento da quantidade de lipídeos no fígado está fortemente correlacionado com a resistência à insulina (Browning, Szczepaniak *et al.*, 2004; Jimba, Nakagami *et al.*, 2005; Yki-Jarvinen e Westerbacka, 2005; Kotronen, Westerbacka *et al.*, 2007).

O acúmulo de lipídeos no coração exerce um importante papel no desenvolvimento de cardiomiopatias e, eventualmente, da disfunção cardíaca. De maneira similar ao que ocorre no fígado e no músculo esquelético a deposição de lipídeos no coração pode levar à resistência à insulina (Sack, Rader *et al.*, 1996). Os metabólitos lipídicos podem ser tóxicos para os cardiomiócitos, induzindo a apoptose (Zhou, Grayburn *et al.*, 2000; Chiu, Kovacs *et al.*, 2001).

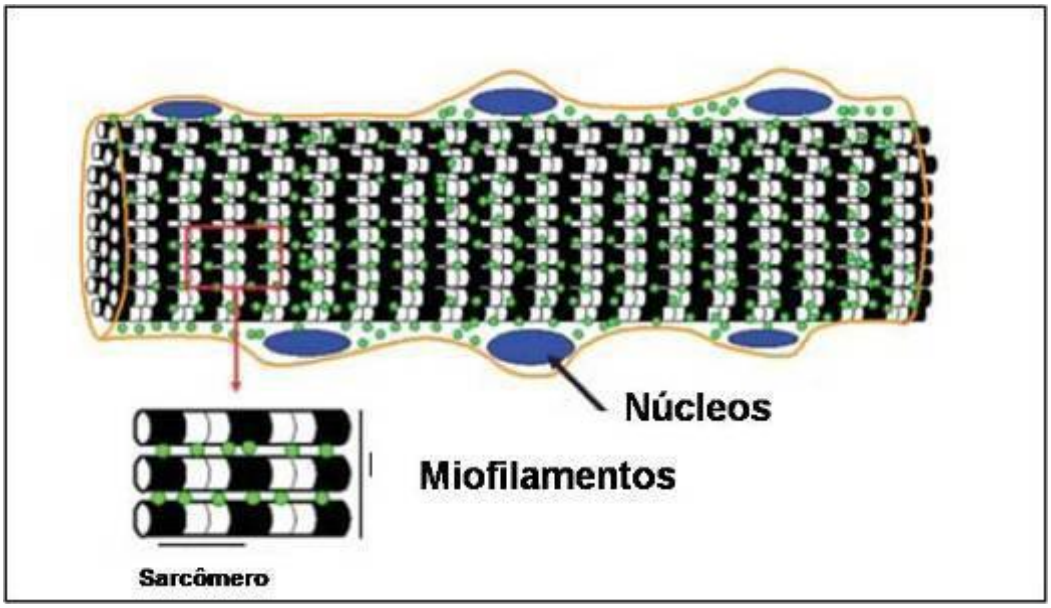
A secreção deficiente de insulina em indivíduos com DMT2 está relacionada à deposição de gordura no pâncreas assim como a altos níveis de ácidos graxos livres (Lee, Hirose *et al.*, 1994; Carpentier, Mittelman *et al.*, 2000). A exposição crônica de células beta pancreáticas a níveis elevados de ácidos graxos livres pode levar a danos na função destas células (Zhou e Grill, 1994; Bollheimer, Skelly *et al.*, 1998).

Acúmulo intramiocelular de lipídeos

A maior parte da gordura endógena é estocada na forma de TG (Vianna, Huntgeburth *et al.*) nos tecidos adiposos subcutâneos e viscerais, porém parte dos TG está também localizada nas fibras musculares esqueléticas. Estudos recentes relataram que TG intracelulares encontram-se organizados em inclusões lipídicas (Blanchard, Gardeur *et al.*, 2008; Meex, Schrauwen *et al.*, 2009). No músculo esquelético essas inclusões lipídicas recebem a denominação de lipídeos intramiocelulares, as quais se distribuem no sarcoplasma

abaixo do sarcolema e entre os miofilamentos da fibra muscular esquelética (Prats, Donsmark *et al.*, 2006) (Figura 10).

Figura 10- Distribuição intracelular de inclusões lipídicas (verde) no sarcoplasma, abaixo do sarcolema
e entre os miofilamentos de uma fibra muscular esquelética.



Adaptado (Prats, Donsmark *et al.*, 2006).

Lipídeos e carboidratos são os principais substratos que fornecem combustível para a síntese aeróbica de ATP no tecido muscular esquelético e, ao contrário dos depósitos endógenos de carboidratos, os estoques de lipídeos são muito grandes e representam mais de 97% do total do estoque endógeno de energia (Van Loon e Goodpaster, 2006). Estes agregados lipídicos presentes no músculo esquelético estão frequentemente localizados nas proximidades da mitocôndria o que vem a sugerir que tais agregados possam funcionar como um suplemento energético (Hoppeler, Howald *et al.*, 1985). A microscopia eletrônica de transmissão, que revela inclusões lipídicas muito próximas às mitocôndrias, reforça esta hipótese de que estas inclusões lipídicas servem de combustível para a oxidação lipídica mitocondrial, principalmente em situações nas quais um rápido suplemento de gordura é requerido, como por exemplo, durante o exercício (Hoppeler, 1986).

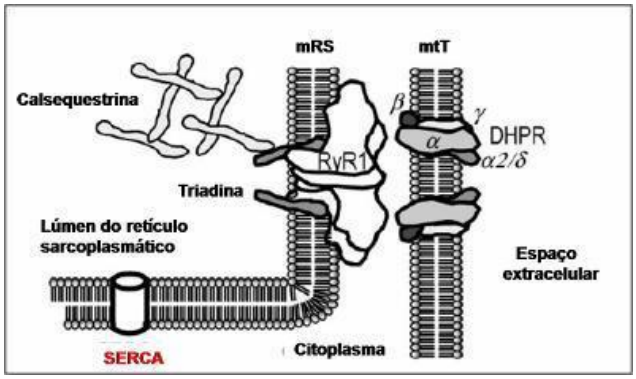
Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático

O retículo sarcoplasmático (RS) do músculo estriado esquelético é um sistema de membranas intracelular altamente especializado que exerce um papel importante no ciclo de

contração-relaxamento do músculo. O elemento chave dessa regulação é a bomba Ca^{2+} ATPase de retículo sarco (endo) plasmático (SERCA), que atua seqüestrando os íons Ca^{2+} para o interior do RS induzindo e mantendo o relaxamento (Aubier e Viires, 1998) (Figura 11).

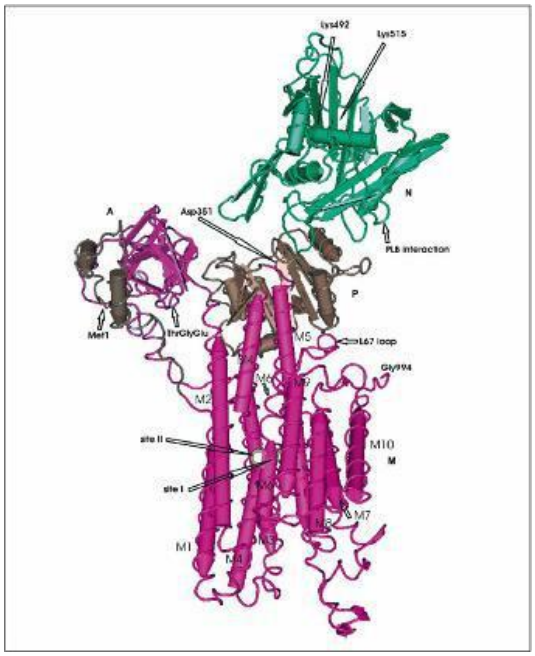
Algumas isoformas de SERCA, codificadas por três diferentes genes foram identificadas: SERCA1, SERCA2 e SERCA3. A SERCA1 é expressa exclusivamente em fibras musculares esqueléticas rápidas (Figura 12). A variante SERCA2a é expressa em células musculares cardíacas, em fibras musculares esqueléticas lentas e em certas células musculares lisas no adulto, já a variante SERCA2b é expressa em todos os tipos celulares. Por fim, a isoforma variante SERCA3 é expressa em uma ampla variedade de tecidos, especificamente em células endoteliais, células epiteliais da traquéia, baço, pulmão, estômago glândulas salivares, glândula adrenal, tireóide, córtex do timo, células da cripta intestinal e células de purkinje no cerebelo (Ozog, Pouzet *et al.*, 1998).

Figura 11- Principais componentes do retículo sarcoplasmático (RS) na tríade do músculo esquelético.



O RS contém SERCA que tranfere Ca^{2+} do citoplasma para o lúmen do RS. A cisterna terminal do RS é rica em calsequestrina (que se liga ao Ca^{2+} e o armazena no lúmen do RS) e possui uma zona altamente especializada, o RS juncional, que contém o canal RyR1 e outras proteínas como a triadina. O canal RYR1 libera Ca^{2+} e também conecta o RS com o túbulo T. Duas cistenas terminais interagem com um túbulo T, formando a tríade. A membrana do túbulo T (mTt) contém canais de Ca^{2+} voltagem-sensíveis DHPR (receptor dihidropiridina). Com a chegada do potencial de ação o túbulo T ativa o DHPR, que por sua vez ativa o RyR1, levando à liberação em quantidade de Ca^{2+} dos estoques do RS para o citoplasma onde esses íons se ligam aos filamentos contráteis, iniciando a contração muscular. Adaptado de Herasse, Parain *et al.*, (2007).

Figura 12 - Modelo da bomba Ca^{2+} ATPase (SERCA1) na conformação E1



(Wuytack, Raeymaekers *et al.*, 2002)

Estudos anteriores abordam a relação entre desordens metabólicas e a contração muscular. Já está descrito que ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica apresentam um aumento na expressão das proteínas SERCA2a, RyR2 e fosfolamban, envolvidas no mecanismo contrátil. Portanto, a obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica causa mudanças na expressão de genes relacionados com o transporte de Ca^{2+} no RS (Lima-Leopoldo, Sugizaki *et al.*, 2008). A atividade da SERCA2 encontra-se diminuída em ratos alimentados com uma dieta rica em sacarose e que desenvolveram resistência à insulina (Wold, Dutta *et al.*, 2005). Especificamente, no músculo esquelético, ocorre uma diminuição na expressão de SERCA2a quando se induz o diabetes melitus tipo I por administração da streptozotocina. Assim, existe uma correlação entre desordens metabólicas e a expressão de proteínas relacionadas com o transporte de Ca^{2+} no tecido muscular (Racz, Szabo *et al.*, 2009).

1 **JUSTIFICATIVA**

Já está bem estabelecido que um balanço energético positivo leva à obesidade causando o aumento da deposição de gordura em tecidos não adiposos, como o músculo esquelético e que a dieta hiperlipídica induz ao aparecimento da resistência à insulina no músculo esquelético.

Desse modo, a utilização do modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos permitirá avaliar possíveis alterações metabólicas nesses animais, bem como estudar os efeitos do sobrepeso na morfologia das fibras musculares esqueléticas.

2 **OBJETIVO GERAL**

O presente projeto teve como objetivo geral investigar os possíveis efeitos de uma dieta hiperlipídica na morfologia do músculo esquelético de camundongos C57BL/6 e examinar as desordens metabólicas causadas por esse modelo experimental.

2.1 **Objetivos específicos**

1- Analisar as modificações nos parâmetros metabólicos dos animais submetidos à dieta hiperlipídica, como aumento da massa corporal, alterações no perfil lipídico, mudanças no metabolismo da glicose e desenvolvimento de resistência à insulina.

2- Analisar as possíveis alterações ultraestruturais das fibras musculares estriadas esqueléticas de camundongos C57BL/6, como inclusões de lipídeos e mitocondrias.

3- Analisar possíveis alterações na expressão de Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA1) em ambos os grupos experimentais, por microscopia confocal a laser.

3 **METODOLOGIA**

3.1 **Protocolo experimental**

Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram realizados de acordo com o guia convencional *"Care Use of Laboratory Animals"* (*US National Institutes of Health* 85-23, revisado 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de uso experimental e cuidado de animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (número do protocolo CEA/221/2008).

Os animais utilizados foram mantidos em caixas adequadas (5 animais em cada caixa) em ambiente com temperatura e umidade controladas (21±2ºC e 60±10%, respectivamente), submetidos a ciclo de luz invertido de 12 horas (claro/escuro) e exaustão 15 min/h com livre acesso à água e comida.

Foram utilizados 20 camundongos C57Bl/6 machos com 13 semanas de idade separados em 2 grupos (n=10) e alimentados durante 16 semanas com uma das seguintes dietas: a) *standard chow* (SC – dieta padrão, 3,8 kcal/g de dieta e b) *high-fat chow* (HF- dieta hiperlipídica, 4,7Kcal/ g de dieta) receberam dieta rica em lipídeos- 60% de lipídeos. Na dieta padrão para roedores (SC) 76% das calorias foram provenientes de carboidratos, 10% de lipídeos e 14% de proteínas. Enquanto na dieta hiperlipídica (HF) 26% das calorias foram provenientes de carboidratos, 60% de lipídeos e 14% de proteínas (Tabela 1). A quantidade de minerais e vitaminas foi idêntica em ambas as dietas experimentais conforme as recomendações do *American Institute of Nutrition's recommendation - AIN93* (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993) (Tabelas 2 e 3). A massa corporal (MC) foi aferida semanalmente durante todo o experimento. Os animais permaneceram nesse esquema de dieta até a 29ª semana de idade, perfazendo um total de 16 semanas de dieta experimental.

Tabela 1- Composição das dietas controle (grupo SC) e hiperlipídica (grupo HF). Mistura de vitaminas* e de minerais** segundo recomendação da AIN-M (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993; Wang, Storlien *et al.*, 1999)

Ingredientes (g/Kg)	**GRUPOS**	
	CONTROLE (SC)	HIGH-FAT (HF)
Caseína (□ 85% de proteína)	140,0	190,0
Maisena	620,692	250,692
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	-	320,0
Fibra	50,0	50,0
Mistura de vitaminas*	10,0	10,0
Mistura de minerais**	35,0	35,0
Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Total em gramas	1.000,0	1.000,0
Energia (Kcal/Kg)	3573	5404
Hidratos de carbono (%)	**76**	**26**
Proteínas (%)	**14**	**14**
Lipídios (%)	**10**	**60**

Tabela 2- Mistura de vitaminas acrescentada em 1 Kg de dieta.

Vitaminas	**g/Kg de mistura de vitaminas**
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Piridoxina-HCl	0,70
Tiamina-HCl	0,60
Riboflavina	0,60
Ácido fólico	0,20
D-Biotina	0,02
Vitamina B_{12} (cianocobalamina) (0,1% em manitol)	2,50
Vitamina E (acetato de □-tocoferol) (500 UI/g)	15,00
Vitamina A (palmitato de retinil) (500 UI/g)	0,80
Vitamina D_3 (colecalciferol) (400 UI/g)	0,25
Vitamina K (filiquinona)	0,08
Sacarose em pó	974,65
Total	1.000,00

Tabela 3- Mistura de minerais para ser acrescentada em 1 Kg de dieta.

Minerais	**g/kg de mistura de minerais**
Carbonato de cálcio, anidro (40,0% Ca)	357,00
Fosfato de potássio, monobásico (22,7% P; 28,73% K)	250,00
Citrato de potássio, tri-potássio, monohidrato (36,16%K)	28,00
Cloreto de sódio (39,34% Na; 60,66% Cl)	74,0
Sulfato de potássio (44,87% K; 18,39% S)	46,60
Óxido de magnésio (60,32% Mg)	24,0
Citrato férrico (16,5% Fe)	6,06
Carbonato de zinco (52,14% Zn)	1,65
Carbonato de manganês (47,70% Mn)	0,63
Carbonato de cobre (57,47% Cu)	0,30
Iodeto de potássio (59,3% I)	0,01
Selenato de sódio, anidro (41,79% Se)	0,01
Paramolibdato de amônia, 4 hidrato (54,34% Mo)	0,008
Meta-silicato de sódio, 9 hidrato (9,88% Si)	1,45
Sulfato de cromo potássio, 12 hidrato (10,42% Cr)	0,275
Cloreto de lítio (16,38% Li)	0,02
Ácido bórico (17,5% B)	0,08
Fluoreto de sódio (45,24% F)	0,0635
Carbonato de níquel (45% Ni)	0,032
Vanadatio de amônia (43,55% V)	0,0066
Sacarose em pó	209,808
Total	1.000,00

3.2 **Eutanásia**

Um dia antes da eutanásia, os animais foram privados de comida, porém tiveram livre acesso à água, sendo submetidos a um jejum de seis horas. Os animais foram profundamente anestesiados (thiopental intraperitoneal). O sangue foi obtido através de punção cardíaca para análise bioquímica e, posteriormente centrifugado a 120g por 15 minutos em temperatura ambiente e o plasma foi guardado individualmente a -80ºC até a realização da análise.

3.3 **Análises metabólicas**

O plasma coletado foi utilizado para investigar os parâmetros metabólicos dos animais. O perfil lipídico: colesterol total (TC) e triglicerídeos foi medidos através do método colorimétrico segundo as instruções do fabricante (Bioclin System II, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil). As concentrações plasmáticas de glicose de jejum foram determinadas utilizando método glicose-oxidase e lido em um glicômetro (Accuchek, Roche Diagnostic, Alemanha). As concentrações plasmáticas de insulina de jejum foram medidas através de radioimunoensaio (RIA kit, Linco Research, Missouri, EUA, Cat. RI-13K). Além disso, o modelo de avaliação da resistência insulina (HOMA-IR) também foi calculado com base nos valores: HOMA-IR= (glicose de jejum x insulina de jejum) /22.5 (Matthews, Hosker *et al.*, 1985).

3.4 **Processamento de rotina para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Para a realização de análise ultraestrutural, o músculo gastrocnêmico dos animais de ambos os grupos experimentais foi dissecado e amostras do tecido foram cuidadosamente cortados em pequenos fragmentos de 1 mm^3. Os fragmentos foram fixados por 48 horas em glutaraldeído (GA) 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4). Após a fixação as amostras foram lavadas duas vezes em 0,1M de tampão cacodilato (pH 7,4) e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% contendo 0,8% de ferricianeto de potássio em tampão cacodilato 0.1M pH 7,2 por 40 min. Após esse tempo, o material foi desidratado em séries crescentes de acetona, impregnado em uma mistura de acetona 100% e Epon (v/v), mantidos por 6h em Epon puro, seguido do emblocamento nessa mesma resina a 60°C por 3 dias para a polimerização. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo, recolhidos em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e posteriormente

observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906 (Laboratório de Microscopia Eletrônica - UERJ).

3.5 **Citoquímica Ultraestrutural para detecção de lipídeos**

Para a realização da detecção ultraestrutural de lipídeos, o músculo gastrocnêmico dos animais de ambos os grupos experimentais foi cuidadosamente dissecado e as amostras do tecido foram cuidadosamente cortadas em fragmentos de 1 $mm^{3.}$ Os fragmentos foram fixados por 48 horas em GA 2,5% diluído em 0,1M tampão cacodilato (pH 7,4). Após a fixação as amostras foram lavadas duas vezes em 0.1M de tampão imidazol ($CH_3H_4N_2$) pH 7,2 por 20 minutos e pós-fixadas por 30 minutos em 2% de OsO_4 diluído em tampão imidazol (1:1). Em seguida, o material foi processado como de rotina para microscopia eletrônica de transmissão. Os cortes ultrafinos foram obtidos e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e posteriormente observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906 (Laboratório de Microscopia Eletrônica - UERJ).

3.6 **Estereologia: quantificação de inclusões lipídicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para a realização da quantificação de inclusões lipídicas por MET, foram selecionados aleatoriamente três blocos de Epon de cada animal (cinco animais de cada grupo) e duas grades de cada um desses blocos foram observadas utilizando o mesmo aumento no microscópio eletrônico (906 Zeiss). Foram capturadas três eletromicrografias aleatórias de cada grade, totalizando 18 imagens por animal e 90 imagens por grupo experimental. Cada uma das eletromicrografias foi subsequentemente examinada excluindo as “linhas proibidas” (Gundersen, 1977). A densidade numérica de inclusões lipídicas por área Q_A, foi estimada como: número de inclusões lipídicas/ A_T, onde a área teste, A_T, foi de 110,0 μm^2. (Mandarim-De-Lacerda, 2003).

3.7 **Detecção de Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA1) por microscopia de confocal.**

Os fragmentos de músculo esquelético dos dois grupos experimentais foram congelados em nitrogênio líquido, clivados e guardados em freezer a -70º C. Os cortes de 4 a 5 m foram feitos em criostato após inclusão em resina hidrofílica Tissue Tek. Em seguida, os cortes foram fixados em acetona a 20º C por 15 minutos. Os cortes foram incubados por 15 minutos com Triton X-100 (0,1%) e incubados overnight com anticorpo primário anti- Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático de camundongo obtido em cabra (SERCA1 Santa Cruz) 1:250. Os sítios inespecíficos foram inibidos através da incubação com soluções de PBS-albumina (PSB-BSA 1% e PBS-BSA 5%). Os cortes foram incubados por 1hora com anticorpo secundário anti-cabra conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes) 1:100. Os núcleos foram marcados com DAPI 1:10.000 por 5 minutos e, posteriormente, os cortes foram incubados por 15 minutos com o corante Azul de Evans 1:10.000, que confere fluorescência vermelha às fibras musculares esqueléticas. Os cortes foram montados em lamínulas com *Slow-fade* e observados em microscópio confocal de fluorescência Zeiss LSM 510 META (UERJ).

3.8 **Análise dos dados**

As amostras foram testadas para normalidade e homogeneidade das variâncias. As diferenças entre os grupos foram testadas através do teste-*t* não-pareado utilizando o *GraphPad Prism* versão 5.03 para Windows *(GraphPad Software, San Diego California EUA)*. Valor de $P \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 **RESULTADOS**

4.1 **Massa corporal**

A massa corporal dos animais foi medida semanalmente, durante as 16 semanas de experimento. O grupo HF teve um maior aumento da massa corporal em relação ao grupo SC. A massa corporal foi 4%, maior no grupo HF em três semanas de experimento ($P<0.05$; teste-*t*) e, ao final do experimento, o ganho de massa corporal foi 15% maior no grupo HF, em relação ao grupo SC ($P<0.001$; teste-*t*) (Figura 13).

4.2 **Perfil lipídico**

Nossos resultados revelaram que o grupo HF apresentou níveis plasmáticos de TG 20% maiores em comparação com o grupo SC ($P<0.001$, *teste-t*) (Figura 14). O grupo HF apresentou níveis de colesterol total 9% maiores do que o grupo SC ($P<0.001$, *teste-t*) (Figura 15).

4.3 **Níveis plasmáticos de glicose e de insulina**

Nenhuma diferença significativa foi observada em relação à glicemia de jejum entre os grupos experimentais (Figura 16). Em relação aos níveis plasmáticos de insulina de jejum, o grupo HF apresentou um aumento de 54% em relação ao grupo SC ($P<0.0001$; *t*-test) (Figura 17). Além disso, foi observado um aumento de 57% no índice de resistência à insulina (HOMA-IR) no grupo HF ($P<0.05$) (Figura 18).

Figura 13- Evolução da massa corporal dos grupos SC e HF

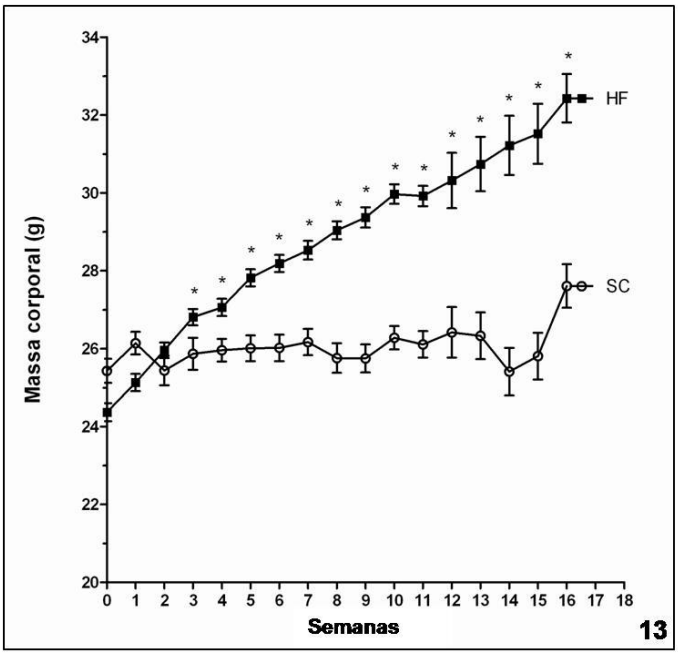


Figura 14- Níveis plasmáticos de TG nos grupos SC e HF

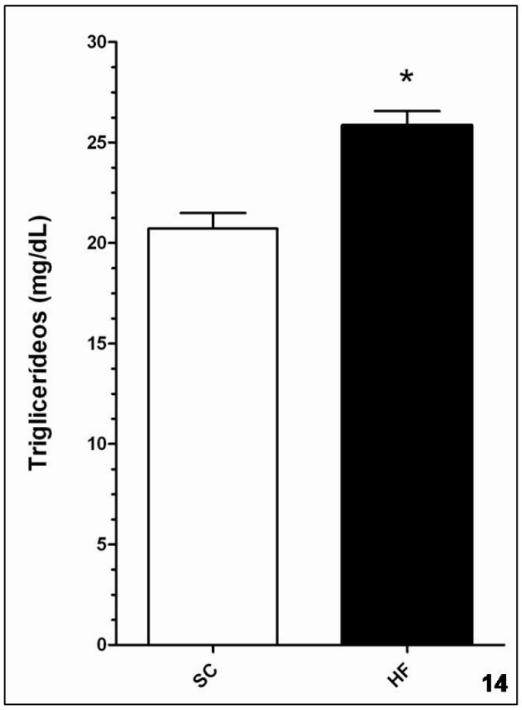


Figura 15- Níveis plasmáticos de colesterol nos grupos SC e HF

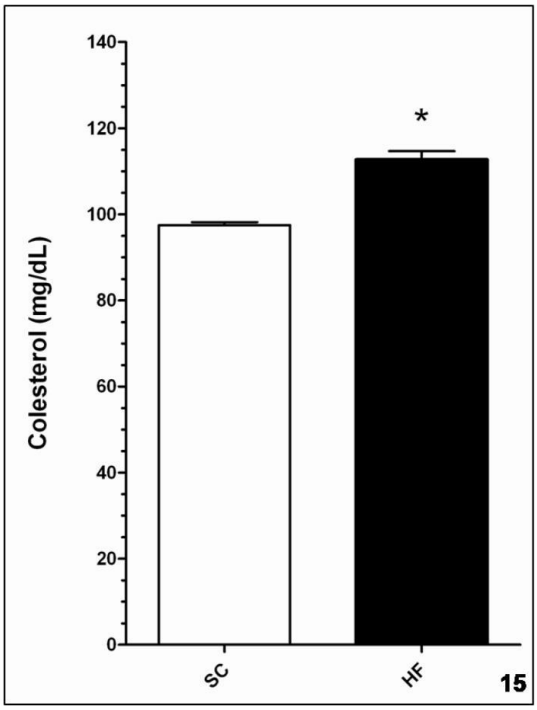


Figura 16- Glicemia de jejum nos grupos SC e HF

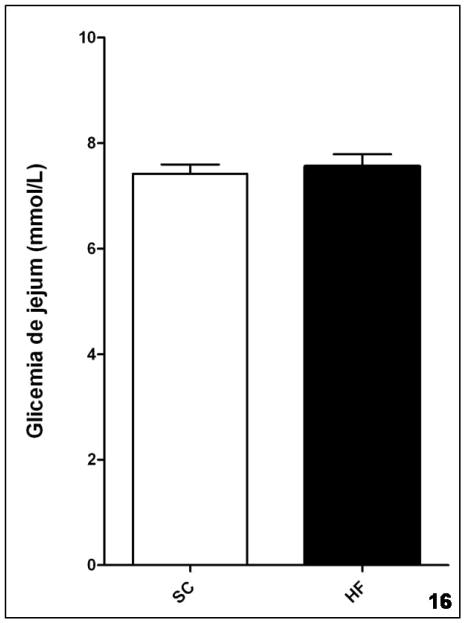


Figura 17- Insulina de jejum nos grupos SC e HF

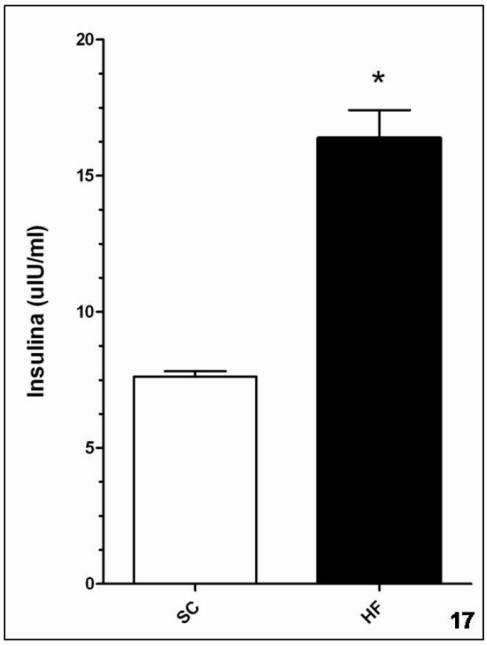
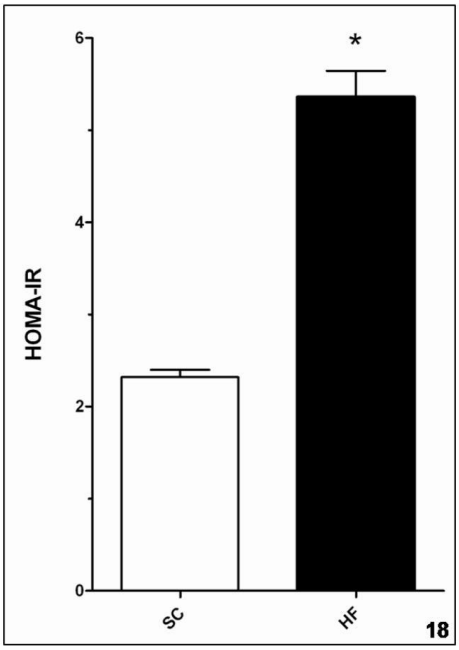


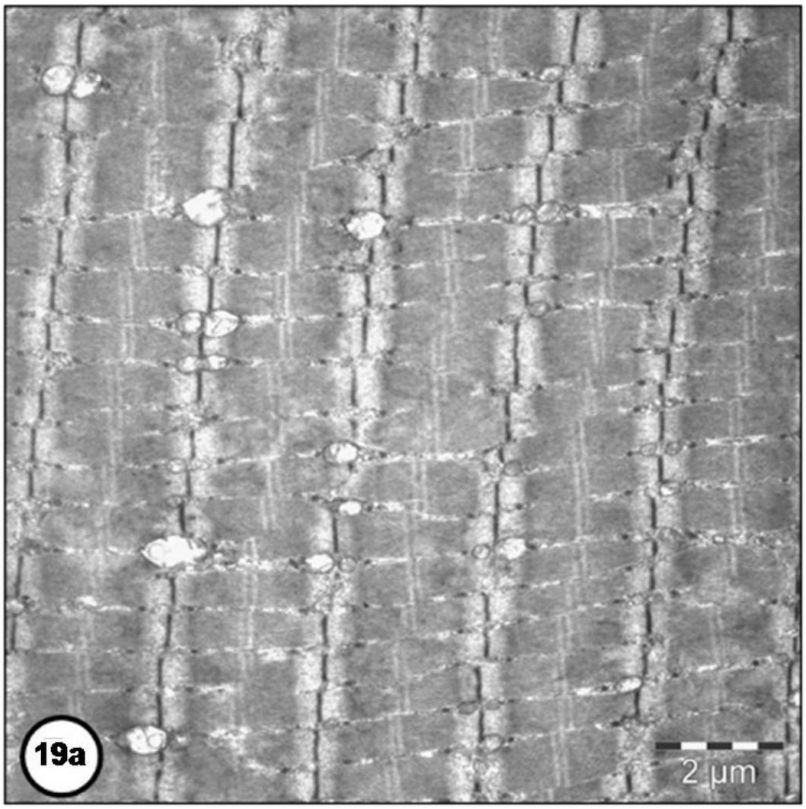
Figura 18- HOMA-IR



4.4 **Ultraestrutura do músculo esquelético**

Considerando normal a ultraestrutura do músculo esquelético do grupo SC, foram observadas significativas alterações morfológicas no músculo esquelético do grupo HF. A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou que no grupo SC a deposição de lipídeos intramiocelular foi mínima. Em relação à morfologia mitocondrial, não foram observadas alterações no grupo SC. No grupo HF houve uma elevada deposição de inclusões lipídicas, geralmente próximas à mitocôndrias. Além disso, no músculo esquelético do grupo HF foram observadas mitocôndrias intramiofibrilares com volume aumentado e com cristas danificadas (Figuras 19 a 22).

Figura 19- Microscopia Eletrônica de Transmissão de rotina nos grupos SC (figura 19 a) e HF (figura 19 b). Barra = 2µ



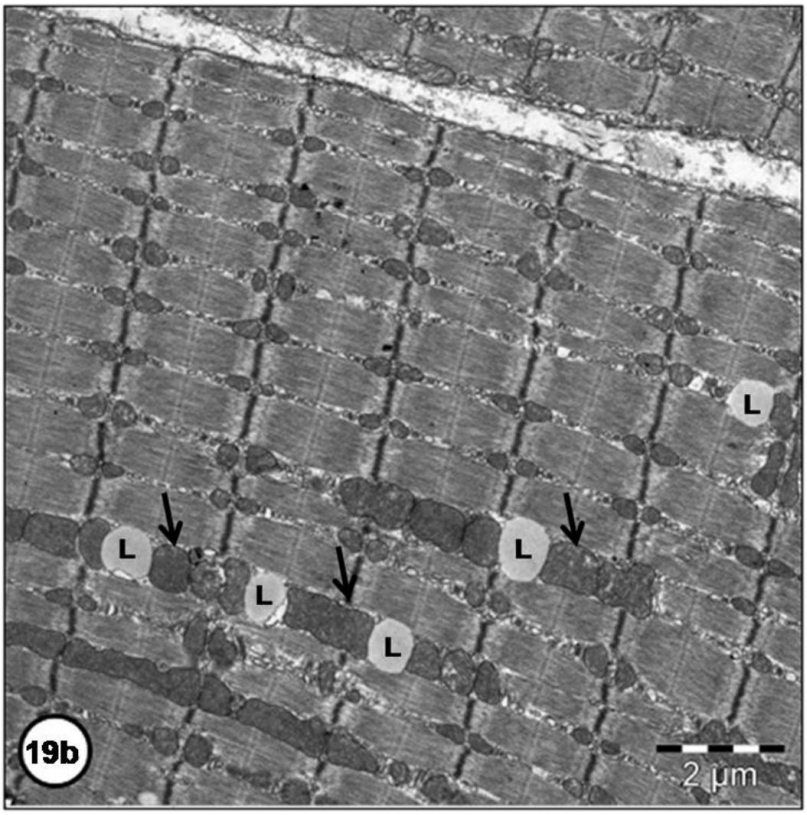
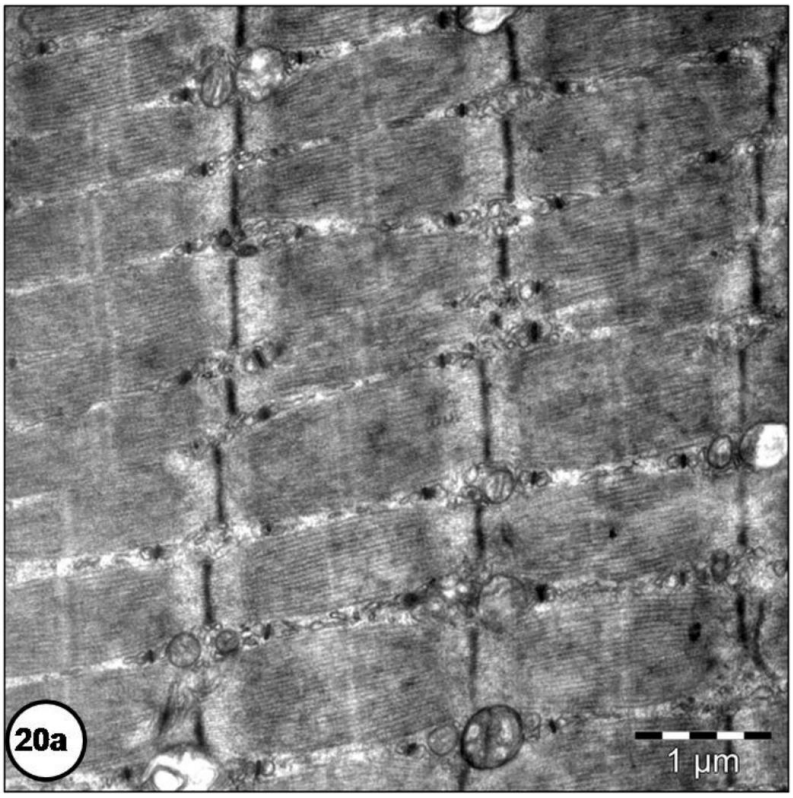


Figura 20- Microscopia Eletrônica de Transmissão de rotina nos grupos SC (figura 20a) e HF (figura 20b). Barra = 2µ



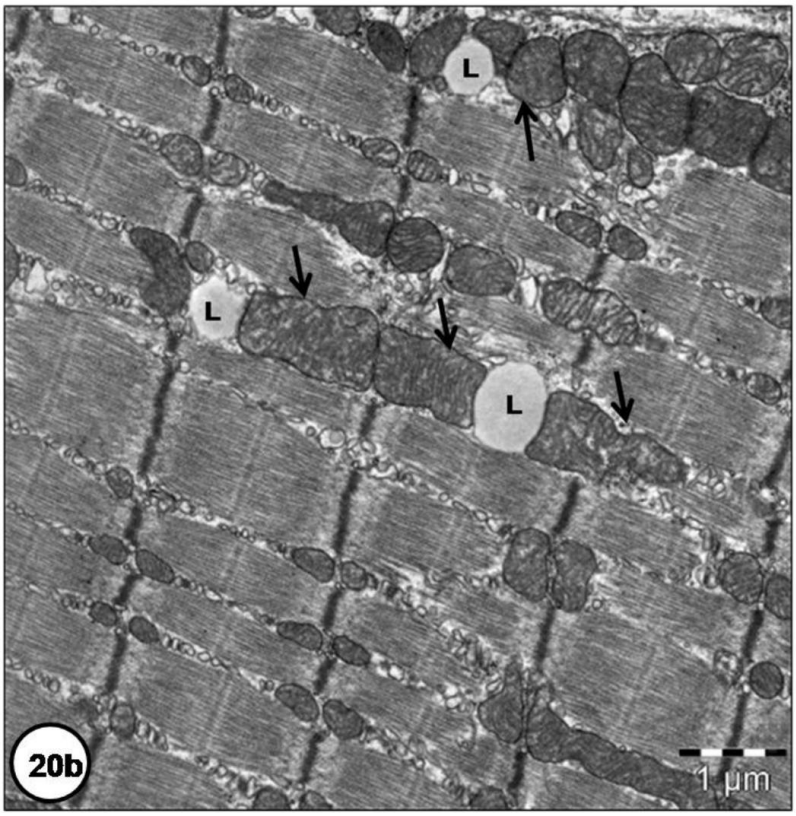
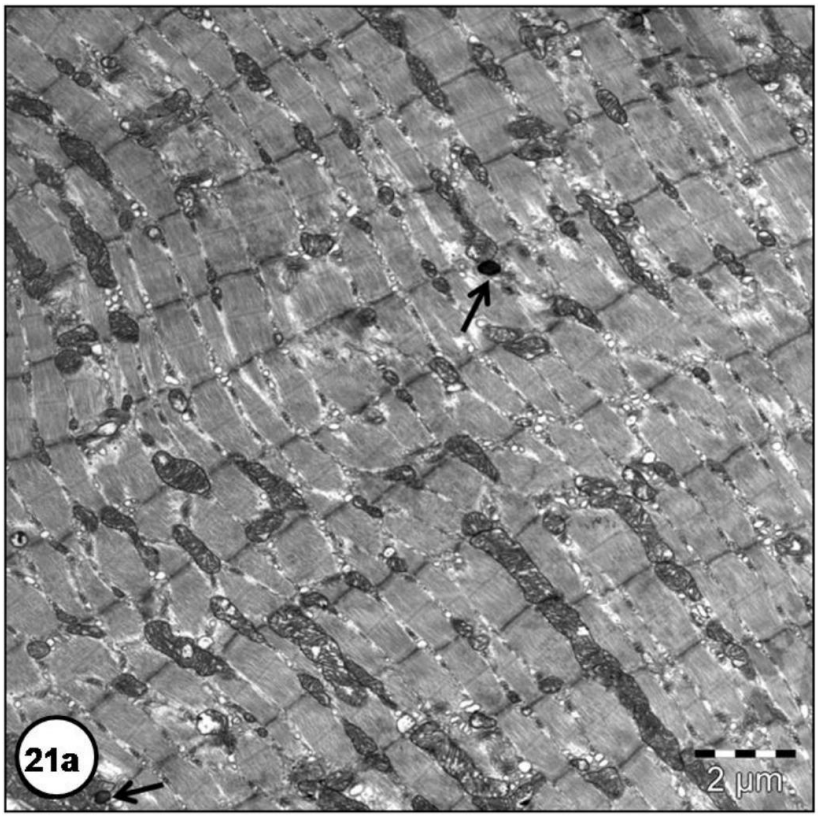


Figura 21- Citoquímica Ultraestrutural para detecção de lipídeos nos grupos SC (figura 21a) e HF (figura 21b). Barra = 2µ



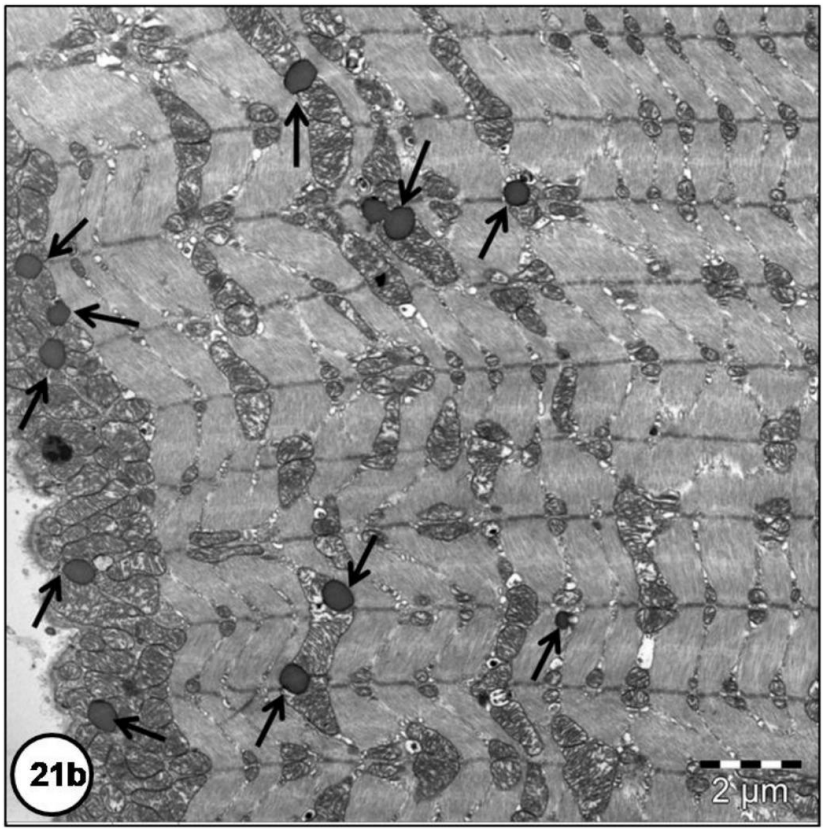
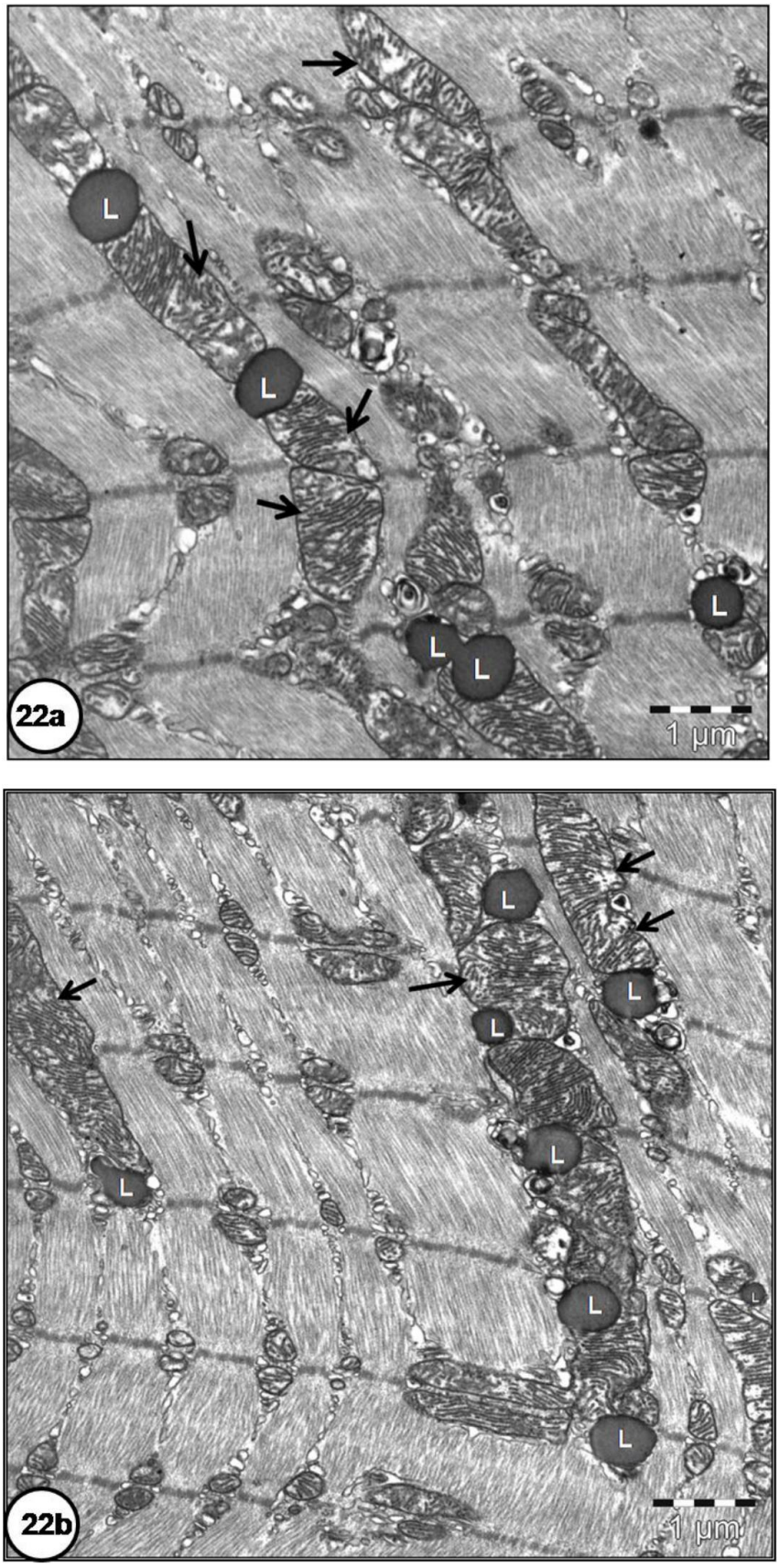


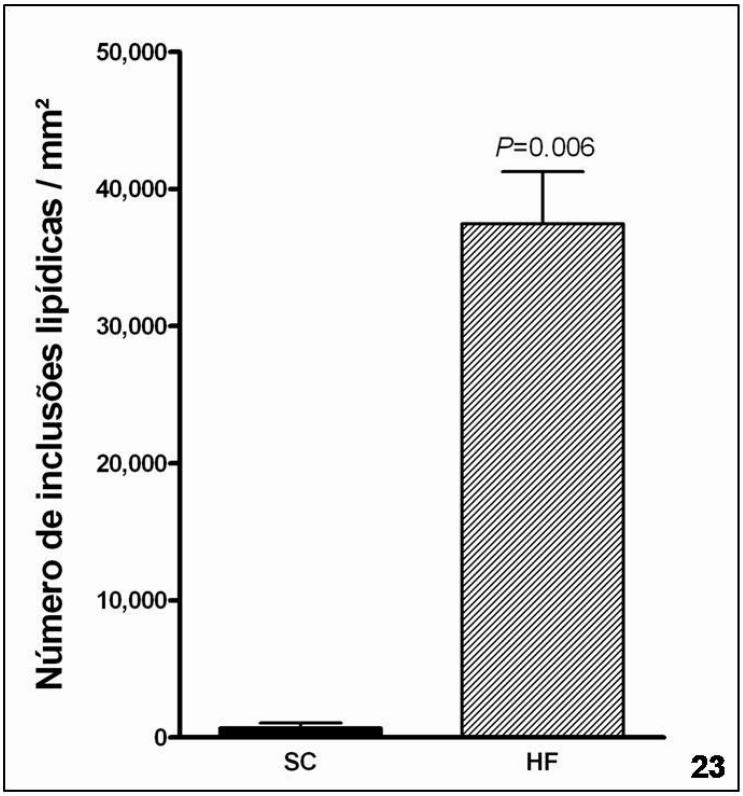
Figura 22- Citoquímica Ultraestrutural para detecção de lipídeos nos grupos SC (figura 22a) e HF (figura 22b). Barra = 2µ



4.5 **Estereologia: quantificação de inclusões lipídicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão**

O estudo esteorológico através da microscopia eletrônica de transmissão revelou que os depósitos de lipídeos foram muito mais numerosos no grupo HF (35471 ± 2678 /mm²) do que no grupo SC (1501 ± 272 / mm²)($P<0.0001$). Portanto, os resultados indicam que uma dieta hiperlipídica influencia na composição intracelular das fibras musculares esqueléticas, aumentando significativamente a deposição de lipídeos (Figura 23).

Figura 23- Quantificação de gotículas lipídicas (grupos SC e HF).



4.6 **Expressão de SERCA1 nas fibras musculares esqueléticas de camundongos alimentados com dieta padrão (grupo SC) (Figura 24) e em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (grupo HF) (Figura 25)**

A análise por microscopia confocal demonstrou que houve um aumento na expressão de SERCA1 no grupo HF quando comparado ao grupo SC. As fibras musculares esqueléticas do grupo SC apresentaram uma menor expressão de SERCA1 (Figura 24), enquanto no grupo HF foi observada uma expressão aumentada de SERCA1 (Figura 25).

Figura 24 – Microscopia de varredura confocal a laser de fibras musculares esqueléticas no grupo SC marcadas com SERCA1.
Barra = 50µ

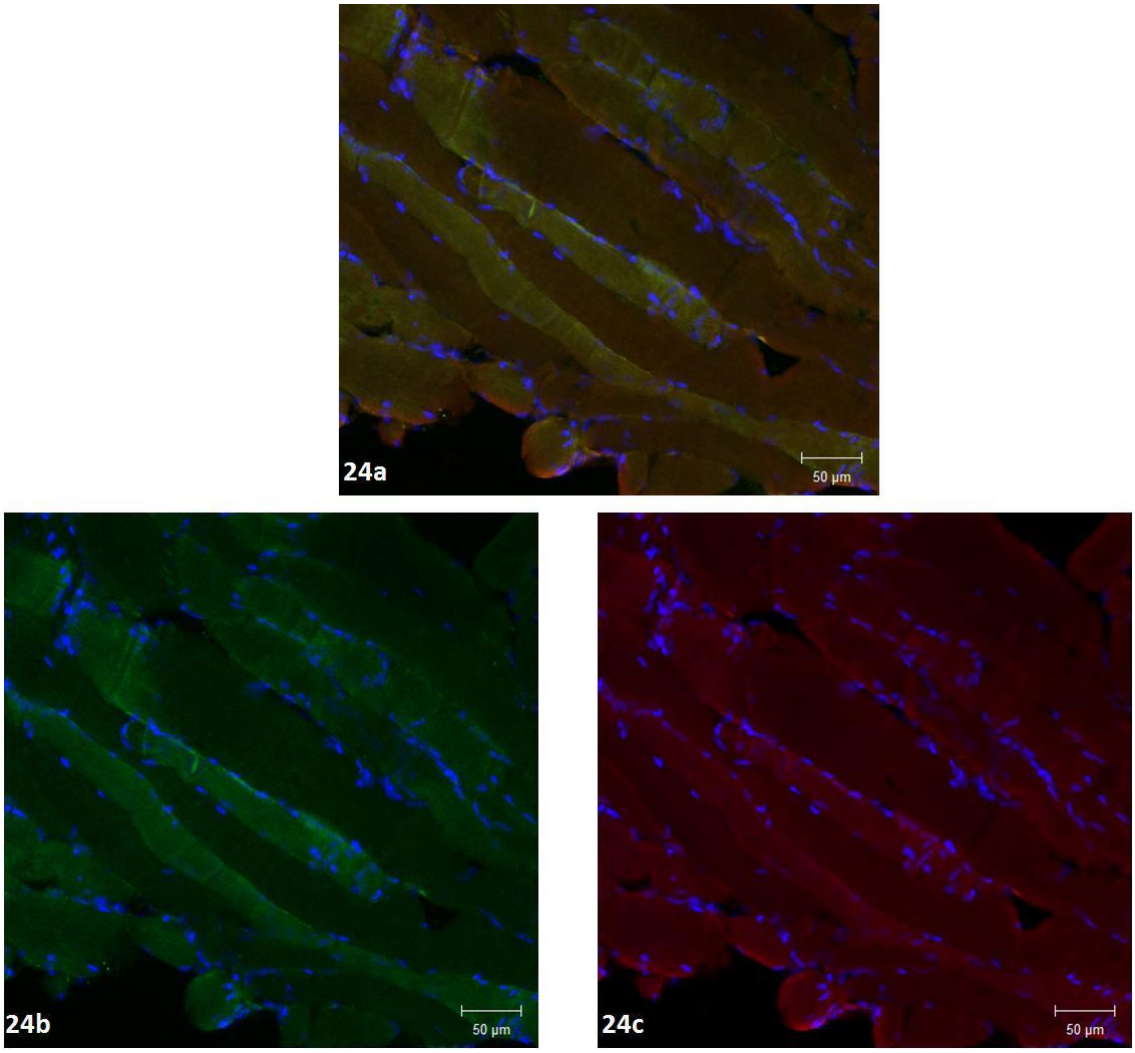
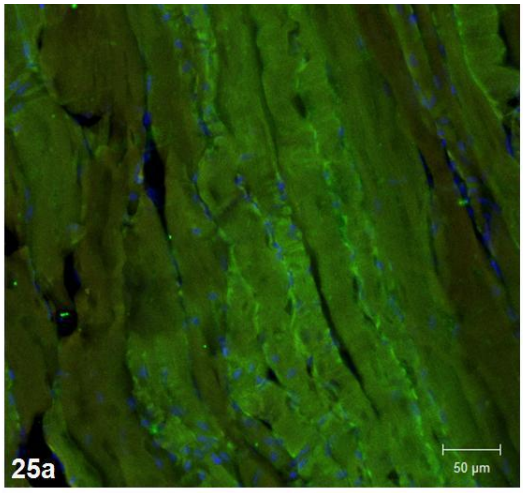
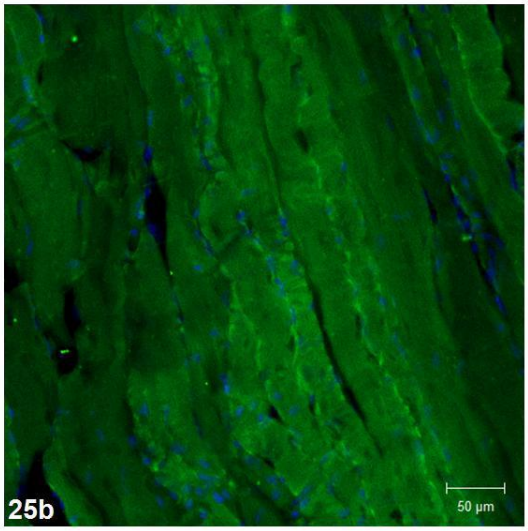
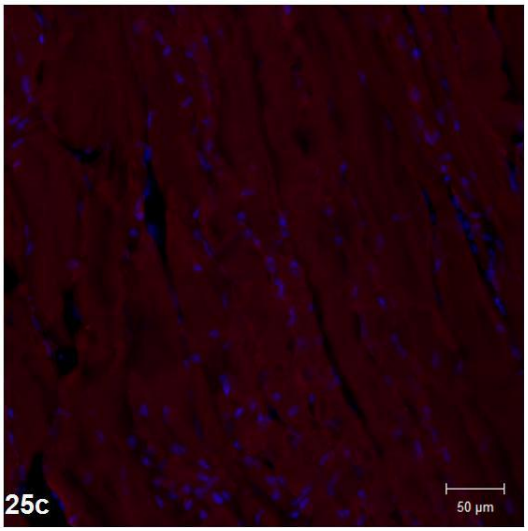


Figura 25- Microscopia de varredura confocal a laser de fibras musculares esqueléticas no grupo HF marcadas com SERCA1.
Barra = 50µ







5 **DISCUSSÃO**

Camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta hiperlipídica reproduzem componentes essenciais comparáveis à síndrome metabólica humana (Fraulob, Ogg-Diamantino *et al.*; Gallou-Kabani, Vige *et al.*, 2007). Os camundongos utilizados no presente estudo desenvolveram um conjunto de desordens metabólicas, caracterizando o perfil da síndrome metabólica. Nossos resultados foram aumento da infiltração de lipídeos, mudanças na estrutura das mitocôndrias que se apresentaram com volume aumentado e com as cristas danificadas e aumento na expressão de SERCA1 no músculo gastrocnêmio de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Além disso, foi observado que o consumo de uma dieta hiperlipídica promove o aumento da massa corporal e dos níveis plasmáticos de lipídeos como triglicerídeos e colesterol total, levando a alterações metabólicas em camundongos C57BL/6. Roedores alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram resistência à insulina em poucas semanas. Se a dieta for prolongada, a resistência à insulina progride para um estado equivalente à síndrome metabólica ou diabetes melitus tipo 2 em roedores, dependendo da predisposição genética (Holloszy, 2009). O modelo experimental utilizado no presente trabalho levou a um aumento nos níveis plasmáticos de insulina, assim a dieta hiperlipídica causou a resistência à insulina. Portanto, está bem estabelecido que uma alimentação inadequada associada a um estilo de vida sedentário leva ao sobrepeso, pois ocorre um balanço energético positivo (Heilbronn, Smith *et al.*, 2004). A obesidade está associada com a dislipidemia que causa a elevação dos níveis de triglicerídeos e de ceramidas, a apoptose e ao comprometimento da função cardíaca (Summers, 2006). O sobrepeso leva frequentemente a uma deposição anormal de lipídeos intramiocelulares, decorrente do consumo de uma dieta hiperlipídica, uma vez que adipócitos excedem sua capacidade de estocagem (Summers, 2006). O protocolo de dieta experimental utilizado neste trabalho, considerado como um modelo de síndrome metabólica induzida pelo consumo de dieta hiperlipídica, causou um acúmulo ectópico de lipídeos. A deposição intramiocelular de lipídeos exacerbada foi observada no músculo gastrocnêmio dos camundongos. Estudos recentes mostraram que os triglicerídeos intracelulares encontram-se organizados na forma de inclusões lipídicas (Simoneau, Kelley *et al.*, 1999; Blanchard, Gardeur *et al.*, 2008), estando de acordo com os nossos resultados que revelaram, através da análise por microscopia eletrônica de transmissão, inclusões lipídicas nas fibras musculares esqueléticas.

Ainda que o acúmulo de ácidos graxos livres no músculo possa ser resultado apenas de uma estocagem exagerada devido aos níveis aumentados de ácidos graxos livres, este acúmulo também pode ocorrer devido a defeitos existentes na utilização de ácidos graxos (Simoneau, Kelley *et al.*, 1999)**.** O aumento da quantidade de inclusões lipídicas intramiocelulares observado no presente estudo, sugere que o consumo contínuo de uma dieta hiperlipídica leva à redução da capacidade oxidativa do músculo esquelético, causando um acúmulo anormal de lipídeos. Pacientes com diabetes melitus tipo 2 são caracterizados por uma diminuição da capacidade de oxidação de lipídeos e também por altos níveis de ácidos graxos livres circulantes (Kahn e Flier, 2000). Estes resultados estão de acordo com nossos achados, uma vez que os animais alimentados com uma dieta hiperlipídica, apresentaram alterações no perfil lipídico e aumento no índice de resistência à insulina (HOMA-IR). Esses resultados sugerem que possa existir uma relação entre altos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e o aumento da estocagem de lipídeos no músculo esquelético. Portanto, os nossos resultados permitem hipotetizar que há uma associação entre o aumento do acúmulo de lipídeos em fibras musculares esqueléticas e o desenvolvimento da resistência à insulina. A obesidade está associada com níveis aumentados de ácidos graxos livres e de triglicerídeos, os quais contribuem para a ocorrência da resistência à insulina em tecidos periféricos como o músculo esquelético (Boden, 2008). Estudos recentes têm mostrado uma forte relação entre o sistema mitocondrial e variações na disponibilidade de lipídeos. Foi observada uma diminuição transitória na atividade mitocondrial e consequentemente regulando os níveis de lipídeos intramiocelulares assim como da síntese de ATP para valores basais. Especulativamente, este fato pode indicar que o acúmulo excessivo de lipídeos pode ser temporariamente impedido por uma oxidação fosforilativa eficiente apesar da disponibilidade de lipídeos circulantes estar aumentada (Laurent, Yerby *et al.*, 2007). O músculo esquelético é um tecido especialmente importante para a resistência à insulina, constituindo um dos maiores órgãos sensíveis à insulina e contribui em cerca de 80% para a captação de glicose estimulada pela insulina. Os lipídeos se acumulam em tecidos não adiposos, levando à formação de metabólitos específicos que prejudicam a sinalização da insulina, consequentemente, levando ao aparecimento da resistência à insulina (Boden, 2008). Os depósitos anormais de lipídeos no músculo esquelético são possivelmente resultado de uma capacidade oxidativa diminuída no músculo esquelético a qual pode estar associada com uma deficiencia na capacidade mitocondrial de oxidar ácidos graxos (Defronzo, Simonson *et al.*, 1981(Vianna; Huntgeburth *et al.*, 2006).

Mitocôndrias isoladas de músculos de ratos adultos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram uma significativa diminuição na capacidade respiratória (Iossa, Lionetti *et al.*, 2003). Por outro lado, em ratos jovens, (30 dias de idade), a dieta hiperlipídica resultou em um aumento na capacidade de utilizar lipídeos como combustível metabólico (Iossa, Mollica *et al.*, 2002), provavelmente o consumo de uma dieta hiperlipídica causa alterações na função mitocondrial.

Com o objetivo de investigar os possíveis efeitos da infiltração lipídica na morfologia de mitocôndrias musculares, nós analisamos através da microscopia eletrônica de transmissão amostras de músculo esquelético de ambos os grupos experimentais (SC e HF). Foram encontradas aberrações na morfologia como aumento no tamanho da organela e danos à matriz mitocondrial. Estas mitocôndrias foram observadas frequentemente próximas a inclusões lipídicas intramiofibrilares. Tem sido sugerida uma ligação entre danos mitocondriais, produção elevada de espécies reativas de oxigênio e seus produtos (peróxidos) (Schrauwen-Hinderling, Roden *et al.*, 2007; Schrauwen, 2007b). A mitocôndria exerce um papel integral no metabolismo de lipídeos e na homeostase. A esteatose hepática causa anormalidades da estrutura mitocondrial como aumento no tamanho e redução na eletrondensidade da matriz mitocondrial (Hoppeler, Howald *et al.*, 1985). Recentemente, foi demonstrado que a dieta hiperlipídica causa algumas mudanças no fígado como esteatose difusa, acúmulo de lipídeos na forma de inclusões e mitocôndrias aumentadas com membranas irregulares (Kiki, Altunkaynak *et al.*, 2007). Estes achados são importantes, uma vez que existe uma relação entre o acúmulo de lipídeos intramiocelulares (LIMC) e lipídeos intrahepatocelulares (LIHC) na obesidade, há um grau de associação entre IMCL e IHCL e a resistência à insulina assim como com o conjunto de fatores de risco cardiometabólicos associados (Toledo, Watkins *et al.*, 2006; Lara-Castro e Garvey, 2008).Estes achados sobre a esteatose hepática e seus efeitos na estrutura mitocondrial estão de acordo com nossos resultados, pois nós observamos as mesmas alterações morfológicas na estrutura da mitocôndria do grupo HF.

Já está estabelecido há décadas que atletas apresentam um grande número de mitocôndrias no músculo esquelético e, estas mitocôndrias apresentam tamanho

aumentado, tais adaptações ocorrem devido a uma maior demanda metabólica no músculo esquelético (Toledo, Watkins *et al.*, 2006). Mitocôndrias grandes podem propiciar um maior desenvolvimento da capacidade de fosforilação oxidativa e, o aumento no tamanho tem sido postulado por favorecer uma conexão mais rápida de compostos fosfatados de alta energia para sítios que utilizam ATP, como o aparato contrátil e o retículo (Gollnick, 1986). Pessoas obesas apresentam elevados depósitos de IMCL e resistência à insulina, ao contrário dos diabéticos que apesar de apresentarem estoques elevados de lipídeos no músculo esquelético não desenvolvem resistência à insulina (Lara-Castro e Garvey, 2008).

Um recente estudo mostrou que a administração durante três semanas de uma dieta hiperlipídica a camundongos resultou em uma diminuição de aproximadamente 90% nos níveis de mRNA de proteínas mitocondriais. (Sparks, Xie *et al.*, 2005).

Nossos resultados revelaram um significativo aumento na expressão de SERCA1 no grupo HF em comparação com o grupo SC. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que revelam que ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica apresentam aumento na expressão de SERCA2, fato associado com uma possível diminuição da atividade contrátil induzida pela obesidade (Lima-Leopoldo, Sugizaki *et al.*, 2008). Desse modo, podemos sugerir que o consumo de uma dieta rica em lipídeos exerce influência na contração do músculo cardíaco, fato evidenciado através do aumento compensatório da expressão da Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA). A dieta hiperlipídica também pode causar danos ao mecanismo contrátil do músculo esquelético, levando, da mesma forma, a um aumento da expressão de SERCA. No músculo esquelético, ocorre uma diminuição na expressão de SERCA2a quando se induz o diabetes melitus tipo I por administração da streptozotocina. Portanto, existe uma correlação entre desordens metabólicas e a expressão de proteínas relacionadas com o transporte de Ca^{2+} no tecido muscular (Racz, Szabo *et al.*, 2009).

Assim, nossos resultados demonstraram que uma dieta hiperlipídica provoca mudanças estruturais no músculo esquelético como aumento da infiltração de lipídeos, alteração na morfologia mitocondrial e aumento da expressão de SERCA1. O consumo dessa dieta também leva à ocorrência do sobrepeso e de modificações metabólicas em camundongos C57BL/6.

CONCLUSÕES

1- Camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em lipídeos reproduzem um modelo de síndrome metabólica, ao apresentarem desordens metabólicas como aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol, glicose, insulina e desenvolvimento de resistência à insulina.

2- O consumo de uma dieta hiperlipídica leva ao aumento da deposição de inclusões lipídicas na fibra muscular esquelética.

3- A dieta hiperlipídica altera a ultraestrutura das mitocondrias intramiocelulares,

4- A obesidade decorrente do consumo de dieta rica em lipídeos leva ao aumento da expressão de Ca^{2+} ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA1).

REFERÊNCIAS

Aguilera, A. A., G. H. Diaz, *et al.* Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. J Nutr Biochem, v.15, n.6, Jun, p.350-7. 2004.

Aubier, M. e N. Viires. Calcium ATPase and respiratory muscle function. Eur Respir J, v.11, n.3, Mar, p.758-66. 1998.

Blanchard, G., J. N. Gardeur, *et al.* Ultrastructural features of hepatocytes in cultured Eurasian perch (Perca fluviatilis L.) as affected by nutritional and husbandry conditions. Br J Nutr, v.100, n.2, Aug, p.317-31. 2008.

Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. Diabetes, v.46, n.1, Jan, p.3-10. 1997.

Obesity and free fatty acids. Endocrinol Metab Clin North Am, v.37, n.3, Sep, p.635-46, viii-ix. 2008.

Boden, G. e A. K. Rao. Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the tissue factor pathway of blood coagulation. Curr Diab Rep, v.7, n.3, Jun, p.223-7. 2007.

Boden, G., V. R. Vaidyula, *et al.* Circulating tissue factor procoagulant activity and thrombin generation in patients with type 2 diabetes: effects of insulin and glucose. J Clin Endocrinol Metab, v.92, n.11, Nov, p.4352-8. 2007.

Bollheimer, L. C., R. H. Skelly, *et al.* Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. J Clin Invest, v.101, n.5, Mar 1, p.1094-101. 1998.

Browning, J. D., L. S. Szczepaniak, *et al.* Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. Hepatology, v.40, n.6, Dec, p.1387-95. 2004.

Carpentier, A., S. D. Mittelman, *et al.* Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. Diabetes, v.49, n.3, Mar, p.399-408. 2000.

Chiu, H. C., A. Kovacs, *et al.* A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. J Clin Invest, v.107, n.7, Apr, p.813-22. 2001.

Cowart, L. A. Sphingolipids: players in the pathology of metabolic disease. Trends Endocrinol Metab, v.20, n.1, Jan, p.34-42. 2009.

Defronzo, R. A., D. Simonson, *et al.* Insulin resistance: a universal finding in diabetic states. Bull Schweiz Akad Med Wiss, p.223-38. 1981.

Festa, A., R. D'agostino, Jr., *et al.* Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. Diabetes, v.51, n.4, Apr, p.1131-7. 2002.

Fraulob, J. C., R. Ogg-Diamantino, *et al.* A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. J Clin Biochem Nutr, v.46, n.3, May, p.212-23.

Gallou-Kabani, C., A. Vige, *et al.* C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. Obesity, v.15, n.8, Aug, p.1996-2005. 2007.

Gartner, L. P. e J. L. Hiatt. Tratado de Histologia. v.3ª Ed., n.Cap. 18, p.431. 2007.

Gollnick, P. D. Metabolic regulation in skeletal muscle: influence of endurance training as exerted by mitochondrial protein concentration. Acta Physiol Scand Suppl, v.556, p.53-66. 1986.

Goodpaster, B. H. e N. F. Brown. Skeletal muscle lipid and its association with insulin resistance: what is the role for exercise? Exerc Sport Sci Rev, v.33, n.3, Jul, p.150-4. 2005.

Grassi, G., F. Arenare, *et al.* Prevalence of cardiovascular risk factors in an unselected italian population. Results of the Cardiolab Project 2004-2008. Acta Cardiol, v.64, n.6, Dec, p.771-8. 2009.

Grassi, G. e J. Diez. Obesity-related cardiac and vascular structural alterations: beyond blood pressure overload. J Hypertens, v.27, n.9, Sep, p.1750-2. 2009.

Grundy, S. M. Inflammation, hypertension, and the metabolic syndrome. Jama, v.290, n.22, Dec 10, p.3000-2. 2003.

Gundersen, H. J. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. J Microsc, v.111, p.219-227. 1977.

Heilbronn, L., S. R. Smith, *et al.* Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. Int J Obes Relat Metab Disord, v.28 Suppl 4, Dec, p.S12-21. 2004.

Herasse, M., K. Parain, *et al.* Abnormal distribution of calcium-handling proteins: a novel distinctive marker in core myopathies. J Neuropathol Exp Neurol, v.66, n.1, Jan, p.57-65. 2007.

Holloszy, J. O. Skeletal muscle "mitochondrial deficiency" does not mediate insulin resistance. Am J Clin Nutr, v.89, n.1, Jan, p.463S-6S. 2009.

Hoppeler, H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. Int J Sports Med, v.7, n.4, Aug, p.187-204. 1986.

Hoppeler, H., H. Howald, *et al.* Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. J Appl Physiol, v.59, n.2, Aug, p.320-7. 1985.

Iossa, S., L. Lionetti, *et al.* Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. Br J Nutr, v.90, n.5, Nov, p.953-60. 2003.

Iossa, S., M. P. Mollica, *et al.* Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. Int J Obes Relat Metab Disord, v.26, n.1, Jan, p.65-72. 2002.

Jimba, S., T. Nakagami, *et al.* Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. Diabet Med, v.22, n.9, Sep, p.1141-5. 2005.

Kahn, B. B. e J. S. Flier. Obesity and insulin resistance. J Clin Invest, v.106, n.4, Aug, p.473-81. 2000.

Kelley, D. E., J. He, *et al.* Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. Diabetes, v.51, n.10, Oct, p.2944-50. 2002.

Kiki, I., B. Z. Altunkaynak, *et al.* Effect of high fat diet on the volume of liver and quantitative feature of Kupffer cells in the female rat: a stereological and ultrastructural study. Obes Surg, v.17, n.10, Oct, p.1381-8. 2007.

Kotronen, A., J. Westerbacka, *et al.* Liver fat in the metabolic syndrome. J Clin Endocrinol Metab, v.92, n.9, Sep, p.3490-7. 2007.

Lapidus, L., C. Bengtsson, *et al.* The quantitative relationship between "the metabolic syndrome" and abdominal obesity in women. Obes Res, v.2, n.4, Jul, p.372-7. 1994.

Lara-Castro, C. e W. T. Garvey. Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome. Endocrinol Metab Clin North Am, v.37, n.4, Dec, p.841-56. 2008.

Laurent, D., B. Yerby, *et al.* Diet-induced modulation of mitochondrial activity in rat muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.293, n.5, Nov, p.E1169-77. 2007.

Lee, Y., H. Hirose, *et al.* Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.23, Nov 8, p.10878-82. 1994.

Lima-Leopoldo, A. P., M. M. Sugizaki, *et al.* Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca2+ handling. Braz J Med Biol Res, v.41, n.7, Jul, p.615-20. 2008.

Mandarim-De-Lacerda, C. A. Stereological tools in biomedical research. An Acad Bras Cienc, v.75, n.4, Dec, p.469-86. 2003.

Matthews, D. R., J. P. Hosker, *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia, v.28, n.7, Jul, p.412-9. 1985.

Meex, R. C., P. Schrauwen, *et al.* Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.297, n.4, Oct, p.R913-24. 2009.

Misra, A. e L. Khurana. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. J Clin Endocrinol Metab, v.93, n.11 Suppl 1, Nov, p.S9-30. 2008.

Moller, D. E. e K. D. Kaufman. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. Annu Rev Med, v.56, p.45-62. 2005.

Olefsky, J. M. e C. K. Glass. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. Annu Rev Physiol, v.72, Mar 17, p.219-46.

Ozog, A., B. Pouzet, *et al.* Characterization of the 3' end of the mouse SERCA 3 gene and tissue distribution of mRNA spliced variants. FEBS Lett, v.427, n.3, May 15, p.349-52. 1998.

Pannacciulli, N., V. De Mitrio, *et al.* Effect of glucose tolerance status on PAI-1 plasma levels in overweight and obese subjects. Obes Res, v.10, n.8, Aug, p.717-25. 2002.

Petersen, K. F., D. Befroy, *et al.* Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. Science, v.300, n.5622, May 16, p.1140-2. 2003.

Prats, C., M. Donsmark, *et al.* Decrease in intramuscular lipid droplets and translocation of HSL in response to muscle contraction and epinephrine. J Lipid Res, v.47, n.11, Nov, p.2392-9. 2006.

Racz, G., A. Szabo, *et al.* The slow sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ -ATPase declines independently of slow myosin in soleus muscle of diabetic rats. Acta Biochim Pol, v.56, n.3, p.487-93. 2009.

Reaven, G. M. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. Nutrition, v.13, n.1, Jan, p.65; discussion 64, 66. 1997.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.

Russell, A. P., G. Gastaldi, *et al.* Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? FEBS Lett, v.551, n.1-3, Sep 11, p.104-6. 2003.

Sack, M. N., T. A. Rader, *et al.* Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. Circulation, v.94, n.11, Dec 1, p.2837-42. 1996.

Saltiel, A. R. e C. R. Kahn. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature, v.414, n.6865, Dec 13, p.799-806. 2001.

Schrauwen-Hinderling, V. B., M. Roden, *et al.* Muscular mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes mellitus. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, v.10, n.6, Nov, p.698-703. 2007.

Schrauwen, P. High-fat diet, muscular lipotoxicity and insulin resistance. Proc Nutr Soc, v.66, n.1, Feb, p.33-41. 2007a.

Of the fit and the fat: mitochondrial abnormalities and type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab, v.92, n.4, Apr, p.1229-31. 2007b.

Shulman, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance in humans. Am J Cardiol, v.84, n.1A, Jul 8, p.3J-10J. 1999.

Simoneau, J. A., D. E. Kelley, *et al.* Obesity and increased contractile activity influence the protein content of UCP2 in human skeletal muscle. Int J Obes Relat Metab Disord, v.23 Suppl 6, Jun, p.S68-71. 1999.

Sobel, B. E. e D. J. Schneider. Platelet function, coagulopathy, and impaired fibrinolysis in diabetes. Cardiol Clin, v.22, n.4, Nov, p.511-26. 2004.

Sparks, L. M., H. Xie, *et al.* A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. Diabetes, v.54, n.7, Jul, p.1926-33. 2005.

Summers, S. A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. Prog Lipid Res, v.45, n.1, Jan, p.42-72. 2006.

Tataranni, P. A. e E. Ortega. A burning question: does an adipokine-induced activation of the immune system mediate the effect of overnutrition on type 2 diabetes? Diabetes, v.54, n.4, Apr, p.917-27. 2005.

Toledo, F. G., S. Watkins, *et al.* Changes induced by physical activity and weight loss in the morphology of intermyofibrillar mitochondria in obese men and women. J Clin Endocrinol Metab, v.91, n.8, Aug, p.3224-7. 2006.

Van Loon, L. J. e B. H. Goodpaster. Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. Pflugers Arch, v.451, n.5, Feb, p.606-16. 2006.

Vianna, C. R., M. Huntgeburth, *et al.* Hypomorphic mutation of PGC-1beta causes mitochondrial dysfunction and liver insulin resistance. Cell Metab, v.4, n.6, Dec, p.453-64. 2006.

Virkamaki, A., K. Ueki, *et al.* Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest, v.103, n.7, Apr, p.931-43. 1999.

Wang, H., L. H. Storlien, *et al.* Influence of dietary fats on c-Fos-like immunoreactivity in mouse hypothalamus. Brain Res, v.843, n.1-2, Oct 2, p.184-92. 1999.

Wold, L. E., K. Dutta, *et al.* Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats. J Mol Cell Cardiol, v.39, n.2, Aug, p.297-307. 2005.

Wuytack, F., L. Raeymaekers, *et al.* Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. Cell Calcium, v.32, n.5-6, Nov-Dec, p.279-305. 2002.

Yki-Jarvinen, H. e J. Westerbacka. The fatty liver and insulin resistance. Curr Mol Med, v.5, n.3, May, p.287-95. 2005.

Yudkin, J. S. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in insulin resistance. Evidence for a common antecedent? Diabetes Care, v.22 Suppl 3, Apr, p.C25-30. 1999.

Zhou, Y. P. e V. E. Grill. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. J Clin Invest, v.93, n.2, Feb, p.870-6. 1994.

Zhou, Y. T., P. Grayburn, *et al.* Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.4, Feb 15, p.1784-9. 2000.