UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Igor Hayaxibara Sampaio

**Acoplamento termodinâmico mitocondrial e resposta a
insulina em células do músculo esquelético**

Ribeirão Preto – SP
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Igor Hayaxibara Sampaio

**Acoplamento termodinâmico mitocondrial e resposta a
insulina em células do músculo esquelético**

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, ênfase em Bioquímica. **Orientador: Prof. Dr. Leonardo Reis Silveira**

Ribeirão Preto - SP
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Sampaio, Igor Hayaxibara

Acoplamento termodinâmico mitocondrial e resposta a insulina em células do músculo esquelético. Ribeirão Preto, 2015.

79 p.: il.; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Silveira, Leonardo Reis

1. Acoplamento termodinâmico. 2. Potencial de membrana mitocondrial. 3. Célula muscular. 4. Resistência à insulina.

Igor Hayaxibara Sampaio

**ACOPLAMENTO TERMODINÂMICO MITOCONDRIAL E RESPOSTA A INSULINA
EM CÉLULAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, ênfase em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

Aprovada em ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição:_____ **Assinatura:**_____

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição:_____ **Assinatura:**_____

Prof. (a) Dr. (a)_____

Instituição:_____ **Assinatura:**_____

Para minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Leonardo Reis Silveira, primeiramente pela oportunidade de desenvolver este projeto de mestrado que me trouxe crescimento profissional e pessoal. Pelo longo caminho já percorrido desde a segunda semana do curso de graduação, onde iniciamos os estudos e iniciação científica. Pelo grande exemplo de dedicação e perseverança no trabalho e vida.

Ao Professor Dr. Tiago Rezende Figueira, pelo incentivo e orientação experimental, promovendo o desenvolvimento de técnicas importantes para o projeto.

À Professora Dra. Ísis do Carmo Kettelhut, que ofereceu suporte para que este projeto de mestrado pudesse ser desenvolvido e seu grande exemplo como professora pesquisadora.

À Professora Dra. Luciane Carla Alberice, com suas sugestões e estrutura laboratorial no suporte para o desenvolvimento do projeto.

Aos Professores Dr. Sérgio Akira Uyemura e Dr. Carlos Curti, possibilitando utilização de equipamentos e espaço em seus laboratórios.

Aos Professores Dr. Eduardo Bradt de Oliveira e Dr. Bernardo Mantovani, pelo grande exemplo como cientistas, seus ensinamentos e formação acadêmica.

Aos Professores Dr. Aníbal Vercesi e Dr. Roger Frigério Castilho, pelo suporte possibilitando utilização de equipamentos laboratoriais e infraestrutura.

Aos colegas de laboratório e amigos: Bruno G. Teodoro, Flávia Baraldi, Michel Araújo, Tanes Lima Yamamura, Carlos Sponton, Lucas M. Bomfim, Felipe Dalalio, Madla A. Passos, André L. Queiroz, Jonathas R. Santos, Amanda R. Martins, Camila P. Rossignoli, Hygor N. Araujo, Dawit A. P. Gonçalves, Hamilton Gimenes, Rafael Rossi, Felipe R Teixeira, Cezinha, William Silveira, entre outros que fizeram pequenas e grandes contribuições no desenvolvimento deste projeto, bem como, os momentos de amizade proporcionado durante todo esse trajeto.

Aos técnicos(as) Simone S. Tavares, Alcides, Nadir, Júlia Bueno, Victor D Galban, Antonieta, Neuza M Zanon, que auxiliaram durante o processo de desenvolvimento do projeto em laboratório.

Sem deixar de mencionar e agradecer imensamente a Mãe, Pai e Irmão, bem como, os demais familiares e amigos que estiveram presentes de alguma forma nos bastidores desta dissertação.

As agências de fomento CAPES e FAPESP pela concessão de bolsa para o desenvolvimento desta tese e pelo apoio financeiro ao projeto.

SAMPAIO, I. H.; **Acoplamento termodinâmico mitocondrial e resposta a insulina em células do músculo esquelético.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2015.

RESUMO

O quadro de resistência à insulina em humanos está fortemente relacionado ao acúmulo de lipídeos intracelulares, a inatividade física e ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO). O objetivo deste estudo foi verificar se o aumento na oferta de nutrientes incluindo glicose e ácido graxo palmítico pode alterar o potencial de membrana mitocondrial, a respiração, a produção de espécies reativas de oxigênio e a resposta a insulina em células do tecido muscular. Nossos resultados mostram que a exposição de células musculares a elevada disponibilidade de substratos resultou em diminuição do potencial de membrana mitocondrial, e aumento da respiração no estado IV e da expressão do RNAm da proteína desacopladora mitocondrial UCP-3. Mostrando a existência de um mecanismo de desacoplamento intrínseco em células do músculo esquelético ativado em situações de elevada oferta de nutrientes. Nessas condições observamos redução do acoplamento e da eficiência termodinâmica mitocondrial. Interessantemente, essa capacidade de desacoplamento parece ser perdida cronicamente como indicado pelos nossos resultados de consumo de oxigênio no período de 48h favorecendo uma menor atividade mitocondrial, aumento de EROs e redução da razão GSH/GSSG. Imagens de microscopia eletrônica em cultura primária e expressão gênica do PGC1- α , um reconhecido gene regulador da biogênese mitocondrial, não demonstraram diferença entre controle e tratamento com palmitato. O ácido palmito resultou na redução da fosforilação de Akt, bem como, na captação de glicose estimulada por insulina. Nossos achados, portanto, sugerem que uma redução do acoplamento termodinâmico mitocondrial e do sistema antioxidante, juntamente com aumento do peróxido de hidrogênio, estão fortemente relacionados a redução da resposta a insulina. Deste modo, nosso estudo sugere um papel importante da mitocôndria na resposta a insulina.

Palavras chave: Acoplamento termodinâmico mitocôndria. Potencial de membrana mitocondrial. Célula muscular. Resistência à insulina.

SAMPAIO, I.H. Mitochondrial thermodynamic coupling and insulin response in skeletal muscle cells. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2015

ABSTRACT

The insulin resistance in human framework is strongly related to the accumulation of intracellular lipids, physical inactivity and increased reactive oxygen species (ROS). The aim of this study was to determine whether the increase in nutrient supply including glucose and palmitic fatty acid can change the mitochondrial membrane potential, respiration, production of reactive oxygen species and the insulin response in muscle tissue cells. Our results show that exposure of muscle cells to high availability of the substrate resulted in decreased mitochondrial membrane potential, in increased respiration in the state IV and mRNA expression of mitochondrial uncoupling protein UCP-3. Showing the existence of an intrinsic uncoupling mechanism of skeletal muscle cells activated in situations of high supply of nutrients. However, under these conditions we observed a reduction of the coupling and mitochondrial thermodynamic efficiency. Interestingly, this decoupling capacity was chronically lost as indicated by our results in the 48 hours period favoring a lower mitochondrial activity, increase of ROS and reduced GSH / GSSG ratio. Images from electron microscopy and gene expression of PGC1- α , a recognized regulatory gene of mitochondrial biogenesis, showed no difference between control and treatment with palmitate. The palm acid resulted in reduced phosphorylation of Akt, as well as glucose uptake stimulated by insulin. Our findings thus suggest that a reduction in mitochondrial antioxidant and thermodynamic coupling system, along with increase in the hydrogen peroxide, are closely related to reducing insulin response. Thus, our findings suggest a role of mitochondria in insulin response.

Keywords: Mitochondrial thermodynamic coupling. Mitochondrial membrane potential. Muscle cell. Insulin resistance.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina
Acetil-CoA	acetil coenzima A
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-beta-4-ribofuranoside
AMPK	proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
Akt	proteína quinase B
ATP	trifosfato de adenosina
BSA	albumina de soro bovino
CAT	ciclo do ácido tricarboxílico
cDNA	DNA complementar
CCCP	carbonil cianeto 3-clorofenil hidrazona
CO₂	dióxido de carbono
CoA-SH	coenzima A
CS	citrato sintase
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	meio de cultura eagle modificado por dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPBS	tampão fosfato-salina de Dulbecco
DTT	diclorodifeniltricloroetano
EDL	extensor digital longo
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Etilenoglicol bis (éter 2-aminoetil) N,N,N',N' tetracético
EROS	espécies reativas de oxigênio
FBS	soro fetal bovino
FCCP	carboxicianeto-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona
GLUT-4	proteína transportadora de glicose
G6P	glicose-6-fosfato
NaHCO₃	bicarbonato de sódio
HEPES	ácido etanossulfônico 4-2 hidroxietil piperazina-1
KCl	cloreto de potássio
KHCO₃	bicarbonato de potássio
Mg²⁺	magnésio
MgCl₂	cloreto de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NRF1	fator nuclear respiratório 1
PBS	tampão fosfato salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real
PGC1α	coativador do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PI3-K	fosfatidilinositol 3-quinase
PKC	proteína quinase C
PKCθ	isoforma θ da proteína quinase C
PMSF	fluoreto de fenilmetilsufonil
PPAR	receptor ativado por proliferadores de peroxissomo
PPAR β	isoformas β do receptor ativado por proliferadores de peroxissomo
PPARγ1	isoformas γ 1 do receptor ativado por proliferadores de peroxissomo
PPARγ2	isoformas γ 2 do receptor ativado por proliferadores de peroxissomo
PVDF	fluoreto polivinidileno
RNA	ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
RT-PCR	reação de PCR em tempo real
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecilsulfato de sódio
siRNA	do inglês <i>short interfering RNA</i>
TBST	tampão salina Tris-HCl com tween 20
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa pró-inflamatório
Tris-HCl	tris-hidroximetil aminometano cloridrato
UCP3	proteína desacopladora mitocondrial

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Consumo de oxigênio de células do músculo esquelético	36
Figura 2 – Equação para obtenção do acoplamento termodinâmico (valor-q)	36
Figura 3 – Potencial de membrana mitocondrial de células de músculo esquelético	39
Figura 4 – Potencial de membrana mitocondrial de células de músculo esquelético (C2C12).....	40
Figura 5 – Potencial de membrana mitocondrial, regiões de referência para platô	42
Figura 6 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de células de músculo esquelético permeabilizadas (cultura primária)	45
Figura 7 – Curva de calibração para aquisição do potencial de membrana mitocondrial	46
Figura 8 – Quantificação do potencial de membrana mitocondrial de células musculares permeabilizadas (cultura primária)	47
Figura 9 – Quantificação do potencial de membrana mitocondrial	48
Figura 10 – Potencial de membrana mitocondrial em células C2C12	49
Figura 11 – Conteúdo de células totais em cultura	50
Figura 12 – Viabilidade celular	51
Figura 13 – Consumo de oxigênio	53
Figura 14 – Consumo de oxigênio em células musculares controles e tratadas com palmitato durante 2, 24 e 48 horas	54
Figura 15 – Acoplamento termodinâmico mitocondrial em células C2C12	55
Figura 16 – Conteúdo de Akt fosforilada em cultura de células primárias de músculo esquelético	56
Figura 17 – Fosforilação de Akt em células C2C12	57
Figura 18 – Conteúdo de glutathiona reduzida e oxidada em cultura primária (A) e linhagem C2C12 (B)	58
Figura 19 – Curva temporal de fluorescência de Amplex ultra-red	60

Figura 20 – Curva padrão de peróxido de hidrogênio	61
Figura 21 – Emissão de peróxido de hidrogênio em células musculares	61
Figura 22 – Captação de glicose em cultura primária de células musculares	62
Figura 23 – Microscopia eletrônica de mitocôndrias	63
Figura 24 – Expressão relativa de RNAm	65
Figura 25 – Expressão relativa de RNAm de C2C12	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos Específicos	25
3 JUSTIFICATIVA	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Isolamento e cultura primária de células musculares	27
4.2 Cultura C2C12	28
4.3 Viabilidade celular	29
4.4 Tratamento com palmitato	29
4.5 Determinação de proteínas totais	30
4.6 SDS-PAGE e western blotting	30
4.7 Determinação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	32
4.8 Avaliação dos níveis de Glutathione reduzida e oxidada (GSH/GSSG)	32
4.9 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)	33
4.10 Reação de Transcrição Reversa (RT)	34
4.11 Consumo de oxigênio	35
4.12 Avaliação do acoplamento termodinâmico mitocondrial	36
4.13 Determinação do potencial de membrana mitocondrial em cultura primária	37
4.14 Potencial de membrana mitocondrial em células C2C12	40
4.15 Viabilidade celular	42
4.16 Microscopia eletrônica de mitocôndria	43
4.17 Análise Estatística	43
4.18 Determinação da captação de glicose	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Medida do potencial de membrana mitocondrial de células musculares	44
5.2 Potencial de membrana mitocondrial: Cultura C2C12	49
5.3 Conteúdo e viabilidade celular: C2C12	50

5.4 Determinação do consumo de oxigênio de células do músculo esquelético	52
5.5 Acoplamento termodinâmico mitocondrial: C2C12	55
5.6 Avaliação da resposta à insulina	56
5.7 Conteúdo de glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG)	57
5.8 Determinação da emissão de espécies reativas de oxigênio (H₂O₂)	59
5.9 Determinação da captação de glicose em células de músculo esquelético	62
5.10 Microscopia eletrônica de cultura primária	63
5.11 Transcrição gênica	64
 6 DISCUSSÃO	 67
 7 CONCLUSÃO	 72
 8 REFERÊNCIAS	 73
 ANEXO I – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO	 79

1 INTRODUÇÃO

A resistência à ação da insulina no músculo esquelético é uma das principais características em indivíduos diabéticos não dependentes de insulina. Embora o número de pesquisas nessa área tenha crescido exponencialmente, o mecanismo responsável pela instalação dessa patologia ainda não é totalmente conhecido. Porém, há um consenso da existência de uma forte correlação entre resistência à insulina, inatividade e elevado conteúdo de lipídios intracelulares (SAVAGE et al, 2007; SILVEIRA et al, 2008). Experimentalmente, esse quadro tem sido facilmente induzido em animais submetidos a dieta-hiperlipídica (DHL) (BREHM et al, 2006) ou em células isoladas expostas a altas concentrações de ácidos graxos (HIRABARA et al, 2007).

Randle et al. (1963) foram os primeiros a proporem que sob elevada exposição aos ácidos graxos, a utilização de glicose é substancialmente reduzida em diferentes tecidos incluindo o muscular. Este mecanismo bioquímico foi originalmente proposto como ciclo glicose-ácido graxo. O mecanismo que suporta este conceito está associado a uma razão elevada de acetil-CoA/CoA-SH como consequência de uma oxidação elevada de lipídios seguido por um aumento no conteúdo intracelular de citrato e glicose-6-P (G6-P). O acúmulo de acetil-CoA inibe a enzima piruvato desidrogenase (PDH), via ativação da PDH kinase, a enzima responsável pela fosforilação e inativação do complexo PDH, reduzindo a oferta de piruvato (glicose) como substrato oxidativo. De modo sinérgico, o conteúdo elevado de citrato inibe a enzima reguladora da via glicolítica fosfofrutoquinase (PFK). Este efeito aumenta a razão G6-P/F1,6-bifosfato inibindo a hexoquinase, a enzima responsável pela captação e fosforilação de glicose, consequentemente reduzindo a disponibilidade intracelular de glicose como substrato.

Nas últimas décadas, surgiu um número crescente de estudos mostrando ainda a existência de mecanismos moleculares associados a resistência à insulina e elevada disponibilidade de ácidos graxos no tecido muscular esquelético. Os mecanismos que levam a resistência à insulina induzem redução da fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) e demais componentes da via de sinalização a insulina em serina, causando prejuízos na transmissão do sinal (GRIFFIN et al, 1999). Isso reduz a mobilização de GLUT-4 para a membrana, e consequentemente, diminui a captação de glicose pelas células musculares (SPRIET, 2002). Porém, no tecido muscular, existem mecanismos que regulam a disponibilidade e o aproveitamento dos ácidos graxos e seus derivados, mantendo assim, seus níveis constantes no interior da célula. Um destes mecanismos é mediado pelo ativador do receptor proliferador do peroxissomo (PPAR) (PUIGSERVER et al, 2003). Após a ativação do receptor nuclear PPAR- β através da ligação direta com ácidos graxos, ocasionando a expressão de diversos genes, incluindo os que estão relacionados com a biogênese mitocondrial (PGC-1 α) e metabolismo de ácidos graxos, o que resulta em um aumento da capacidade celular em oxidar ácidos graxos em consequência do aumento da capacidade mitocondrial (HIRABARA et al, 2007). Se este sistema for prejudicado, uma perda da sincronização entre disponibilidade e oxidação de ácidos graxos pode resultar em lipotoxicidade. Nessas condições, a atividade do PPAR- β é supostamente reduzida, favorecendo o acúmulo intracelular de triacilglicerol (IMTG). Esta alta disponibilidade de IMTG está associada à alteração do estado redox (estresse oxidativo) intracelular, baixa atividade do ciclo do ácido tricarboxílico e β -oxidação, causando resistência à insulina (KOVES et al, 2008; ANDERSON et al, 2009).

Dados recentes sugerem ainda que o diacilglicerol (DAG), ceramidas e acetil-coenzima A, todos estes derivados do triacilglicerol intracelular, atuam como ativadores de duas isoformas

da proteína quinase C (PKC). As nPKCs (nPKC δ , ϵ , θ , μ e η) e cPKCs (cPKC α , β e γ), conhecidas por diminuírem a responsividade à insulina. Estas isoformas são serinaquinasas que, quando ativadas diminuem a ativação da PI3-K, uma importante proteína da via de sinalização da insulina (BODEN et al, 2005). Yu et al (2002) observaram em ratos após infusão lipídica sob *clamp* insulinêmico, uma diminuição de 30% na fosforilação em tirosina do IRS-1 e, cerca de 50% de redução na atividade da PI3-K associada ao IRS-1, o que coincidiu com a ativação da PKC θ e subsequente ativação do fator nuclear KB (NFkB) através da fosforilação de seu respectivo inibidor, I κ B. Uma vez fosforilado, este libera NFkB que migra do citosol para o núcleo, promovendo a transcrição do fator de necrose tumoral alfa pró-inflamatório (TNF- α) (AKIRA et al, 2006). A elevada expressão gênica de TNF- α induz o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), causando aumento da resistência à insulina e diminuição da atividade do IRS-1, PI3-K e Akt (HOUSTIS et al, 2006).

Kelley et al (1994) em um estudo interessante demonstraram que indivíduos normais quando submetidos a jejum de 8 horas, oxidam predominantemente ácidos graxos. Ao passo que, após receberem uma dieta rica em glicose (situação de elevada concentração plasmática de insulina), esses indivíduos oxidam predominantemente glicose. Apresentando, portanto, uma grande flexibilidade metabólica entre a oxidação de lipídios e glicose. Em contraste, indivíduos obesos e resistentes à insulina após 8 horas de jejum oxidam predominantemente glicose como demonstrado pelo elevado valor do coeficiente respiratório (QR). Ao passo que, após receberem uma dieta rica em glicose, estes indivíduos não alteraram a predominância entre a oxidação de glicose e lipídios. Exibindo, portanto, uma forte inflexibilidade metabólica. A baixa capacidade em oxidar lipídios nos indivíduos resistentes à insulina sugere um comprometimento da β -oxidação e, conseqüentemente, favorecimento da síntese de ácido graxo. Embora as causas desse

processo sejam desconhecidas, é provável que esteja ocorrendo um comprometimento da atividade do ciclo do ácido tricarboxílico, reduzida anaplerose e, portanto, baixa capacidade de produção de energia oxidativa (RANDLE, 1998). Considerando a associação entre o potencial oxidativo e atividade antioxidante, é provável que uma reduzida atividade mitocondrial diminua a capacidade antioxidante.

De fato, Boveris et al (1972), demonstraram elegantemente em mitocôndrias isoladas uma correlação entre a produção de espécies reativas e a oferta de substrato mitocondrial, gerando aumento da produção de peróxido de hidrogênio. Por outro lado, estimulando a respiração mitocondrial com ADP, houve uma redução da taxa de produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial. Além disso, mitocôndrias isoladas com alta disponibilidade de NADH/NAD⁺ apresentam maior produção do ânion superóxido e consequente aumento de peróxido de hidrogênio. Entretanto, quando esse quadro é revertido com aumento da demanda energética e redução do potencial de membrana mitocondrial há diminuição na emissão de peróxido de hidrogênio.

Apesar do forte consenso da reduzida atividade da β -oxidação em indivíduos sedentários, estudos recentes tem desafiado essa hipótese sugerindo que nessas condições a β -oxidação dos ácidos graxos é favorecida apesar da reduzida atividade mitocondrial (LIN et al, 2002). Koves et al. (2005) mostraram que indivíduos com obesidade ou diabetes apresentam elevada taxa da β -oxidação dos ácidos graxos. Nesses indivíduos, constatou-se ainda uma reduzida taxa na oxidação de glicose e depleção dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (CAT), sugerindo uma reduzida atividade do CAT. Dessa forma, é possível especular que a elevada taxa na β -oxidação seguida da reduzida atividade do CAT favorece o acúmulo de acetil-CoA e seus derivados, os quais são conhecidos inibidores da cascata de sinalização da insulina.

A hipótese da elevada β -oxidação em indivíduos resistentes a insulina é fortalecida com base nos achados de numerosos estudos mostrando que a exposição aguda aos lipídios, dieta hiper lipídica e obesidade aumentam a expressão de diversos genes associados ao aumento no metabolismo de lipídios e redução no metabolismo de glicose, os quais são alvos dos fatores de transcrição ativados pelos PPARs (KOVES et al, 2008). Porém, essas alterações não estão associadas ao aumento na expressão de genes do metabolismo oxidativo incluindo genes das enzimas do CAT, da cadeia de transporte de elétrons e de biogênese mitocondrial, como PGC-1 α . Igualmente aos efeitos da dieta hiper-lipídica, o exercício físico crônico aumenta o conteúdo intracelular de triacilglicerol no músculo esquelético e a expressão de genes do metabolismo de lipídios. Porém, esses aumentos são acompanhados de aumento na expressão das enzimas oxidativas, um efeito coordenado entre a β -oxidação dos ácidos graxos e do ciclo do ácido tricarboxílico. Esses dados sugerem, portanto que, a reduzida atividade mitocondrial pode ser um fator determinante na instalação do diabetes tipo 2 no tecido muscular.

Kelley et al. (2002) examinando o efeito da disfunção mitocondrial no metabolismo de glicose verificaram que em mitocôndrias musculares extraídas de indivíduos obesos, a capacidade dessas mitocôndrias oxidarem NADH bem como o conteúdo da enzima citrato sintase foram substancialmente reduzidos em obesos. Ortenblad et al (2005) observaram que em condições basais a atividade da enzima citrato sintase em indivíduos resistentes a insulina era 14% menor comparada a indivíduos normais. Ao passo que, amostras musculares desses indivíduos incubadas com glicose e insulina mostraram um aumento na atividade dessa enzima somente nos indivíduos normais indicando que a reduzida atividade do CAT pode constituir-se de um importante mecanismo de indução de resistência à insulina.

Curiosamente, uma seção aguda de contração muscular em ratos obesos Zucker foi capaz de reverter o quadro de resistência à insulina nesses animais (HOLLOSZY et al, 2005). Em estudos recentes em nosso laboratório, fomos também capazes de observar o mesmo fenômeno (dados não publicados). A captação de glicose (2-deoxi-[2,6³H]-glicose) em cultura de células musculares de ratos previamente tratadas com ácido graxo foi reduzida. Porém, quando submetidas à contração muscular, essas células em cultura mostraram uma normalização da captação de glicose, exibindo valores da mesma magnitude das células controles. Esses achados fortalecem o conceito da sobrecarga de nutrientes mitocondrial como um dos principais indutores da resistência à insulina no tecido muscular, pois sabidamente o exercício agudo não é capaz de induzir as adaptações inerentes ao exercício crônico, como é o caso do aumento de biogênese mitocondrial. Em acordo com essa hipótese, Anderson et al. (2009) observaram que animais submetidos a uma dieta rica em lipídios apresentaram um aumento na produção de H₂O₂ mitocondrial em fibras isoladas de músculo esquelético, sugerindo portanto, um efeito direto dos ácidos graxos no aumento da produção de espécie reativa de oxigênio mitocondrial.

O exercício agudo é capaz ainda de reduzir o conteúdo intracelular de ácidos graxos e seus derivados, sendo estas moléculas importantes na indução do quadro de resistência à insulina (HOLLOSZY et al, 2005). Esse tipo de atividade é conhecido também por aumentar a translocação dos transportadores de glicose (Glut-4) no tecido muscular por um mecanismo independente de insulina, supostamente ativado por aumentos nas concentrações citosólicas de Ca⁺⁺ e H₂O₂. Porém, esse mecanismo parece ser mais eficiente em indivíduos com elevada capacidade mitocondrial comparado a indivíduos sedentários. Michael et al. (2001) observaram, que cultura de células musculares transfectadas com o gene PGC1- α mostram uma elevada eficiência mitocondrial juntamente do aumento na captação de glicose e conteúdo de Glut-4. Esses achados, claramente nos mostram que as alterações do equilíbrio redox intracelular não

podem ser consideradas isoladamente como um fator decisivo para indução da resistência à insulina no tecido muscular esquelético. Pois o mecanismo de translocação de Glut-4, e portanto, de captação de glicose é dependente de espécies reativas de oxigênio. Recentemente, Loh et al. (2009) mostraram evidências desse mecanismo em camundongos transgênicos para enzima GPX1^{-/-}, uma proteína importante na regulação das concentrações intracelulares de H₂O₂ no tecido muscular. Esses animais foram protegidos contra a resistência à insulina induzida pela DHL, mostrando ainda aumento na sensibilidade a este hormônio. Em adição, Reid et al. (1992), demonstraram em fibra muscular isolada de rato que uma breve exposição da fibra muscular a baixas concentrações de H₂O₂ aumenta a força de contração. Em contraste, a adição de antioxidantes teve efeito oposto, reduzindo a intensidade da força. Estes resultados são sugestivos da necessidade de certa produção de EROs intramuscular para a funcionalidade celular do tecido. De fato, a menor razão capacidade oxidativa/capacidade antioxidante nos músculos do tipo II (glicolíticos) sugere que a baixa capacidade antioxidante nos músculos tipo II é muito importante para o aumento da captação e oxidação de glicose durante a contração muscular intensa (SILVEIRA et al, 2008). Sandström et al. (2006), investigando o efeito da produção endógena de EROs na captação de glicose durante a contração muscular intensa em camundongos, demonstraram que o tratamento agudo com N-acetilcisteína (NAC), um antioxidante inespecífico e doador de cisteína, reduziu a captação de glicose em aproximadamente 50%. Em adição, músculos de camundongos superexpressando superóxido dismutase dependente de Mn²⁺ (SOD-Mn²⁺), uma enzima que catalisa a conversão do ânion superóxido em H₂O₂, exibiram taxa maior de captação de glicose (~25%, P<0,05), durante a contração muscular, comparado ao grupo de animais controles (*wild-type*). Esses resultados reforçam a proposição de que as EROs exercem efeito importante na captação e metabolismo de glicose.

Diante desse paradoxo, qual é o real papel das EROs no mecanismo de indução de resistência à insulina? Certamente a resposta dessa pergunta é complexa, mas fica claro até o momento que essas espécies exercem um papel importante no processo de captação de glicose dependente e independente de insulina. Porém, a elevada produção dessas espécies acompanhada da baixa capacidade mitocondrial favorece o aparecimento de lesões mitocondriais, apoptose e processos inflamatórios (SILVEIRA et al, 2008). Todos estes, são características marcantes do quadro de resistência à insulina no tecido muscular. As observações de uma elevada capacidade antioxidante no tecido muscular de indivíduos treinados fisicamente fortalecem o conceito da importância da regulação das concentrações dessas espécies no tecido muscular. Esses indivíduos não somente apresentam aumento da capacidade antioxidante, mas também da capacidade respiratória mitocondrial indicando que o aumento coordenado entre esses sistemas pode ser de fundamental importância para manutenção das concentrações de glicose em nosso organismo (SANDSTROM et al, 2006). Interessantemente, indivíduos treinados fisicamente exibem um elevado conteúdo intramuscular de ácidos graxos sugerindo que a baixa capacidade mitocondrial é mesmo um fator importante de indução de resistência à insulina periférica. Sendo a mitocôndria o principal sítio de oxidação de glicose e ácidos graxos, muita atenção tem sido dada a disfunção mitocondrial como importante aspecto na patogênese da diabetes mellitus tipo 2. No entanto, permanece por ser esclarecido se a reduzida capacidade mitocondrial é causa ou consequência da resistência à insulina.

Assumindo, portanto, as mitocôndrias como o principal sítio de produção de EROs no tecido muscular e, se a resistência à insulina reduz a capacidade mitocondrial é intrigante o conceito de aumento da produção de EROs no diabetes. Considerando que, a produção de EROs está diretamente associada a capacidade respiratória do tecido. Porém, há mais de 30 anos Boveris et al. (1976) demonstraram em suspensão mitocondrial de músculo esquelético entre

outros que, a oxidação de ácidos graxos aumentou a geração de EROs comparado a oxidação de substratos do complexo I (malato e piruvato) e II (rotenona mais succinato). Embora pouca importância foi atribuída a esses resultados, a elevada produção de EROs foi devido ao processo de fluxo reverso de elétrons da flavoproteínaquinona oxireductase (ETF) para o complexo I. Nessas condições, o complexo I torna-se mais reduzido favorecendo o escape de elétrons e a produção de EROs na matrix mitocondrial. Igualmente aos efeitos dos ácidos graxos, adições de succinato não acompanhada de rotenona (inibidor do complexo I) favoreceram o fluxo reverso de elétrons (SCHRAUWEN et al, 2001), indicando que uma elevada taxa de oxidação de FADH_2 pode estar envolvido com esse processo. Como descrito anteriormente, as observações da baixa capacidade mitocondrial em animais submetidos a uma dieta hiper-lipídica como evidenciado pela redução na atividade da enzima citrato sintase e pela baixa fosforilação de ADP no estado respiratório 3 (dados não submetidos a publicação) sugerem que nessas condições a razão de substratos do complexo I (NADH)/complexo II (FADH_2) será menor. Uma vez que, a atividade do ciclo do ácido tricarboxílico responsável pela produção de NADH e FADH_2 na razão de 3:1 estará comprometida. Dessa forma, o aumento da β -oxidação dos ácidos graxos em organismos resistentes a insulina favorecerá a produção de substratos do complexo I e complexo II numa razão próxima de 1/1 para cada 2 carbonos oxidados no ciclo de Lynen. Estimulando, portanto, o processo de fluxo reverso de elétrons e consequentemente a geração de EROs.

Fortalecendo esse conceito da elevada produção de EROs imposta pelo acúmulo de triacilglicerol intracelular, músculo esquelético resistente a insulina exibe uma elevada expressão de UCP-3 (proteína desacopladora mitocondrial). Há evidências de que as UCPs transportam o ânion ácido graxo da matriz para o espaço intermembrana pelo movimento flip-flop. Dessa forma, a UCP-3 protege as mitocôndrias contra o acúmulo de ácidos graxos na matriz (SCHRAUWEN et al, 2001). Essa hipótese é suportada pelas observações de que a UCP-3 é *up-*

regulada em situações onde a disponibilidade de AG excede a sua capacidade de oxidação, incluindo jejum, dieta hiperlipídica e diabetes. Ao passo que, a UCP-3 é *down*-regulada em situações onde a capacidade de oxidar AG é aumentada incluindo treinamento aeróbio e redução da massa corporal. Em adição, a expressão elevada de UCP-3 em músculos do tipo II, comparado a músculo do tipo I, é consistente com essa hipótese, uma vez que esse tipo de músculo apresenta baixa capacidade de oxidar lipídios (SCHRAUWEN et al, 2001).

Portanto, estamos propondo nesse estudo que o aumento da oferta de NADH e FADH₂ na cadeia de transporte de elétrons proveniente de glicose e ácido graxos (ácido palmítico), poderia aumentar o potencial de membrana mitocondrial e este ser o mecanismo principal de aumento de espécies reativas de oxigênio, redução na disponibilidade de antioxidantes (GSH/GSSG) e, conseqüentemente redução da sensibilidade à insulina em células do músculo esquelético. Se isso for verdadeiro, este quadro poderá facilmente ser revertido com estratégias de redução do potencial de membrana mitocondrial incluindo a indução da contração muscular, o aumento da expressão do gene UCP-3 ou do indutor de biogênese mitocondrial PGC1 α e o tratamento com o desacoplador mitocondrial dinitrofenol. Todos, supostamente reduzirão o potencial eletroquímico mitocondrial, aumentando o fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons e favorecendo a redução da emissão de espécies reativas de oxigênio e aumento na demanda do consumo de glicose e ácidos graxos. Deste modo, nossos achados indicam que estratégias de controle do potencial de membrana mitocondrial podem constituírem-se de importante recurso para o tratamento da obesidade e da resistência à insulina em células de músculo esquelético.

2 OBJETIVOS

Geral: Investigar o efeito da elevada disponibilidade de nutrientes (glicose e ácido graxo palmítico) no potencial de membrana mitocondrial, no consumo de oxigênio mitocondrial, na produção de espécies reativas de oxigênio e na resposta a insulina em células musculares.

Específicos:

- a) Quantificar o potencial de membrana mitocondrial utilizando o método da safranina em cultura primária muscular expostas ao ácido palmítico;
- b) Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio em células musculares controles e expostas ao ácido palmítico;
- c) Mensurar o consumo de oxigênio basal, na presença de oligomicina e CCCP;
- d) Medir a expressão dos genes da UCP-3 e do PGC1- α ;
- e) Verificar a resposta a insulina através da fosforilação da proteína Akt e captação de glicose.

3 JUSTIFICATIVA

Evidências apontam que atualmente existem mais de 300 milhões de pessoas portadoras de obesidade e diabetes em todo território mundial. Entretanto, o mecanismo associado a essa patologia ainda não foi completamente elucidado. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que os ácidos graxos são indutores de resistência à insulina reduzindo a expressão de genes associados ao metabolismo de glicose e ácidos graxos, diminuindo a atividade mitocondrial e estimulando o ciclo glicose-ácido graxo. Observações preliminares do nosso laboratório mostraram ainda que a exposição de células musculares resistentes à insulina ao AICAR ou ao desacoplador mitocondrial (CCCP), compostos conhecidos por induzirem aumento no consumo de oxigênio mitocondrial, restaurou a captação de glicose sugerindo que o aumento no potencial de membrana mitocondrial parece exercer um importante papel na indução da resistência à insulina no tecido muscular. Portanto, estamos propondo que o aumento no potencial de membrana mitocondrial induzido pela elevada disponibilidade de nutrientes é um importante determinante do processo de instalação da resistência à insulina no tecido muscular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos descritos neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - USP - Campus de Ribeirão Preto, número do processo: 063/2012.

4.1 Isolamento e cultura primária de células musculares

As células musculares foram obtidas a partir dos músculos quadríceps, isquiotibiais, tibial anterior, extensor digital longo (EDL), sóleo e gastrocnêmio de ratos machos (quatro semanas). O material biológico foi extraído com o auxílio de instrumentação cirúrgica esterilizada e isolados em tampão fosfato-salina de Dulbecco (DPBS), contendo glicose 1% (w/v) e penicilina 1% (w/v). O tecido muscular foi triturado com auxílio de pinça e tesoura, após centrifugação de 20 minutos por 1000 rpm a 4 °C, o precipitado foi homogeneizado e em solução contendo collagenase tipo II a 2%, durante 90 minutos, a 37 °C. Em seguida, passou por outra digestão em solução contendo collagenase a 2,5 %, tripsina 2,5 % (w/v) e DNase 0,1% (w/v), durante 30 minutos, a 37 °C. O homogenato foi centrifugado a 1000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C e, em seguida, 30 mL de DMEM com 10 % de Soro Fetal Bovino (FBS) e 10% de Soro de Cavalo foram adicionados à solução para minimizar ação da tripsina sobre as células. A solução foi centrifugada a 1000 rpm, por 20 min, a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O material foi ressuspenso em meio de cultura DMEM contendo soro fetal bovino 10 % e soro de cavalo a 10 %, L-glutamina a 4 mM, antibiótico a 1 % e pH 7,3. Após a contagem, os mioblastos foram distribuídos em placas de seis poços (25×10^4 células) contendo matrigel 0,1% (w/v) e mantidas a

37 °C em estufa úmida na presença 5% de CO₂ até atingirem o seu estágio de diferenciação (5º dia). Após as células atingirem confluência de 80% a troca do meio DMEM contendo soro de cavalo 10% foi realizada a cada 48 horas até as células atingirem ponto de diferenciação celular. (LYNGE et al., 2001).

4.2 Cultura C2C12.

Células de músculo esquelético de camundongo imortalizadas (C2C12) foram descongeladas do crio tubo acondicionado em nitrogênio líquido, seguido de plaqueamento em garrafa de 75 cm² em meio DMEM com glicose (25 mM) na presença de soro fetal bovino (10 %) e penicilina-estreptomicina (1 %). Após atingir confluência de 70 % os mioblastos foram extraídos com auxílio de tripsina (0,25 %) e plaqueadas em placas de cultura conforme demanda experimental. Em seguida, quando confluência atingir 90% o meio é trocado para DMEM com soro de cavalo (2 %) e penicilina-estreptomicina (1 %), troca do meio é repetida a cada 48 horas até mioblastos atingirem diferenciação celular. (Schmitz-Peiffer et al., 1999)

4.3 Viabilidade celular.

Células diferenciadas e preparadas para seus respectivos experimentos, foram removidas da placa de cultura com auxílio de tripsina (0,25 %), seguido de centrifugação a 750 rcf, durante 5 min em temperatura ambiente. Após serem homogeneizadas em Krebs Ringer (NaCl 119 mM, KCl 4,8 mM, KH_2PO_4 1,25 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM, NaHCO_3 50 mM) contendo glicose 25 mM e HEPES 10 mM, pH 7,4, uma alíquota das células foi adicionado no *trypan blue* (0,4%) e contagem de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer (Barbosa et al, 2013).

4.4 Tratamento com palmitato.

Após diferenciação celular, as células foram incubadas com ácido palmítico (500 μM C2C12 e 600 μM cultura primária). Para o preparo do meio de cultura contendo ácido palmítico foi utilizado o ácido palmítico (C16:0), Sigma (P0500), St. Louis, U.S.A. solubilizado em álcool etílico absoluto (solução estoque 100 mM), Albumina do soro bovino (1%) foi dissolvido em DMEM contendo glicose (25 mM), posteriormente o ácido palmítico foi adicionado em solução com agitação constante à 37 °C durante 2 horas. Em seguida, o meio de cultura preparado foi filtrado em membrana 0,2 μm (GILDE e VAN BILSEN, 2003; HIRABARA et al., 2007; SABIN et al., 2007; HOMMELBERG et al., 2009).

4.5 Determinação de proteínas totais.

A concentração de proteínas foi determinada através da análise do sobrenadante de amostras coletada com o tampão Ripa contendo Tris (50 mM pH 7,4) NaCl (150 mM) EDTA (1 mM), Triton X-100 (1%), o sobrenadante foi diluído 10 vezes e adicionado ao reagente Bradford (20/1000 μ L). Leitura da absorbância (595 nm) foi realizada em placa de elisa (BRADFORD, 1976).

4.6 SDS-PAGE e western blotting

Inicialmente, as amostras de células foram homogeneizadas em tampão Ripa contendo Tris (50 mM pH 7,4) NaCl (150 mM) EDTA (1 mM), Triton X-100 (1%), deoxicolato de sódio (1%), solução de dodecil sulfato de sódio (SDS 1%) acrescido de inibidores de proteases (aprotinina, 5 μ g/mL; leupeptina 1 mg/mL, fluoreto de fenilmetilsufonil PMSF, 2 mM) e inibidores de fosfatase (ortovanadato de sódio, 100 mM; pirofosfato de sódio, 100 mM, fluoreto de sódio, 10 mM). As amostras foram sonicadas, vortexadas e mantidas no gelo por 30 min. Em seguida foram centrifugadas a 15000 g, 4 °C por 20 minutos. Uma alíquota do sobrenadante contendo o lisado de células foi utilizada para determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Para a determinação do conteúdo de proteínas por western blotting os sobrenadantes das amostras foram ressuspensos em tampão de amostra Laemmli (4:1) contendo SDS (4%), Tris-HCl (125 mM), glicerol (20%), DTT (100 mM) e azul de bromofenol (2%, pH 6,8). As proteínas foram fracionadas por SDS-PAGE. A eletroforese em gel SDS-PAGE foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli et al. (1970). As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e volumes contendo 30 μ g de proteína foram

aplicadas em um sistema mini-gel vertical (Protean III Cell Biorad®) de acrilamida: bisacrilamida com 1mm de espessura e gel de separação de 10 % de acordo com a proteína analisada. Foi utilizado marcador de peso molecular (Biorad® All Blue e Dual Color) contendo marcações de 10 a 250 kDa. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas de acrílico utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 115 mM, SDS 0,1%, mantido a 4 °C) sob potencial entre 80 à 120 volts, durante 2 horas. Após corrida eletroforética, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de PVDF (GE *Healthcare*), de acordo com o método descrito por Towbin et al. (1979) utilizando tampão de transferência (Tris-HCl 24,8 mM, glicina 192 mM) potencial de 25 V e corrente de 300 mA em equipamento Biorad® Trans-Blot SD Cell, EUA. A membrana foi bloqueada a temperatura ambiente por 1 hora em tampão TBS-T (Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,16 M e Tween-20 0,1%, pH 7,4) contendo leite desnatado em pó (10%) ou BSA (3%) e incubada overnight (4-8°C) com anticorpos primários diluídos previamente, CS (Abcam 96600), Akt-total (Cell Signaling #9272) e Akt-fosforilada (Cell Signaling S473) e β actina (Santa Cruz 81178). A seguir, a membrana foi lavada por 5 minutos com TBST e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase em solução TBST contendo leite (2%) ou BSA (2%) por 1 hora. Em seguida foram realizadas três lavagens de 5 minutos com TBST. Após as lavagens a membrana foi incubada por um minuto com reagente para detecção de western blotting Amersham ECL (GE *Healthcare*). Os resultados foram analisados por quimiluminescência.

4.7 Determinação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

As células foram mantidas a 37°C em solução Krebs Ringer (0,6 mL) e carregadas com a sonda Amplex Ultra-red (2 µM) e *Horseradish peroxidase* (0,3 U/mL) por 60-90 min. Ponto inicial foi coletado para realizar a taxa de produção por minuto (100 µL), bem como a leitura do meio na presença de Amplex Ultra-red e *Horseradish peroxidase* sem células, como branco. Nesse período as células foram incubadas com glicose (25 mM). Após este período uma alíquota do meio (100 µL) foi coletada e a intensidade de fluorescência determinada em 530 nm de excitação e 590 nm de emissão (ANDERSON et al., 2009). Como experimento de calibração, foi realizado curva crescente de concentrações conhecidas do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e como controle experimental foi adicionado a enzima antioxidante glutathione peroxidase (5 U/ mL) com seu substrato glutathione reduzida (0,5 mM) para o maior valor da concentração do peróxido de hidrogênio.

4.8 Avaliação dos níveis de Glutathione reduzida e oxidada (GSH/GSSG)

Células musculares diferenciadas e aderidas em placa de seis poços foram lavadas com PBS à 4-8 °C e coletadas (100 µL) em tampão Ripa contendo Tris (50 mM pH 7,4) NaCl (150 mM) EDTA (1 mM), Triton X-100 (1%), deoxicolato de sódio (1%), solução de dodecil sulfato de sódio (SDS 1%). Seguido de centrifugação 3000 rcf à 4°C durante 15 min, o sobrenadante foi coletado para realizar a quantificação de proteínas totais. Preparo para leitura de GSH: 200 µg de proteína foi adicionado em 550 µL de tampão fosfato de sódio (100 mM); EGTA (6 mM), 30 µL de O-phthaldeído (1 mg/ mL), após 15 minutos foi realizada leitura. Preparo para leitura GSSG: 200 µg de proteína foi adicionado em 50 µL de N-etil Maleimide (2 mM), após 30 minutos foi

adicionado 500 μ L NaOH (1M) e 30 μ L de O-phthaldeído (1 mg/ mL), após 15 minutos foi realizada leitura foi realizada em Fluorímetro BioTek Synerg2: Excitação 360/40 nm e emissão 460/40 nm.

4.9 Quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR)

Os cDNAs obtidos foram submetidos a PCR em tempo real. A expressão do genes da proteína desacopladora mitocondrial (UCP-3 e UCP-2), nucleotídeo nicotinamida transferase (NNT), adenina nucleotídeo translocase (ANT), coativador do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1- α) foram quantificados por PCR em tempo real. As reações foram realizadas em solução (25 μ L), contendo cDNA da amostra (1 μ L), água DEPC (10,5 μ L), mix SYBR[®] *Green* PCR Master (12,5 μ L), (dNTP, tampão de reação, Taq DNA polimerase e SYBR *Green* I) (Invitrogen[®]) com sequência de *primers* específicos (0,5 μ L): UCP-3 (sense ATCCTCCTCGGCCCTGTTG e anti sense TCGGAGCAGGACACAGGGCA); UCP-2 (AGCATGGTAAGGGCACAGTG e anti sense CAGTTCTACACCAAGGGCTC); NNT (sense CTCTGGTGCAATCCTGTTCGT e anti sense CACCAGCTGTTGACGTTGTG); ANT (sense CCACCCAGGCTCTCAACTTT anti sense CTGGGTCCTCTTGTCCACAC); PGC1- α (sense CACATTAAGGTTTCGCTCAATAGTC e anti sense CAAGCCAAACCAACAACCTTTATCTCT). As condições do PCR foram previamente estabelecidas para o gene de interesse.

4.10 Reação de transcrição reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total (2 µg) com a seguinte mistura de reagentes: 146 ng de random primers e 200 U da enzima transcriptase reversa, tampão da enzima (Tris-HCl a 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 8,0), DTT (5 mM), dNTP (500 µM) no volume final de reação de 20 µl. Esta mistura foi incubada por 2 min a 25°C para permitir a hibridização dos oligonucleotídeos randômicos ao RNA seguida de aquecimento a 42 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C para posterior realização da reação de polimerização em cadeia (PCR) em tempo real.

4.11 Consumo de oxigênio

As células foram mantidas em placas de Petri para cultura (100 mm de diâmetro) durante período de crescimento e diferenciação conforme protocolo descrito anteriormente. Após o tratamento com ácido palmítico (500 μ M), as células de músculo esquelético C2C12 foram retiradas de cultura com auxílio de tripsina (0,25 %) e centrifugadas a 700 rcf, 25°C, por 5 minutos. Em seguida as células foram homogeneizadas em 5 mL de Krebs Ringer (NaCl 119 mM, KCl 4,8 mM, KH_2PO_4 1,25 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM, NaHCO_3 50 mM) contendo glicose 25 mM e HEPES 10 mM, pH 7,4, seguido da contagem de células foi realizada em câmara de *Neubauer* após a diluição da suspensão celular em trypan blue (0,4%) solubilizado em PBS pH 7,4, utilizando normalização com número de células viáveis. Para realização do consumo de oxigênio celular, foi utilizado densidade celular de 1×10^6 / mL na câmara do oxígrafo de alta resolução (Oroboros Oxygraph-2K). Após aquisição da leitura inicial, a câmara do Oroboros foi fechada e o consumo de oxigênio (fluxo de oxigênio) monitorado, seguido da adição de oligomicina (1 μ g/ mL) para obtenção do consumo mínimo de oxigênio, indicando vazamento de prótons pela membrana interna mitocondrial. Como indutor da respiração mitocondrial, foi utilizado titulações do desacoplador químico CCCP (250 nM). Para obtenção dos dados o software DatLab 4 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) foi utilizado.

O experimento para monitorar o consumo de oxigênio celular foi representado pelo traçado experimental abaixo na figura 2. O traçado ilustra o momento de fechamento da câmara do Oroboros e mensuração do fluxo de oxigênio das células, seguido da adição de oligomicina e titulação de CCCP.

Figura 1 – Consumo de oxigênio de células de músculo esquelético. Células controle foram resuspendidas e adicionadas a câmara do Oroboros contendo Krebs Ringer com HEPES 10 mM e glicose 20 mM, pH 7,4. Após remoção das bolhas e estabilidade no sinal, a câmara foi fechada para monitorar consumo de oxigênio celular. Como controle interno experimental foi utilizado oligomicina (1µg/ mL) e CCCP (250 nM).

4.12 Avaliação do acoplamento termodinâmico mitocondrial.

Para análise do acoplamento termodinâmico mitocondrial de células C2C12, foram utilizados os valores de consumo de oxigênio obtido em experimentos independentes no Oroboros. Valores de fluxo de oxigênio celular monitorado para o momento estado respiratório IV, na presença de oligomicina e no estado respiratório na presença de desacoplador químico CCCP ou FCCP, induzindo o aumento do consumo de oxigênio. A equação aplicada para obter os valores de acoplamento termodinâmico é ilustrada na figura 2. Adequado de Cairns et al, (1998); Lamasters et al, (1984).

$$q = \sqrt{1 - (R. \text{Oligomicina} / R. \text{FCCP})}$$

Figura 2 – Equação para obtenção do acoplamento termodinâmico (valor-q). Na equação q denota valor do acoplamento termodinâmico, o qual, é calculado através da raiz quadrada de 1 menos o valor de respiração na presença de oligomicina dividido pela respiração máxima induzida por FCCP ou CCCP.

4.13 Determinação do potencial de membrana mitocondrial em cultura primária.

As células diferenciadas em cultura foram coletadas com tripsina (0,25%) e centrifugadas 900 rcf durante 3 minutos em temperatura ambiente, *pellet* foi lavado e homogeneizado em tampão de reação padrão: sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 0,2 mM, H_2PO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM, e suportado com succinato 5 mM, pH 7.2, contendo suplementação de albumina de soro bovino 0,1 %.

Células de músculo esquelético permeabilizadas: Células musculares foram extraídas da cultura com auxílio de tripsina (0,25%), seguido de centrifugação (900 rcf) durante 3 minutos em temperatura ambiente e homogeneização em tampão de reação padrão: sacarose 250 mM, HEPES 10 mM, EGTA 200 mM, H_2PO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM, e suportado com succinato 5 mM, pH 7.2, contendo suplementação de albumina de soro bovino 0,1 %, com adição de 21 μL de digitonina (1 mg/ mL) à 30 °C em agitação constante durante 20 minutos, seguido de centrifugação (900 rcf) durante 3 minutos em temperatura ambiente, o *pellet* foi homogeneizado e lavado com meio de reação padrão para remoção de contaminantes de potássio.

Fluorescência de safranina: Safranina (5 μM) foi adicionado a cubeta contendo 1,8 mL do tampão de reação padrão, após curto trecho de fluorescência inicial da safranina, células permeabilizadas foram adicionadas (200 μL) e o decaimento da fluorescência de safranina foi monitorado até estabelecer ponto de platô, em seguida, ADP de sódio (400 μM) foi adicionado estimulando a respiração mitocondrial e consequente redução no potencial de membrana mitocondrial, podendo ser observado com o aumento da fluorescência de safranina, após estabelecido fluorescência relativa estado respiratório III (com ADP), o carboxi atractilósideo (CAT) (10 μM) foi adicionado como inibidor de alta seletividade do sítio específico citosólico do

trocador de ADP/ATP mitocondrial, nucleotídeo adenina translocase (ANT). Assim, permitindo uma rápida redução na respiração mitocondrial e consequente retorno do potencial de membrana para maiores valores. Para avaliação quantitativa do potencial de membrana mitocondrial, foi realizado titulação com KCl. Assim sendo, após estabelecer platô de fluorescência referente ao CAT, valinomicina (40 ng/ mL) foi adicionada para carrear a entrada de potássio para matrix mitocondrial, reduzindo o potencial elétrico e concomitante ao aumento da fluorescência de safranina, para isto, foram realizadas adições de KCl (0,375mM), ao final da titulação CCCP (2 μ M) foi adicionado para dissipar o potencial de membrana mitocondrial. A curva de calibração obtida com a titulação de potássio foi tratada para obter valores de potencial de membrana mitocondrial de acordo com equação de Nerst: $\Delta\psi_m = 60 \times \log(K_{IN}^+/K_{OUT}^+)$, onde K_{IN}^+ é a concentração de potássio intramitocondrial e K_{OUT}^+ é relativa a soma das adições de potássio em cada etapa. K_{IN}^+ foi assumido sendo 120 mM. Desde modo, curva de calibração foi plotada com os momentos de platô da fluorescência de safranina (referente adição de potássio) sobre valores relativos do potencial de membrana para as adições conhecidas de potássio. Equação polinomial de segundo grau foi aplicada para obter o gráfico invertido em valores quantificados em potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (FIGUEIRA, et al. 2012)

A imagem abaixo ilustra o traçado experimental realizado com o monitoramento da fluorescência de safranina. De acordo com o método, é possível observar o decaimento da fluorescência de safranina com adição das células, mostrando existencia de potencial de membrana mitocondrial, este é modulado através da adição de ADP, o qual estimula o consumo de oxigênio mitocondrial, assim reduzindo o potencial de membrana mitocondrial e imediata liberação da safranina para o meio, aumento sua fluorescente. Após adição de CAT podemos observar o retorno do potencial de membrana para maiores valores, indicado com a redução da fluorescência. Em seguida, notamos que a titulação de KCl (K^+) foi efetiva com a liberação da

safranina devido a redução do potencial de membrana mitocondrial com a possibilidade da entrada do potássio carregado pela valinomicina até a matriz mitocondrial, ao final do experimento FCCP foi adicionado, induzindo a dissipação do potencial de membrana mitocondrial, liberando safranina e retorno da fluorescência.

Figura 3 – Potencial de membrana mitocondrial de células de músculo esquelético.

Células controle foram adicionadas na cubeta contendo tampão de reação padrão pH 7,4, suplementado com BSA 0,1%. Após estabelecer platô referente ao estado respiratório II, ADP (400 μ M) e CAT (10 μ M) foram adicionados como controle interno para capacidade oxidativa mitocondrial e permeabilização celular. Valinomicina (40 μ M) e adições de KCl (0,375 mM) foram realizadas para calibração experimental. CCCP (2 μ M) foi utilizado ao final para dissipar o potencial de membrana mitocondrial. UA: Unidade arbitrária.

4.14 Potencial de membrana mitocondrial em células C2C12 (TMRM)

As células diferenciadas em cultura foram extraídas com tripsina (0,25%) e centrifugadas 750 rcf durante 5 minutos em temperatura ambiente, em seguida, foram homogeneizadas em Krebs Ringer (NaCl 119 mM, KCl 4,8 mM, KH_2PO_4 , 1,25 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM, NaHCO_3 50 mM) contendo glicose 25 mM e HEPES 10 mM, pH 7,4, e posteriormente foi realizado contagem em câmara de *Neubauer* após a diluição da suspensão celular em trypan blue (0,4%).

Fluorescência de *Tetramethyrhodamine, methylester, perchlorate* (TMRM): TMRM (50 nM) foi adicionado na cubeta contendo 1,8 mL de meio Krebs Ringer com comprimento de onda de excitação 543 nm e emissão 585 nm, após monitoramento inicial da fluorescência basal inicial, foi adicionado 2×10^6 células C2C12 viáveis. Como controle interno experimental foi utilizado adição de oligomicina (2 $\mu\text{g/mL}$) e FCCP (2 μM), como moduladores da cadeia respiratória mitocondrial (figura 4) (GÖHRING et. al., 2014).

Figura 4 – Potencial de membrana mitocondrial de células de músculo esquelético (C2C12).

Células controle foram adicionadas na cubeta contendo Krebs Ringer pH 7,4. Após estabelecer platô referente ao estado respiratório basal, Oligomicina (2 $\mu\text{g/mL}$) e FCCP (2 μM) foram adicionados como controle interno evidenciando manipulação do potencial de membrana mitocondrial.

Normalização dos valores de fluorescência bruta de TMRM: Em vista de criar uma normalização dos valores de fluorescência bruta, utilizamos a média do valor platô de FCCP (potencial de membrana dissipado) dividido por todos os valores de fluorescência bruta de TMRM, originando o gráfico Fluorescência FCCP sobre Fluorescência (Figura 5)

Potencial de membrana mitocondrial no estado de respiração basal: Foi criado um índice para visualização dos valores de fluorescência referente ao estado basal (antes da adição de oligomicina) de todos os traçados. O valor de fluorescência do platô com FCCP é subtraído do valor basal, sobre o valor de fluorescência FCCP. $\Delta\Psi_m \text{ basal} = (F. \text{ FCCP} - F. \text{ Basal}) / F. \text{ FCCP}$. Ver figura 4. Esta equação demonstra a amplitude da diferença entre o valor do potencial de membrana com o estado respiratório celular basal e valor o mínimo induzido pela despolarização com FCCP. Entende-se que, quanto menor for este valor, menor será o potencial de membrana mitocondrial neste estado.

Potencial de membrana mitocondrial no estado de respiração com oligomicina: Foi criado um índice para visualização dos valores de fluorescência referente ao estado respiratório na presença de oligomicina, de todos os traçados. O valor de fluorescência do platô com FCCP é subtraído do valor basal, sobre o valor de fluorescência FCCP. $\Delta\Psi_m \text{ com oligomicina} = (F. \text{ FCCP} - F. \text{ Oligomicina}) / F. \text{ FCCP}$. Ver figura 4. Esta equação demonstra a amplitude da diferença entre o valor do potencial de membrana máximo induzido por adição de oligomicina e valor o mínimo induzido pela despolarização com FCCP. Entende-se que, quanto menor for este valor, menor será o potencial de membrana mitocondrial neste estado.

Figura 5 – Potencial de membrana mitocondrial, regiões de referência para platô.

Após adição das células controle o valor de platô foi adquirido nos pontos indicados para: Basal (F.), Oligomicina (F. Oligomicina) e FCCP (F. FCCP).

4.15 Viabilidade celular.

As células foram removidas da placa de cultura com auxílio da tripsina (0,25 %), seguido de centrifugação 700 rcf à temperatura ambiente (25 °C), células foram homogeneizadas em Krebs Ringer Ringer (NaCl 119 mM, KCl 4,8 mM, KH_2PO_4 1,25 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM, NaHCO_3 50 mM) contendo glicose 25 mM e HEPES 10 mM, pH 7,4 (5 mL) e uma alíquota (10 μL) foi retirada para contagem de células totais e viáveis com o tratamento prévio com *Trypan blue* (0,4 %) (1:4) em câmara de Neubauer (BARBOSA et. al., 2013).

4.16 Microscopia eletrônica de mitocôndria

Foi realizado aquisições de imagens de mitocôndrias da célula do músculo esquelético (cultura primária) em microscópio eletrônico.

4.17 Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados pelo teste one-way/two-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Kruskal-Wallis (KRUSKAL & WALLIS, 1952). O teste t de *student* foi utilizado para comparação de duas médias, usando o programa Prisma 6.0. $P \leq 0.05$ foi considerado significativo.

4.18 Determinação da captação de glicose

Após período *overnight* em meio livre de soro, as células de cultura primária de músculo esquelético foram incubadas à 37 °C em tampão HBS contendo 2-deoxi-glicose (10 μ M) e 2-deoxi-[2,6³H]-glicose (0,05 μ Ci/mL) na presença ou ausência de insulina (30 mU/mL). Após 60 minutos as células foram lavadas com solução salina (0,9 %) gelada e lisadas com NaOH (0,05 N). A análise foi realizada em analisador de líquido de scintilação Tri-Carb 2100TR (Packad) (BARBOSA, et al. 2013; TEODORO, et al. 2014)

5 RESULTADOS

5.1 Medida do potencial de membrana mitocondrial: Cultura primária de células musculares.

O potencial de membrana mitocondrial foi medido com a interação entre safranina e potencial eletroquímico existe na mitocôndria. Ao adicionar as células a fluorescência é reduzida próximo a estabilidade, posteriormente ADP e oligomicina foram adicionados como moduladores da respiração e potencial de membrana mitocondrial (Figura 6). Após adicionar KCl foram realizados cálculos (Figura 7) para calibrar a fluorescência e equivalência em $\Delta\psi_m$ (-mV), demonstrado na figura 8.

As células do músculo esquelético expostas ao ácido palmítico (600 μ M) exibiram um menor potencial de membrana no estado respiratório IV (adição de oligomicina) quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), indicando um possível vazamento de prótons pela membrana interna mitocondrial (*proton leak*). Porém, não houve alteração no potencial de membrana mitocondrial no estado respiratório III (adição de ADP), conforme observado na figura 9.

Figura 6 – Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de células de músculo esquelético permeabilizadas (cultura primária). Traçado experimental representativo da fluorescência de Safranina. Após adição da Safranina (5 μ M), células de músculo esquelético controle e/ou tratadas durante 24 horas com ácido palmítico (600 μ M) conjugado com BSA (1%) foram adicionadas, seguido de ADP (400 μ M) e carboxi atractilósido (10 μ M), o potencial de membrana foi titulado com KCl (0,375 mM) na presença de Valinomicina (40 ng/mL), e ao final da titulação o CCCP (2 μ M) foi adicionado. n=5 experimentos.

Figura 7 – Curva de calibração para aquisição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Equação representativa para aplicação da equação polinomial de segundo grau nos dados de potencial de membrana mitocondrial derivados da equação de *Nerst* sobre os valores de fluorescência relativo a adição de KCl (0,375 mM).

Potencial de membrana mitocondrial

Figura 8 – Quantificação do potencial de membrana mitocondrial de células musculares permeabilizadas (cultura primária): O painel (a), mostra o traçado representativo da quantificação do potencial de membrana mitocondrial de células controles e tratadas durante 24 horas com palmitato (600 μ M) conjugado com albumina de soro bovino (1%). O painel inferior (B), mostra a aproximação ou *Zoom* do traçado no painel, evidenciando o efeito das adições de ADP (400 μ M) e carboxi atractilósideo (CAT) (10 μ M), e início das adições de KCl (0,375 mM) na presença de valinomicina (40 ng/mL). As células musculares tratadas com palmitato (linha vermelha) na presença de oligomicina apresentaram menor valor de potencial de membrana mitocondrial quando comparado ao controle (linha preta). N=5 experimentos independentes.

Figura 9 – Quantificação do potencial de membrana mitocondrial. Os valores são média e desvio padrão dos valores de potencial de membrana adquiridos no estado respiratório III (ADP 400 μM) e IV (carboxi atractilósídeo 2 μM). N= 5 experimentos.

5. 2 Potencial de membrana mitocondrial: Cultura C2C12.

O potencial de membrana mitocondrial de células C2C12 foi mensurado com TMRM com células intactas. Após adição das células em meio Krebs contendo TMRM e subsequente decaimento do sinal ao nível estável, foi adicionado oligomincina e FCCP, conhecidos moduladores da respiração e potencial de membrana mitocondrial. Deste modo, podemos observar o potencial de membrana basal, na presença de oligomicina (induz aumento de pontecial de membrana) e FCCP (reduz o potencial de membrana). Embora exista uma aparente diferença do potencial de membrana mitocondrial no estado basal, não houve diferença estatística (B). Entretanto, na presença de oligomicina o potencial de membrana do grupo palmitato foi significativamente menor (C), corroborando com dados em cultura primária.

Figura 10 – Potencial de membrana mitocondrial em células C2C12. Células C2C12 controles e expostas ao palmitato durante 2, 24 e 48 horas foram retiradas de cultura com tripsina (0,25 %) e homogeneizadas em Krebs-Ringer pH 7,4 com glicose (25 mM) na presença de TMRM (50nM), Oligomicina (2 μ g/mL) e FCCP (2 μ M). FCCP e Oligomicina foram utilizados como moduladores da respiração mitocondrial. (A): Traçado de fluorescência bruta normalizada por fluorescência platô de FCCP, representativo experimental (48 horas). (B): representa gráfico normalizado do valor bruto de fluorescência obtido e aplicado a equação para obtenção do potencial de membrana mitocondrial no estado basal: $\Delta\Psi_m \text{ basal} = (F_{\text{fluorescência com FCCP}} - F_{\text{fluorescência Basal}}) / F_{\text{fluorescência FCCP}}$. (C) representa gráfico normalizado do valor bruto de fluorescência obtido e aplicado a equação para obtenção do potencial de membrana mitocondrial na presença de oligomycin: $\Delta\Psi_m \text{ na presença de oligomycin} = (F_{\text{fluorescência FCCP}} - F_{\text{fluorescência Oligomycin}}) / F_{\text{fluorescência FCCP}}$.

5. 3 Conteúdo e viabilidade celular: C2C12.

As células musculares foram previamente tratadas com meio controle e palmitato nos tempos 2, 24 e 48 horas. Em seguida a contagem de células totais e viáveis foi realizado em câmara de Neubauer na presença de *Trypan blue*. Os dados indicam que embora não houve diferença no número de células viáveis, o conteúdo de células totais foi reduzido com o tratamento de palmitato durante exposição de 48 horas. Deste modo, sugerindo que células mortas podem ter desprendido da placa de cultura para o meio, durante o processo de extração celular as células aderidas foram analisadas, indicando que o tratamento no tempo de 48 horas pode levar a morte celular.

Figura 11 – Conteúdo de células totais em cultura. Células C2C12 controles e expostas ao palmitato durante 2, 24 e 48 horas foram retiradas de cultura com tripsina (0,25 %) e homogeneizadas em Krebs-Ringer pH 7,4 com glicose (25 mM) na presença de *Trypan blue* (0,4 %) 1:4, em seguida a contagem foi realizada em câmara de Neubauer. * denota diferença entre controle e palmitato (48 horas) $p < 0,05$.

Figura 12 – Viabilidade celular. Células C2C12 controles e expostas ao palmitato (0,5 mM) conjugado com albumina (1 %) durante 2, 24 e 48 horas foram retiradas de cultura com tripsina (0,25 %) e homogeneizadas em Krebs-Ringer pH 7,4 com glicose (25 mM) na presença de *Trypan blue* (0,4 %) 1:4, em seguida a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

5. 4 Determinação do consumo de oxigênio de células do músculo esquelético (C2C12).

Consumo de oxigênio das células foi determinado em Oroboros. Após estabilização do sinal e fechamento da câmara contendo tampão Krebs e células C2C12 e obtenção dos valores para trabalho no estado basal e com a presença de oligomicina e CCCP, conhecidos moduladores da respiração mitocondrial. Podemos observar que não houve diferença de consumo de oxigênio no estado basal para ambos os tempos. Entretanto, as células tratadas com palmitato apresentaram maiores valores na presença de oligomicina em todos os tempos, interessante células tratadas com palmitato apresentaram menores valores de consumo de oxigênio induzido por CCCP nos tempos 24 e 48 horas (Figura 13-14).

Figura 13 – Consumo de oxigênio em células musculares C2C12. O consumo de oxigênio foi realizado em meio Krebs Ringer contendo glicose (25 mM) e HEPES (10 mM), à 37°C sob agitação constante. As células foram adicionadas e após estabilização do sinal o consumo de oxigênio basal foi monitorado. Oligomicina (1 µg/mL) e CCCP (500 nM) foram utilizados como moduladores da respiração. Linhas pontilhadas: concentração de oxigênio e linhas cheias: fluxo de oxigênio.

Figura 14 - Consumo de oxigênio em células C2C12 controles e tratadas com palmitato durante 2, 24 e 48 horas. O consumo de oxigênio foi realizado em meio Krebs Ringer com glicose (25 mM) e HEPES (10 mM), à 37°C sob agitação constante. As células foram adicionadas e após estabilização do sinal o consumo de oxigênio basal foi adquirido. Em seguida, oligomicina (1 µg/ mL) e CCCP (500 nM) foram utilizados como moduladores da respiração. * p<0,05 comparado com grupo controle dentro do grupo oligomicina (n= 4).

5. 5 Acoplamento termodinâmico: C2C12.

O acoplamento termodinâmico mitocondrial de células musculares C2C12 foi realizado através dos valores de consumo de oxigênio mitocondrial de células intactas realizado no Oroboros, em Krebs Ringer pH 7,4 contendo glicose 25 mM. Adições de oligomicina e CCCP foram utilizadas para modular a respiração mitocondrial. Aplicando a equação onde leva-se em consideração o estado respiratório IV e estado respiratório na presença de desacoplador químico (valor-q) demonstramos que célula expostas ao palmitato (2, 24 e 48 horas) apresentam um menor acoplamento termodinâmico mitocondrial comparado aos respectivos controles. Interessantemente o grupo 48 horas de tratamento apresentou um menor acoplamento termodinâmico comparado ou grupo palmitato 2 horas, indicando redução da eficiência mitocondrial ao passo do tempo de tratamento.

Figura 15 – Acoplamento termodinâmico mitocondrial em células C2C12. Células C2C12 controle e expostas ao palmitato (0,5 mM) conjugado com albumina (1 %) durante 2, 24 e 48 horas. Valor-q foi calculado com raiz de 1 menos o resultado da respiração na presença de oligomicina sobre respiração com CCCP (página 36). * denota diferença quando comparado com o controle $p < 0,05$. # denota diferença quando comparado com grupo palmitato 2 horas $p < 0,05$.

5.6 Avaliação da resposta à insulina:

A sensibilidade à insulina foi avaliada através da fosforilação de Akt (proteína quinase B). Podemos observar na Figura 9 que o tratamento com palmitato reduziu a fosforilação da proteína Akt em células primárias de ratos (24 horas) e em células da linhagem C2C12 de camundongos (2, 24 e 48 horas) (Figura 10).

Figura 16 - Conteúdo de Akt fosforilada em cultura de células primárias de músculo esquelético. Foram avaliados os grupos: controle e células tratadas com palmitato (600 μ M) conjugado com albumina do soro bovino (1%) durante 24 horas. Insulina foi adicionada (20.000 μ U/ mL) durante o período de 10 min. Como controle interno avaliamos o conteúdo de Akt total e β -actina, n=3 experimentos.

Figura 17 – Fosforilação de Akt em cultura de células C2C12. Foram avaliados os grupos: controle e células tratadas com palmitato (500 μM) conjugado com albumina do soro bovino (1%) durante 2, 24 e 48 horas. Insulina foi adicionada (20.000 μU/mL) durante 10 min. N=4 experimentos.

5.7 Conteúdo de glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG).

A figura 18, apresenta a razão do substrato e produto da enzima antioxidante glutathiona peroxidase, que foi normalizado pela concentração de proteínas totais das amostras de células musculares. Os resultados demonstram que células de músculo esquelético tratadas com palmitato possuem um menor conteúdo de GSH/GSSG indicando um possível aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular, deste modo, reduzindo o substrato GSH para conversão de peróxido de hidrogênio à água, sugerindo existência de aumento de EROs.

Figura 18 - Conteúdo de glutathiona reduzida e oxidada em cultura primária (A) e linhagem C2C12 (B). As células foram tratadas com DMEM contendo glicose (25 mM) na presença ou ausência de palmitato (600 μ M) conjugado à albumina de soro bovino (1%) durante 2 e 24 horas (A). Como controle experimental, foi utilizado células controles expostas ao peróxido de hidrogênio (100 μ M) durante 60 minutos. Em células C2C12 foi utilizado palmitato (500 μ M) nos tempos 2, 24 e 48 horas. * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao grupo palmitato. N=6.

5.8 Determinação da emissão de espécies reativas de oxigênio (H₂O₂).

As figuras 19 e 21, demonstram em dois experimentos independentes e diferentes tempos de leitura que as células C2C12 expostas ao palmitato (500 μ M) conjugado com albumina (1%), apresentaram maior emissão de peróxido de hidrogênio comparado ao controle nos tempos 24 e 48 horas.

Figura 19 – Curva temporal de fluorescência de Amplex ultra-red em células C2C12. Experimento foi realizado com a incubação de células musculares em cultura com meio Krebs Ringer contendo glicose (25mM), HEPES (10mM) e pH 7,4, na presença de *Amplex Ultra-red* (2 μ M) e *horseradish peroxidase* (0,3 U/mL), os valores de fluorescência foram monitorados a cada 5 minutos, para cada leitura foi descontado do branco (sem célula). Células controle representadas em linha preta e células tratadas com palmitato em linha vermelha.

Figura 20 – Curva padrão de peróxido de hidrogênio. Peróxido de hidrogênio diluído em concentrações conhecidas, foi adicionado em meio Krebs Ringer contendo glicose (25mM), HEPES (10mM) e pH 7,4, na presença de *Amplex Ultra-red* (2 μ M) e *horseradish peroxidase* (0,3 U/mL). Glutathione peroxidase (5 U/mL) e glutathione reduzida (0,5 mM) foram utilizadas como controle interno experimental.

Figura 21 – Emissão de peróxido de hidrogênio em células musculares. Células de músculo esquelético C2C12 foram plaqueadas (2×10^5) e após diferenciação, divididas entre: Controle e tratada com palmitato (500 μ M) conjugado com albumina (1%) foram incubadas com Krebs Ringer contendo glicose (25mM), HEPES (10 mM) e pH 7,4, na presença de *Amplex Ultra-red* (2 μ M) e *horseradish peroxidase* (0,3 U/mL), durante 90 minutos em incubadora de CO₂ à 37 °C. Tempo inicial foi coletado para exclusão do branco experimental (sem células) e tempo final para realizar a taxa de emissão. *p < 0,05 comparado ao controle (n = 3).

5.9 Determinação da captação de glicose em células de músculo esquelético.

Cultura de primária de células musculares foi incubada com tampão HBS contendo 2-deoxi-glicose (10 μ M) e 2-deoxi-[2,6³H]-glicose (0,05 μ Ci/mL) na presença ou ausência de insulina (30 mU/mL) durante 60 min. Após extração em Líquido de cintilação e contagem da radioatividade (Tri-Carb 2100TR), observamos que as células tratadas com palmitato (600 μ M) foram menos responsivas à insulina.

Figura 22 – Captação de glicose em cultura primária de células musculares. As células do músculo esquelético foram plaqueadas ($2,5 \times 10^5$) e após diferenciação celular divididas entre: Controle e tratadas com palmitato (0,7mM) conjugado com albumina (1%) durante 24 horas. Em seguida, células foram incubadas com tampão HBS contendo 2-deoxi-glicose (10 μ M) e 2-deoxi-[2,6³H]-glicose (0,05 μ Ci/ mL) na presença ou ausência de insulina (30 mU/ mL) à 37 °C durante 60 minutos. Em seguida, células musculares foram lizadas em NaOH (0,05 N) e as análises foram realizadas em no contador (Tri-Carb 2100TR). * $p < 0,05$ comparado ao controle, # $p < 0,05$ comparado ao palmitato. (N= 3).

5.10 Microscopia eletrônica de cultura primária.

A análise de microscopia eletrônica não mostrou a existência de diferenças no número de mitocôndrias entre o grupo controle e tratado com palmitato. Como controle interno, AICAR foi utilizado para indução de biogênese mitocondrial.

Figura 23 – Microscopia eletrônica de mitocôndrias. Células musculares em cultura foram levadas para análise de microscopia eletrônica. Como controle interno, AICAR (250 µM) foi utilizado como indutor de biogênese mitocondrial.

5.11 Transcrição gênica:

A figura 24 (A), mostra que em cultura primária muscular a expressão do gene PGC1- α no grupo tratado com palmitato não apresentou diferença comparado ao grupo controle. Porém, observamos aumento da expressão do PGC1- α após o tratamento com AICAR ($p < 0,05$). Além disso, a figura 24 (B) mostra que as células tratadas com palmitato apresentaram maior nível de expressão de RNAm de UCP-3, conhecida proteína desacopladora mitocondrial atuando na redução da produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais e no aumento da utilização de coenzimas reduzidas pelo aumento do fluxo de oxigênio.

Em células C2C12 a expressão de PGC1- α foi reduzido nos tempos 24 e 48 horas de tratamento com palmitato, em contra partida o gene TFAM mostra tendência em sua redução nos tempos 2 e 24 horas enquanto houve um aumento no tempo 48 horas. Em adição, o gene UCP-3 apresentou maior nível de expressão nos tempos 2 e 48 horas, juntamente a este dado, a expressão de NNT foi reduzida no tempo 48 horas (figura 25).

Figura 24 – Expressão relativa de RNAm. Células musculares foram tratadas com palmitato (600 μ M) ou AICAR (250 μ M) durante 24 horas. (A) expressão relativa de RNAm de PGC1- α . $p < 0,05$ comparado ao controle N= 5. (B) Expressão relativa de UCP-3. $p < 0,05$ comparado ao controle. N= 4.

Figura 25 – Expressão relativa de RNAm em C2C12. Células musculares foram tratadas com palmitato (500 μ M) na presença de albumina (1 %) durante 2, 24 e 48 horas. $p < 0,05$ comparado ao controle N= 6.

6 DISCUSSÃO

Embora o acúmulo de lipídeos intracelular e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) tenham sido considerados ao longo de mais de duas décadas como importantes determinantes da instalação da resistência à insulina no tecido muscular, o mecanismo responsável pela etiologia do diabetes tipo II ainda não é totalmente conhecido. Evidências recentes têm demonstrado a existência de uma forte correlação entre resistência à insulina, inatividade e elevado conteúdo de lipídios intracelulares (SAVAGE et al, 2007; SILVEIRA et al, 2008). Esse quadro tem sido mimetizado experimentalmente em animais submetidos a uma dieta rica em lipídios (HFD) (BREHM et al, 2006) ou em células isoladas expostas a altas concentrações de ácidos graxos (HIRABARA et al, 2007). Porém, foi demonstrado que atletas com elevada capacidade mitocondrial, igualmente aos indivíduos obesos e/ou diabéticos também apresentam elevado conteúdo intracelular de lipídios indicando que a atividade mitocondrial parece exercer um importante papel regulador nesse processo de instalação ou proteção do tecido muscular contra a instalação do quadro de resistência à insulina.

Boveris et al (1976) mostraram que a produção de ERO é regulada pelo potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), como demonstrado pela inibição da produção de H_2O_2 em mitocôndria isolada oxidando malato e succinato na presença de CCCP. De acordo com esses resultados, Liu (1997) mostrou que a adição de malonato, o qual leva a uma redução da taxa respiratória no estado 4, diminuiu a geração de ERO indicando que o $\Delta\psi$ está fortemente associado a produção de ERO mitocondrial.

De fato, a exposição de células musculares resistentes à insulina ao indutor de AMPK, AICAR, ou ao desacoplador mitocondrial (CCCP), compostos conhecidos por induzir aumento no consumo de oxigênio mitocondrial ou programa gênico mitocondrial, restaurou a captação de

glicose sugerindo que o aumento no potencial de membrana mitocondrial possa ser um importante mecanismo de indução da resistência à insulina no tecido muscular. Mais interessante, o exercício físico agudo em ratos obesos foi capaz de reverter o quadro de resistência à insulina (THYFAULT et al., 2007).

As observações acima, portanto, fortalecem nossa hipótese de que o aumento da disponibilidade de substratos para a mitocôndria resulta na elevação do potencial de membrana mitocondrial e favorecimento na produção de ERO. Estes resultados têm sido apoiados por outros estudos, nos quais, antioxidantes específicos protegem animais obesos da resistência à insulina induzida por dieta lipídica (ANDERSON et al., 2009).

Supreendentemente, nossos resultados de detecção do potencial de membrana mitocondrial mostram que células exposta a elevada disponibilidade de ácido palmítico apresentaram menores valores de potencial de membrana mitocondrial comparado ao controle. Visto isoladamente, porém, o valor de potencial de membrana pode ter um vago significado indicando apoptose e morte celular. Ao passo que, associado ao consumo de oxigênio o potencial de membrana pode ser um importante determinante do estado redox mitocondrial. Desse modo, avaliamos posteriormente a respiração celular e curiosamente observamos que as células expostas ao ácido palmítico apresentaram um maior respiração no estado respiratório IV induzido com oligomicina sugerindo um maior desacoplamento mitocondrial. Mais interessante, foram as observações de que a respiração basal foi idêntica quando comparamos células controles com as células tratadas com o ácido palmítico. Em outras palavras, nossos resultados indicam fortemente que pelo menos no tecido muscular, a exposição a elevada disponibilidade de nutrientes, favorece a ativação do desacoplamento mitocondrial. Talvez, como um mecanismo intrínseco de proteção dessas células contra o aumento na produção de EROs e consequentemente danos celulares. Huppertz et al (2001) observaram que a super expressão da proteína mitocondrial desacopladora

UCP-3, esperada para aumentar o consumo de oxigênio, aumentou o transporte de glicose em células musculares. Esse efeito foi associado à maior atividade da proteína da via de sinalização da insulina, PI3K, evidenciando melhora na resposta a insulina. Similarmente, Choi et. al (2007) mostram que animais superexpressando UCP-3 no tecido muscular foram protegidos da resistência à insulina induzida por dieta hiper-lipídica sugerindo que o aumento do desacoplamento mitocondrial no tecido muscular possa mesmo ser um importante alvo terapêutico contra o diabetes tipo II.

É importante ressaltarmos ainda que, valores de consumo de oxigênio na presença de oligomicina foi reduzido ao longo de um período de 48h (valores de respiração entre 2 e 48 horas) como indicado na figura 14. Podemos observar ainda que, esse efeito, foi refletido numa menor taxa de respiração máxima induzido por CCCP nos tempos de 24 e 48h indicando redução da capacidade oxidativa mitocondrial. Embora, as razões para esse fato ser desconhecido, o aumento na geração de H_2O_2 pode ter um importante papel nesse contexto. Nossos achados mostraram um aumento substancial na taxa de produção do H_2O_2 em células expostas ao ácido palmítico no período de 24 e 48h. Quando associado as análises do conteúdo intracelular de GSH/GSSG, nossos resultados foram sugestivos de uma real ocorrência de estresse oxidativo tipicamente caracterizado pelo desequilíbrio entre o aumento na produção do H_2O_2 e redução da razão GSH/GSSG (ANDERSON et al. 2009).

Em um elegante estudo, ST-PIERRE et al. (1997) demonstraram consistentemente em células neuronais uma forte relação entre conteúdo de PGC-1 α e sistema antioxidante. Após inibição da transcrição do PGC-1 α usando siRNA foi observado uma drástica redução na transcrição das proteínas SOD, catalase, glutathione peroxidase e UCP. Ao contrário, sob elevada expressão de PGC-1 α , foi observado aumento da expressão de proteínas do sistema antioxidante. Porém, em experimentos realizados em nosso laboratório, esse sincronismo aparente entre PGC-1

e capacidade oxidativa/sistema antioxidante foi substancialmente reduzido sob crônica e elevada disponibilidade de EROs, indicando que nessas condições o conteúdo de PGC1- α pode ser reduzido (BARBOSA et al 2013). Com base nos achados acima descrito, fica claro a importância da funcionalidade mitocondrial/PGC1 α sobre a regulação do sistema antioxidante indicando fortemente que uma ativação crônica dos mecanismos fisiológicos de desacoplamento mitocondrial pode não ser suficiente para contrabalancear os efeitos induzidos pelo aumento da geração de ERO, favorecendo uma redução da capacidade mitocondrial e consequentemente, uma menor produção de antioxidantes intracelulares.

Numa visão mais ampla, o controle do estado redox em sistemas biológicos mostra que a manutenção do estado redox intracelular funciona abaixo do “limiar de estresse oxidativo” sugerindo que este controle é crucial para a manutenção da homeostase intracelular (ANDERSON et al. 2009). Recentemente, observamos que a infusão de uma solução glicosilada via intraperitoneal em ratos Wistar reduziu substancialmente a razão GSH/GSSG no tecido muscular 2h após a infusão. Em adição, observamos ainda que, músculos sóleos de camundongos incubados na presença de insulina com glicose 5, 10 e 25 mM de glicose apresentaram menor razão GSH/GSSG comparado ao controle sem insulina (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que a sobrecarga nutricional é sempre acompanhada de aumento na produção de ERO e que a manutenção do equilíbrio redox pelo sistema antioxidante é de fundamental importância para homeostase intracelular. Portanto, a falha na manutenção dos níveis de antioxidantes intracelulares e/ou o excesso crônico de nutrientes podem ser decisivos no comprometimento da função mitocondrial e na instalação da resistência à insulina no tecido muscular.

Finalmente, nossos achados mostram claramente que o aumento da produção de ERO associado a redução na capacidade mitocondrial, foram decisivos para a diminuição nos níveis de fosforilação da proteína Akt, um importante regulador da sinalização na insulina no processo de

captação de glicose. Esse efeito, foi posteriormente refletido numa menor captação de glicose evidenciando que uma redução da capacidade de desacoplamento mitocondrial pode ser um importante indutor do desequilíbrio redox intracelular favorecendo o consumo de GSH e a instalação do quadro de resistência à insulina no tecido muscular esquelético. Surpreendentemente, embora observarmos redução na respiração celular máxima, o efeito da manifestação da resistência à insulina foi evidenciado sem nenhuma observação de redução da capacidade mitocondrial basal. Porém, a redução da capacidade intrínseca de desacoplamento indicado pela respiração no estado IV induzido por oligomicina associado ao aumento na geração de H_2O_2 sugere que cronicamente a manutenção do estado redox intracelular fica comprometida favorecendo uma menor ação da insulina.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que a exposição de células musculares a elevada disponibilidade de substratos incluindo o ácido palmítico e glicose, resultou em diminuição do potencial de membrana mitocondrial, em aumento da respiração na presença do inibidor da ATPsintase (Oligomicina) e da expressão do RNAm da proteína desacopladora mitocondrial UCP-3. Essas alterações, portanto, demonstram claramente a existência de um mecanismo de desacoplamento mitocondrial intrínseco em células do músculo esquelético ativado em situações de elevada oferta de nutrientes. Muito provavelmente, esse mecanismo pode estar associado ao controle da produção de ERO mitocondrial favorecendo o equilíbrio redox intracelular e a atividade da via da insulina mediada pela proteína Akt. Porém, nessas condições observamos redução do acoplamento e da eficiência termodinâmica mitocondrial. Interessantemente, essa capacidade intrínseca de desacoplamento foi perdida cronicamente como indicado pelos nossos resultados no período de 48h favorecendo uma menor atividade mitocondrial, aumento na produção de ERO e redução da razão GSH/GSSG. Entretanto, imagens de microscopia eletrônica e expressão gênica do PGC-1 α , um reconhecido gene regulador da biogênese mitocondrial, não demonstraram diferença entre controle e tratamento com palmitato. Concomitante a esses achados, exposição ao palmitato resultou na redução da fosforilação da proteína Akt, bem como, na captação de glicose estimulada por insulina. Nossos achados, portanto, sugerem que uma redução do acoplamento termodinâmico mitocondrial e do sistema antioxidante, juntamente com aumento da emissão do peróxido de hidrogênio, estão fortemente relacionados a redução da resposta a insulina em células do músculo esquelético. Deste modo, nosso estudo sugere um papel importante da mitocôndria na resposta a insulina.

8 REFERÊNCIAS

AKIRA, S; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, 124(4):783-801, Feb. 2006.

ANDERSON, E.J.; LUSTIG, M.E.; BOYLE, K.E.; WOODLIEF, T.L.; KANE, D.A.; LIN, C.T.; PRICE, J.W.; KANG, L.; RABINOVITCH, P.S.; SZETO, H.H.; HOUMARD, J.A.; CORTRIGHT, R.N.; WASSERMAN, D.H.; NEUFER, P.D. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **The Journal of clinical investigation**, 119:573–81, Mar. 2009.

BARBOSA, M.R.; SAMPAIO, I.H.; TEODORO, B.G.; SOUSA, T.A.; ZOPPI, C.C.; QUEIROZ, A.L.; PASSOS, M.A.; ALBERICI, L.C.; TEIXEIRA, F.R.; MANFIOLLI, A.O.; BATISTA, T.M.; CAPPELLI, A.P.; REIS, R.I.; FRASSON, D.; KETTELHUT, I.C.; PARREIRAS-E-SILVA, L.T.; COSTA-NETO, C.M.; CARNEIRO, E.M.; CURI, R.; SILVEIRA, L.R. Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin resistant muscle cells: effect of catalase overexpression. **Biochimica et biophysica acta (BBA) – Molecular Basis of Disease**, 1832(10):1591-604, Oct. 2013.

BRADFORD, M. A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**, 72:248-254, May. 1976.

BREHM A; KRSSAK M; SCHMID AI; NOWOTNY P; WALDHÄUSL W; RODEN M. Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. **Diabetes**, 55(1):136–140, Jan. 2006.

BODEN, G; SHE P; MOZZOLI M; CHEUNG P; GUMIREDDY K; REDDY P; XIANG X; LUO Z; RUDERMAN N. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the

proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. **Diabetes**, 54(12):3458-3465, Dec. 2005.

BOVERIS, A; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen, **Biochem. J.** 134: 707–716, 1973

CAIRNS, C. B.; WALTHER, J.; HARKEN, A. H; BANERJEE, A. Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiency reflect physiological organ. **American Physiological Society**, 274 (5):1376–83, Oct. 1998.

CHOI, C. S.; SAVAGE, D. B.; ABU-ELHEIGA, L.; LIU, Z. X.; KIM, S.; KULKARNI, A.; DISTEFANO, A.; HWANG, Y. J.; REZNICK, R. M.; CODELLA, R.; ZHANG, D.; CLINE, G. W.; WAKIL, S. J.; SHULMAN, G. I. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 104 (42):16480–5, Oct. 2007.

FIGUEIRA, T. R.; MELO, D; VERCESI, A. E., S.; CASTILH, R. F. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. **Methods in Molecular Biology**, 810:103-17, Oct. 2012.

GÖHRING, I.; SHAROYKO, V.V; MALMGREN, S.; ANDERSSON, L.E.; SPÉGEL, P.; NICHOLLS, D.G.; MULDER, H. Chronic high glucose pyruvate levels differentially affect mitochondrial bioenergetics and fuel-stimulated insulin secretion from clonal INS-1 832/13 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 289(6):3786-3798, Feb. 2014.

GILDE, A.J.; VAN BILSEN, M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, 178(4):425-34, Aug. 2003.

GRIFFIN, M.E.; MARCUCCI, M.J.; CLINE, G.W.; BELL, K.; BARUCCI, N.; LEE, D.; GOODYEAR, L.J.; KRAEGEN, E.W.; WHITE, M.F.; SHULMAN, G.I. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. **Diabetes**, 48:1270-1274, Jun. 1999.

HIRABARA, S.M.; CARVALHO, C.R.; MENDONCA, J.R.; PILTCHER, H.E.; FERNANDES, L.C.; CURI, R. Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism (Randle cycle). **FEBS Letters**, 541:109–114, Apr. 2003.

HIRABARA, S.M.; SILVEIRA, L.R.; ABDULKADER, F.; CARVALHO, C.R.; PROCOPIO, J.; CURI, R. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. **Journal of cellular physiology**, 210(1):7-15, Jan. 2007.

HOUSTIS, N.; ROSEN, E.D.; LANDER, E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, 440 (7086):944-8, Apr. 2006.

HOLLOSZY, J.O. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. **Journal Applied of Physiology**, 99(1):338-343, Jul. 2005.

HUPPERTZ, C.; FISCHER, B.M.; KIM, Y.B.; KOTANI, K.; VIDAL-PUIG, A.; SLIEKER, L.J.; SLOOP, K.W.; LOWELL, B.B.; KAHN, B.B. Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, 276(16): 12520-9, Apr. 2001

KELLEY, D. E.; SIMONEAU, J. A. Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **The Journal of clinical investigation**, 94(6): 2349–56, Dec. 1994.

KELLEY D.E; HE J; MENSHIKOVA E.V; RITOV V.B; Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, 52(10):2944–2950, Oct. 2002.

KOVES, T. R.; LI, P.; AN, J.; AKIMOTO, T.; SLENTZ, D.; ILKAYEVA, O.; DOHM, G.L.; YAN, Z.; NEWGARD, C.B.; MUOIO, D.M. Peroxisome Proliferator-activated Receptor-gamma Co-activator 1alpha-mediated Metabolic Remodeling of Skeletal Myocytes Mimics Exercise Training and Reverses Lipid-induced Mitochondrial Inefficiency. **The Journal of biological chemistry**, 280(39): 33588 – 33598, Sep. 2005.

KOVES, T.R.; USSHER, J.R.; NOLAND, R.C.; SLENTZ, D.; MOSEDALE, M.; ILKAYEVA, O.; BAIN, J.; STEVENS, R.; DYCK, J.R.; NEWGARD, C.B.; LOPASCHUK, G.D.; MUOIO, D.M. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. **Cell Metabolism**, 7(1): 45-56, Jan. 2008.

LAMASTERS, J. J., GRUNWALD, R., EMAUS, R. K. Thermodynamic limits to the ATP/site stoichiometries of oxidative phosphorylation by liver mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, 259 (5): 30586–63, mar. 1984.

LIN, J., HANDSCHIN, C. & SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metabolism**, 1: 361–370, Jun. 2005.

LIU, S.S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. **Bioscience Reports**, 17(3):259-72, Jun. 1997.

LOWELL, B. B.; SHULMAN, G. I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science**, 307(5708): 384–7, Jan. 2005.

LOH, K; DENG, H; FUKUSHIMA, A; CAI, X; BOIVIN, B; GALIC, S; BRUCE, C; SHIELDS, B.J; SKIBA, B; OOMS, L.M; STEPTO, N; WU, B; MITCHELL; C.A, TONKS, N.K; WATT, M.J; FEBBRAIO, M.A; CRACK, P.J; ANDRIKOPOULOS, S; TIGANIS, T. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. **Cell Metabolism**, 10(4):260-272, Oct. 2009.

LYNGE, J.; JUEL, C.; HELLSTEN, Y. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters. **The journal of Physiology**, 537 (Pt 2): 597-605, Dec. 2001.

MICHAEL, L.F.; Wu, Z.; Cheatham, R.B.; Puigserver, P.; Adelmant, G.; Lehman, J.J.; Kelly, D.P.; Spiegelman, B.M. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. **Proceedings of the National Academy Sciences of United States of American**, 98 (7):3820-3825, Mar. 2001

ORTENBLAD, N.; Mogensen, M.; Petersen, I; Højlund, K; Levin, K; Sahlin, K; Beck-Nielsen H; Gaster, M. Reduced insulin-mediated citrate synthase activity in cultured skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes: evidence for an intrinsic oxidative enzyme defect. **Biochim Biophys Acta** 1741(1-2):206-214, Jun. 2005.

PUIGSERVER, P; SPIEGELMAN, B.M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. **Endocrine reviews**, 24(1):78-90, Feb. 2003.

RANDLE, P.J.; GARLAND, P.B.; HALES, C.N.; NEWSHOLME, E.A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **The Lancet**, 13: 785-9, Apr. 1963.

REID, M.B; HAACK, K.E; FRANCKE, K.M; VALBERG, P.A; KOBZIK, L; WEST, M.S. Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. **Journal Applied of Physiology**, 73(5):1805–1809, Nov. 1992.

SAVAGE, D. B.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiological reviews**, 87 (2): 507–20, Apr. 2007.

SANDSTRÖM, M.E; ZHANG, S.J; BRUTON, J; SILVA, J.P; REID, M.B; WESTERBLAD, H; KATZ, A. Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, 575(1):251-262, Jun. 2006.

ST-PIERRE, J.; DRORI, S.; ULDRY, M.; SILVAGGI, JM.; RHEE, J.; JÄGER, S.; HANDSCHIN, C.; ZHENG, K.; LIN, J.; YANG, W.; SIMON, D.K.; BACHOO, R.; SPIEGELMAN, B.M. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell**,

SCHRAUWEN, P.; SARIS, W.H.; HESSELINK, M.K. An alternative function for human uncoupling protein 3: protection of mitochondria against accumulation of nonesterified fatty acids inside the mitochondrial matrix. **FASEB Journal**.15 (13): 2497-502, Nov. 2001.

TEODORO, B.G.; BARALDI, F.G.; SAMPAIO, I.H.; BOMFIM, L.H.M.; QUEIROZ, A.L.; PASSOS, M.A.; CARNEIRO, E.M.; ALBERICI, L.C.; GOMIS, R.; AMARAL, F.G.; NETO-CIPOLLA, J.; ARAÚJO, M.B.; LIMA, T.; UYEMURA, S.A.; SILVEIRA, L.R.; VIEIRA, E. Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. **Journal of pineal research**, 57 (2):155-67, Sep. 2014.

THYFAULT, J.P.; CREE, M.G.; ZHENG, D.; ZWETSLOOT, J.J.; TAPSCOTT, E.B.; KOVES, T.R.; ILKAYEVA, O.; WOLFE, R.R.; MUOIO, D.M.; DOHM, G.L. Contraction of insulin-resistant muscle normalizes insulin action in association with increased mitochondrial activity and fatty acid catabolism. **American journal of physiology. Cell physiology**, 292 (2):C729-39, Fev. 2007.

YU, C; CHEN, Y; CLINE G.W; ZHANG, D; ZONG, H; WANG, Y; BERGERON, R; KIM J.K; CUSHMAN, S.W; COONEY, G.J; ATCHESON, B; WHITE, M.F; KRAEGEN, E.W; SHULMAN, G.I. 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**, 277(52):50230–50236, Dec. 2002.

ANEXO I

Artigos publicados durante o período

18/07/2015

Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle. - PubMed - NCBI

PubMed

Abstract

Full text links

Full Text Online
Wiley Online Library

J. Pineal Res. 2014 Sep;57(2):155-67. doi: 10.1111/jpi.12157. Epub 2014 Jul 22.

Melatonin prevents mitochondrial dysfunction and insulin resistance in rat skeletal muscle.

Teodoro BG¹, Baraldi FG, Sampaio JH, Bomfim LH, Queiroz AL, Passos MA, Carneiro EM, Alberici LC, Gomis R, Amaral FG, Cipolla-Neto J, Araújo MB, Lima T, Akira Uemura S, Silveira LR, Vieira E.

Author information

Abstract

Melatonin has a number of beneficial metabolic actions and reduced levels of melatonin may contribute to type 2 diabetes. The present study investigated the metabolic pathways involved in the effects of melatonin on mitochondrial function and insulin resistance in rat skeletal muscle. The effect of melatonin was tested both in vitro in isolated rats skeletal muscle cells and in vivo using pinealectomized rats (PNX). Insulin resistance was induced in vitro by treating primary rat skeletal muscle cells with palmitic acid for 24 hr. Insulin-stimulated glucose uptake was reduced by palmitic acid followed by decreased phosphorylation of AKT which was prevented by melatonin. Palmitic acid reduced mitochondrial respiration, genes involved in mitochondrial biogenesis and the levels of tricarboxylic acid cycle intermediates whereas melatonin counteracted all these parameters in insulin-resistant cells. Melatonin treatment increases CAMKII and p-CREB but had no effect on p-AMPK. Silencing of CREB protein by siRNA reduced mitochondrial respiration mimicking the effect of palmitic acid and prevented melatonin-induced increase in p-AKT in palmitic acid-treated cells. PNX rats exhibited mild glucose intolerance, decreased energy expenditure and decreased p-AKT, mitochondrial respiration, and p-CREB and PGC-1 alpha levels in skeletal muscle which were restored by melatonin treatment in PNX rats. In summary, we showed that melatonin could prevent mitochondrial dysfunction and insulin resistance via activation of CREB-PGC-1 alpha pathway. Thus, the present work shows that melatonin play an important role in skeletal muscle mitochondrial function which could explain some of the beneficial effects of melatonin in insulin resistance states.

© 2014 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

KEYWORDS: diabetes; insulin resistance; melatonin; mitochondrial function; skeletal muscle

PMID: 24981026 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Publication Types, MeSH Terms, Substances

LinkOut - more resources

PubMed

Abstract

Full text links

 ELSEVIER
OPEN ACCESS

Biochim Biophys Acta. 2013 Oct;1832(10):1591-604. doi: 10.1016/j.bbadi.2013.04.029. Epub 2013 May 2.

Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin resistant muscle cells: effect of catalase overexpression.

Barbosa MR¹, Sampaio IH, Teodoro BG, Sousa TA, Zoppi CC, Queiroz AL, Passos MA, Alberici LC, Teixeira FR, Manfioli AO, Batista TM, Cappelli AP, Reis RI, Frasson D, Kettelhut IC, Parreiras-e-Silva LT, Costa-Neto CM, Carneiro EM, Curi R, Silveira LR.

Author information

Abstract

The mitochondrial redox state plays a central role in the link between mitochondrial overloading and insulin resistance. However, the mechanism by which the ROS induce insulin resistance in skeletal muscle cells is not completely understood. We examined the association between mitochondrial function and H₂O₂ production in insulin resistant cells. Our hypothesis is that the low mitochondrial oxygen consumption leads to elevated ROS production by a mechanism associated with reduced PGC1 α transcription and low content of phosphorylated CREB. The cells were transfected with either the encoded sequence for catalase overexpression or the specific siRNA for catalase inhibition. After transfection, myotubes were incubated with palmitic acid (500 μ M) and the insulin response, as well as mitochondrial function and fatty acid metabolism, was determined. The low mitochondrial oxygen consumption led to elevated ROS production by a mechanism associated with β -oxidation of fatty acids. Rotenone was observed to reduce the ratio of ROS production. The elevated H₂O₂ production markedly decreased the PGC1 α transcription, an effect that was accompanied by a reduced phosphorylation of Akt and CREB. The catalase transfection prevented the reduction in the phosphorylated level of Akt and upregulated the levels of phosphorylated CREB. The mitochondrial function was elevated and H₂O₂ production reduced, thus increasing the insulin sensitivity. The catalase overexpression improved mitochondrial respiration protecting the cells from fatty acid-induced, insulin resistance. This effect indicates that control of hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial respiration preventing the insulin resistance in skeletal muscle cells by a mechanism associated with CREB phosphorylation and β -oxidation of fatty acids.

Copyright © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

KEYWORDS: 5, 5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid); Akt; CAT; CREB; Catalase and muscle cells; CoQ; Cu,Zn-SOD; Cu,Zn-superoxide dismutase; DMEM; DTNB; Dulbecco's Modified Eagle's Medium; EGTA; ETF-QOR; FCCP; GAPDH; GPX; HCl; HRP; ICAT; Insulin resistance; KCl; KH(2)PO(4); MgCl(2); Mitochondria; Mn-SOD; Mn-superoxide dismutase; N-acetylcysteine; NAC; NaOH; PGC1 α ; PGM; PPAR β ; ROS; Small interfering RNA; UCP; cAMP response element-binding; catalase; ethylene glycol tetraacetic acid; glutathione peroxidase; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; horseradish peroxidase; hydrochloric acid; magnesium chloride; mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$); p-trifluoromethoxyphenylhydrazon; peroxisome proliferative activated receptor- β ; peroxisome proliferative activated receptor- γ (PPAR γ) co-activator 1 α ; potassium chloride; potassium phosphate; prime growth