

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E MOLECULARES NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE INDIVÍDUOS COM OBESIDADE MÓRBIDA E SUA RELAÇÃO
COM A RESISTÊNCIA À INSULINA**

Ana Rita Teixeira Silvestre

Mestrado em Biologia Molecular Humana

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS E MOLECULARES NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE INDIVÍDUOS COM OBESIDADE MÓRBIDA E SUA RELAÇÃO
COM A RESISTÊNCIA À INSULINA**

Tese orientada por:

Professora Doutora Helena Cortez-Pinto – Unidade de Nutrição e Metabolismo do Instituto
de Medicina Molecular

Professor Doutor João Arrabaça – Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de
Ciências da Universidade de Lisboa

Ana Rita Teixeira Silvestre

Mestrado em Biologia Molecular Humana

2009

“Truth in science can be defined as the working hypothesis best suited to open the way to the next better one.”

Konrad (Zacharias) Lorenz (1903-89) Austrian ethologist.

[Nobel prize for medicine, 1973]

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho de investigação não seria possível sem a ajuda preciosa de algumas pessoas e instituições.

Assim sendo, gostaria de agradecer especialmente à mentora deste projecto e minha orientadora externa, a Prof. Doutora Helena Cortez-Pinto, que se mostrou sempre disponível para me prestar todo o apoio necessário e discutir todos os aspectos do trabalho.

A ajuda do Prof. Doutor João Arrabaça, meu orientador interno, foi também bastante útil, principalmente pela contribuição que teve na minha ligação à Faculdade de Ciências.

Não posso deixar de fazer uma referência especial ao laboratório onde trabalho e desenvolvi grande parte da componente experimental deste projecto – o Laboratório de Neuropatologia, do Serviço de Neurologia, do Hospital de Santa Maria. Aí contei com o apoio de todos os meus colegas, e gostaria de salientar particularmente a ajuda prestada pela Dra. Teresinha Evangelista que, para além de ser uma pessoa chave na implementação deste projecto, me tem incentivado e ajudado permanentemente ao longo da sua concretização.

Por fim, gostaria também de agradecer à Unidade de Biologia Clínica do Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães, em particular às técnicas Raquel Santos e Cristina Pereira, pelo facto de me terem ensinado os métodos espectrofotométricos de doseamento enzimático da Cadeia Respiratória Mitocondrial, e pelo acompanhamento que me prestaram na sua realização e interpretação.

RESUMO

A obesidade mórbida é uma patologia que afecta cada vez mais pessoas em todo o mundo e constitui um factor de risco no desenvolvimento de patologias como a resistência à insulina (RI) e a diabetes tipo 2.

O músculo esquelético é um dos tecidos com maior capacidade metabólica e um dos principais alvos da acção da insulina. A tentativa de explicação da RI passa pela análise pormenorizada de diferentes aspectos da actividade muscular relacionados com o metabolismo da glucose e dos ácidos gordos, nomeadamente a função mitocondrial, a capacidade de oxidação celular e o processo de transporte de glucose.

Este projecto de investigação teve como objectivo principal identificar alterações histológicas e moleculares em biópsias musculares de doentes com obesidade mórbida, procurando explorar a sua interacção com factores predisponentes à RI, entre eles a idade dos pacientes, o índice de massa corporal e o HOMA-IR.

Estudaram-se 43 biópsias do músculo deltóide de indivíduos com obesidade mórbida e 34 de indivíduos normais. Avaliou-se o conteúdo de glicogénio e lipídios, alterações mitocondriais e morfometria das fibras musculares por técnicas histoquímicas e histoenzimáticas. Procedeu-se também à análise da actividade da enzima citrato sintetase e dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, por métodos espectrofotométricos.

Registou-se um aumento de EMCL e IMCL nos obesos, sem correlação com o IMC e HOMA-IR. Estes doentes apresentam também uma actividade mitocondrial alterada, manifestada pela presença de RRF e fibras COX negativas e diminuição do conteúdo mitocondrial. Não há diferenças estatísticas na proporção e dimensão das fibras tipo I e tipo II nos obesos, quando comparados com os controlos.

Pelos resultados obtidos parece difícil correlacionar isoladamente as alterações musculares com a RI. No futuro, será importante estabelecer uma evolução cronológica dos acontecimentos a nível muscular e analisar simultaneamente outros tecidos alvo da insulina, nomeadamente o fígado e o tecido adiposo.

Palavras-chave: Obesidade mórbida, Músculo esquelético, Resistência à insulina

ABSTRACT

Morbid obesity affects many people in whole world and constitutes a risk factor to the development of metabolic pathologies, such as insulin resistance and type 2 diabetes. Skeletal muscle is one of the tissues with greater metabolic capacity and one of the target organs of insulin action.

To explain the insulin resistance becomes important to analyze different aspects of muscular activity related to glucose and lipid metabolisms, as mitochondrial functions, cellular oxidation capacity and glucose transport.

The main aim of this study is to identify histological and molecular changes present in muscular biopsies of individuals with morbid obesity and to relate them with insulin resistance.

We studied 43 deltoid muscle biopsies of obese individuals and 34 biopsies of controls and evaluated lipid and glycogen content, mitochondrial dysfunction and the morphometry of muscle fibers by histochemistry and histoenzymatic techniques. We also determined the enzymatic activity of citrate syntase and respiratory chain reaction complexes, by spectrophotometric methods.

Obeses have more EMCL and IMCL than normal individuals, but without correlation with BMI or HOMA-IR. They also manifested mitochondrial dysfunction, determined by the presence of ragged-red fibers, COX negative fibers and a decrease of mitochondrial content. We didn't have statistical differences between type I and type II fibers proportion and dimension in obese patients when compared with controls.

These results demonstrate that is difficult to correlate insulin resistance only with muscular changes. In the future, it will be important to determine the chronological evolution of all the muscular alterations. We should study simultaneously other tissues involved in insulin action, such as liver and adipose tissue.

Keywords: Morbid obesity, Skeletal muscle, Insulin resistance

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	ix
Índice de Gráficos	x
Índice de Tabelas	xi
Acrónimos	xii
CAPÍTULO 1	1
1.1. Introdução	1
1.2. Objectivos do trabalho	1
1.3. Hipóteses formuladas	2
1.4. Obesidade: Definição e incidência	2
1.5. Lipotoxicidade	3
1.6. Alterações no Músculo Esqueléticos dos Obesos	3
1.6.1. Acumulação de lipídios intramusculares	4
1.6.2. Diminuição da actividade oxidativa muscular	5
1.6.3. Desenvolvimento da Resistência à Insulina	8
1.6.3.1. Alterações na via de sinalização da insulina	9
1.6.3.2. Alterações no sistema de transporte da glucose	11
CAPÍTULO 2: METODOLOGIA	12
2.1. Condições do estudo	12
2.2. Amostra	12
2.3. Biópsia muscular	12
2.4. Estudos histoquímico e histoenzimológico	13
2.4.1. Avaliação do conteúdo lipídico	13
2.4.2. Avaliação do conteúdo de glicogénio	13
2.4.3. Determinação das alterações mitocondriais	13
2.4.4. Morfometria das fibras musculares	13
2.5. Estudo da Cadeia Respiratória Mitocondrial	14
2.6. Análise estatística	14
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	15
3.1. Distribuição dos grupos em estudo, por sexo	15
3.2. Dados demográficos dos indivíduos em estudo	15
3.3. Análise do conteúdo lipídico	16
3.4. Análise do conteúdo de glicogénio	16
3.5. Análise das alterações mitocondriais	17
3.6. Análise da morfometria das fibras musculares	18
3.6.1. Proporção dos tipos de fibras musculares	18

3.6.2. Diâmetro dos tipos de fibras musculares	18
3.7. Estudo bioquímico da Cadeia Respiratória Mitocondrial	19
3.8. Correlações estatísticas	20
CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO	21
CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO	27
BIBLIOGRAFIA	28
ANEXOS	
ANEXO I: Dados demográficos dos Indivíduos Obesos	
ANEXO II: Resultados da análise morfométrica das fibras musculares de indivíduos normais e indivíduos obesos	
ANEXO III: Resultados da actividade da enzima Citrato Sintetase e dos Complexos I a IV da Cadeia Respiratória Mitocondrial dos Indivíduos Normais e Obesos	
ANEXO IV: Imagens microscópicas representativas dos achados histológicos avaliados em cada amostra	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação dos indivíduos de acordo com o Índice de Massa Corporal	2
Figura 2 – Incidência da Obesidade no mundo	2
Figura 3 - Processos metabólicos associados à da oxidação de glucose e ácidos gordos na mitocôndria	6
Figura 4 – Esquema representativo da Cadeia Respiratória Mitocondrial, composta por cinco complexos que permitem a produção de energia sob a forma de ATP	7
Figura 5 – Mecanismo proposto por Randle <i>et al</i> (1963) através do qual os ácidos gordos induziam a resistência à insulina	9
Figura 6 – Mecanismos através dos quais os lípidos intramusculares podem interferir com a via de sinalização da insulina e o metabolismo da glucose no músculo esquelético	11

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição dos controlos, por sexo.	15
Gráfico 2 – Distribuição dos obesos, por sexo.	15
Gráfico 3 - Percentagem e número de casos de Controlos com conteúdo normal e sobrecarga de lípidos intrafasciculares e intramiocelulares.	16
Gráfico 4 – Percentagem e número de casos de Obesos com conteúdo normal e sobrecarga de lípidos intrafasciculares e intramiocelulares.	16
Gráfico 5 – Percentagem e número de casos de Controlos com conteúdo normal e sobrecarga de glicogénio.	16
Gráfico 6 – Percentagem e número de casos de Obesos com conteúdo normal e sobrecarga de glicogénio.	16
Gráfico 7 – Valor médio da actividade da Citrato Sintetase e dos Complexos I, II, III e IV da CRM.	19

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características, vantagens e desvantagens de dois métodos de quantificação de lípidos no músculo esquelético: observação microscópica de biópsias musculares e MRS.	4
Tabela 2 – Dados referentes às características demográficas dos indivíduos em estudo, separados por grupos (controlos e obesos).	15
Tabela 3 – Número e percentagem de Controlos e Obesos que apresentam “Ragged-red fibers” e Fibras COX negativas.	17
Tabela 4 – Proporção (%) de fibras tipo I e tipo II de Controlos e Obesos, distribuídas pelo sexo dos indivíduos.	18
Tabela 5 – Diâmetro e Coeficiente de variabilidade de fibras tipo I e tipo II de Controlos e Obesos, distribuídas pelo sexo dos indivíduos.	18
Tabela 6 - Comparação das médias dos resultados obtidos no doseamento enzimático da CRM, entre indivíduos normais e obesos (<i>Outputs</i> do programa SPSS®).	19
Tabela 7 – Correlações estatísticas entre diferentes aspectos da actividade muscular e dados demográficos dos Indivíduos Normais.	20
Tabela 8- Correlações estatísticas entre diferentes aspectos da actividade muscular e dados demográficos dos Indivíduos Obesos.	20

ACRÓNIMOS

β -HAD- β -hidroxiacil-CoA desidrogenase

COX – Citocromo C oxidase

CRM – Cadeia Respiratória Mitocondrial

CS – Citrato Sintetase

CV – Coeficiente de variabilidade

DAG – Diacilgliceróis

EMCL – Lípidos intrafasciculares

GLUT-4 – Transportador de glucose 4

GPDH - α -glicerol-fosfato-desidrogenase

HOMA-IR - *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*

IMC – Índice de Massa Corporal

IMCL – Lipídios intramiocelulares

IRS – *Insulin receptor substrate*

LCFA-CoA – Acil CoA de cadeia longa

MRS – *Magnetic Resonance Spectroscopy* – Espectroscopia de Ressonância Magnética

NRF1 – *Nuclear respiratory factor 1*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAS – *Periodic-Acid-Schiff*

PKC – Proteína cinase C

PGC-1 α – *Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator α*

PI3K – *Phosphatidylinositol 3-kinase*

RI – Resistência à Insulina

RRF – *Ragged-red-fibers*

SDH – Succinato desidrogenase

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUÇÃO

A obesidade mórbida é uma patologia que afecta cada vez mais pessoas em todo o mundo e constitui um factor de risco ao desenvolvimento de patologias metabólicas com elevado grau de morbidade, entre elas a resistência à insulina (RI) e a diabetes tipo 2 [1]. Existe, por isso, uma necessidade crescente de compreensão e explicação dos mecanismos associados à obesidade e da sua relação com a RI, de modo a prevenir o alastrar desta epidemia e desenvolver terapias que possam diminuir a sua incidência.

Tal como descrito por vários autores [1-4], a tentativa de explicação da génese da RI associada à obesidade passa pela análise pormenorizada de diferentes aspectos da actividade muscular relacionados com o metabolismo da glucose e dos ácidos gordos, nomeadamente a função mitocondrial, a capacidade de oxidação celular e o processo de transporte de glucose.

O músculo esquelético é um dos tecidos com maior capacidade metabólica e um dos principais alvos da acção da insulina sendo, por isso, um dos órgãos mais frequentemente estudados na tentativa de compreender os processos fisiológicos que possam determinar e/ou influenciar o estabelecimento da RI [5].

1.2. OBJECTIVOS DO TRABALHO

Este projecto de investigação tem como objectivo principal identificar alterações histológicas e moleculares presentes em biópsias musculares de doentes com obesidade mórbida, procurando explorar a sua interacção com factores predisponentes ao desenvolvimento da RI.

Para a sua concretização procurar-se-á:

- a) Descrever as características histológicas no músculo esquelético de indivíduos com obesidade mórbida no que respeita à acumulação lipídica e de glicogénio, alterações mitocondriais e morfometria das fibras musculares;
- b) Determinar a actividade enzimática dos complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial (CRM) de indivíduos com obesidade mórbida e compará-la com a de indivíduos normais;
- c) Correlacionar possíveis alterações musculares dos obesos com factores como a idade dos pacientes, índice de massa corporal (IMC) e RI.

1.3. HIPÓTESES FORMULADAS

As hipóteses formuladas são:

- Os indivíduos obesos apresentam um aumento significativo de lipídios no músculo esquelético, que se correlaciona com a RI.
- O músculo esquelético dos obesos tem alterações mitocondriais, correlacionadas com a RI e a idade dos pacientes.

1.4. OBESIDADE: DEFINIÇÃO E INCIDÊNCIA

O mundo tem sido confrontado com o aumento crescente do número de pessoas com obesidade que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), se define como “uma acumulação anormal ou excessiva de gordura que representa um risco para a saúde”. O grau de obesidade é determinado pelo Índice de Massa Corporal (IMC), obtido através da razão entre a massa (em quilogramas) e o quadrado da altura (em metros). Uma pessoa com um IMC igual ou superior a 30 é considerada Obesa, sendo que, se o IMC ultrapassar os 40 passa a ter Obesidade Mórbida, tal como demonstrado na Figura 1.

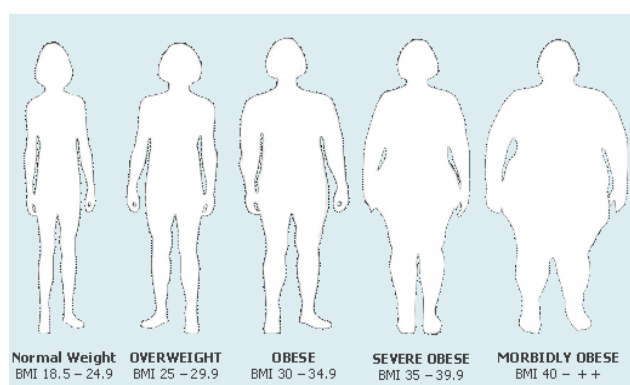


Figura 1 – Classificação dos indivíduos de acordo com o Índice de Massa Corporal (retirado de www.dubaiobesity.com).

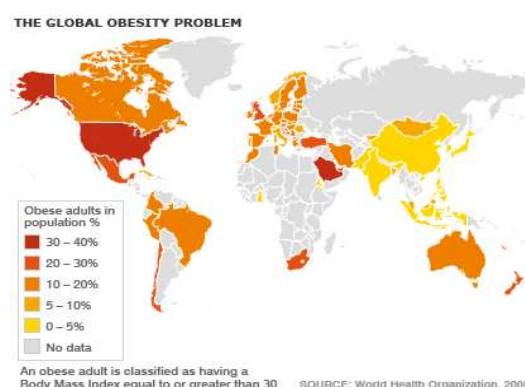


Figura 2 – Incidência da Obesidade no mundo. (retirado de <http://news.bbc.co.uk/2/low/health/7151813.stm>).

A incidência da obesidade tem atingido proporções alarmantes, com um aumento significativo, principalmente nos países desenvolvidos (Figura 2). Segundo dados da OMS, em 2005 existiam cerca de 400 milhões de obesos no mundo, prevendo-se que em 2015 esse número suba para os 700 milhões [6].

A obesidade é definida como uma doença multifactorial, cujo desenvolvimento parece fortemente associado a factores ambientais relacionados com os hábitos de vida actuais da população, principalmente no que se refere ao aumento do consumo de alimentos de elevado valor energético e ao sedentarismo. Alguns factores genéticos podem contribuir para o aumento da susceptibilidade individual e para uma maior predisposição para o instalar da doença [1, 7].

A Obesidade aumenta o risco de desenvolvimento de um conjunto de patologias, onde se incluem a RI, a Diabetes tipo 2 e as complicações cardiovasculares [1, 2].

Todos estes distúrbios têm suscitado o interesse pela compreensão dos mecanismos através dos quais a exposição crónica dos tecidos a elevadas concentrações de lipídios pode contribuir para a disfunção tecidular e desenvolvimento de patologias.

1.5. LIPOTOXICIDADE

Por definição, um dos principais mecanismos indutores da Obesidade é o balanço energético positivo crónico, resultante de um desequilíbrio entre a energia recebida e a energia dispendida, com predomínio da primeira, o que proporciona um aumento marcado de lipídios no organismo.

Na Obesidade, verifica-se uma incapacidade dos adipócitos para armazenarem este excesso de lipídios, o que resulta na sua acumulação noutros órgãos e tecidos. Esta deposição ectópica de lipídios no citoplasma das células é posteriormente responsável pela alteração do funcionamento celular e, em última instância, pela morte celular. A este fenómeno de destruição celular derivado da acumulação excessiva de lipídios designa-se Lipotoxicidade [8].

Os principais órgãos afectados por este processo são: o fígado, o músculo esquelético, o pâncreas e o coração. No entanto, pensa-se que a desregulação dos diferentes tecidos ocorre de forma hierárquica e gradual, em que o tecido adiposo e o fígado são os primeiros órgãos afectados, seguindo-se posteriormente o músculo esquelético, o pâncreas e o coração, cujas funções alteram em resposta às alterações sistémicas provocadas pela desregulação dos primeiros [8].

Todas as complicações decorrentes da Obesidade estão directa ou indirectamente associadas a alterações no funcionamento destes órgãos.

1.6. ALTERAÇÕES NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DOS OBESOS

O músculo esquelético desempenha um papel relevante em diversos processos metabólicos associados ao equilíbrio energético das células. Aproximadamente 70-80% da glucose ingerida é oxidada no músculo esquelético (para obtenção de energia) ou armazenada sob a forma de glicogénio. Por isso, este tecido é considerado o maior reservatório de glicogénio no organismo e um dos principais alvos da acção da insulina, sendo mesmo o principal local de entrada de glucose em resposta à insulina [4, 6].

Além disso é o tecido *major* envolvido na oxidação dos lipídios para obtenção de energia. Os ácidos gordos são utilizados pelo músculo esquelético em elevadas quantidades: em esforço físico o músculo consome aproximadamente 40% dos ácidos gordos em circulação; em repouso mais de 90% da energia dispendida é obtida a partir da oxidação deste

substrato. A oxidação dos ácidos gordos é também o mecanismo de consumo de cerca de 80% do oxigénio utilizado no músculo [6, 9, 10].

Como se constatou anteriormente, o músculo esquelético é um dos principais órgãos afectados na Obesidade, sendo, por isso, um importante alvo de investigação. Diversos estudos demonstram que a característica principal no músculo esquelético dos obesos é a acumulação de lipídios [11-14].

1.6.1. ACUMULAÇÃO DE LÍPIDOS INTRAMUSCULARES

Os triglicéridos são uma importante fonte de obtenção de energia no músculo esquelético, podendo acumular-se intrafascicularmente (entre fibras musculares, EMCL) ou intramiocelularmente (no citoplasma das fibras musculares, IMCL).

Inicialmente, a concentração de triglicéridos no músculo era quantificada por métodos bioquímicos, a partir de homogeneizados celulares de biópsias musculares, o que apresentava limitações, principalmente devido ao facto de não se conseguir excluir completamente o conteúdo lipídico resultante de contaminação por tecido adiposo envolvente, nem se conseguir determinar a localização exacta dos lipídios no músculo.

Os estudos mais recentes para determinação do conteúdo de triglicéridos no músculo esquelético envolvem essencialmente dois métodos: análise de biópsias musculares por técnicas de microscopia óptica ou electrónica e a espectroscopia de ressonância magnética (MRS).

A Tabela 1 apresenta as características, vantagens e desvantagens de cada um dos métodos [5, 15]:

	Observação microscópica de biópsias musculares	Espectroscopia de Ressonância Magnética (MRS)
Características	Realização de técnicas histoquímicas (e.g. Oil Red) para evidenciação dos lipídios com posterior quantificação por análise de imagem	Ressonância magnética que permite distinguir e quantificar IMCL e EMCL, devido às diferenças químicas entre os dois tipos de lipídios
Vantagens	Ambas as técnicas permitem distinguir entre lipídios intramiocelulares e intrafasciculares	Método não invasivo
Desvantagens	Método invasivo; Impede que se façam medições sucessivas em diferentes momentos da doença;	Sucesso da quantificação dependente da orientação das fibras relativamente ao campo magnético; Limitado a pequenos volumes de músculo

Tabela 1 – Características, vantagens e desvantagens de dois métodos de quantificação de lipídios no músculo esquelético: observação microscópica de biópsias musculares e MRS.

Qualquer um destes métodos tem permitido demonstrar que a acumulação intramuscular de lipídios é uma das características mais frequentes dos obesos.

Goodpaster *et al* (2000) [12], foram dos primeiros autores a avaliar a quantidade de lipídios no músculo esquelético, tendo determinado, por análise quantitativa de imagem a partir de cortes histológicos corados com Oil Red, que o volume de gotículas lipídicas por fibra muscular de um indivíduo normal corresponde a 1,5%, enquanto nos obesos esse volume sobe para 3-4%.

Noutro estudo, Malenfant e colaboradores [16] observaram que nos obesos, para além de haver uma maior proporção de lipídios, estes localizavam-se numa região mais central das fibras musculares, o que pressupõe uma diminuição da sua utilização (os lipídios são oxidados essencialmente pelas mitocôndrias subsarcolémicas).

Teoricamente, para que se verifique um aumento do conteúdo lipídico no músculo é necessário haver uma desregulação da homeostase energética, devido a um aumento da síntese de triglicéridos, uma diminuição da sua utilização ou ambos [17]. Assim sendo, pensa-se que os mecanismos que promovem o aumento do conteúdo lipídico intracelular podem estar simultaneamente associados a um aumento da entrada de ácidos gordos (confirmado pelo aumento de ácidos gordos em circulação nestes doentes [18]) e/ou a uma diminuição da capacidade de oxidação lipídica no músculo [1, 2, 11, 19].

1.6.2. DIMINUIÇÃO DA ACTIVIDADE OXIDATIVA MUSCULAR

Diferentes experiências têm demonstrado uma incapacidade do músculo esquelético dos obesos para a oxidação dos ácidos gordos, o que parece estar relacionado com uma diminuição da actividade de diversas enzimas envolvidas no processo de oxidação lipídica.

A diminuição da oxidação dos ácidos gordos parece também correlacionar-se com uma deficiente funcionalidade das mitocôndrias presentes no músculo esquelético [19-23], o que pressupõe uma desregulação nos diferentes processos metabólicos que ocorrem nesta estrutura celular (β -oxidação, ciclo de Krebs e CRM) (Figura 3).

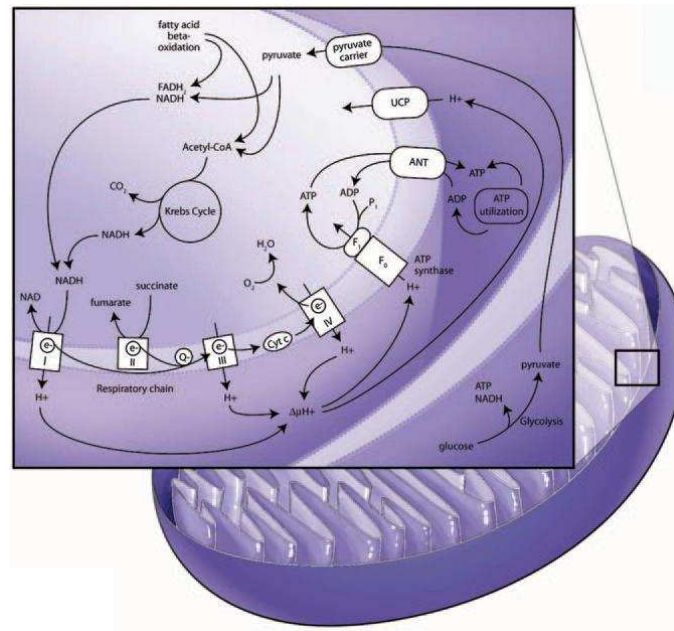


Figura 3 - Processos metabólicos associados à da oxidação de glicose e ácidos gordos na mitocôndria (retirado de Kim, 2008).

Simoneau *et al* (1999) [24] e Kim *et al* (2000) [10] demonstraram uma redução de aproximadamente 35% na actividade da enzima carnitina palmitoil transferase-1 em amostras de músculo do vasto externo de obesos, o que se manifesta numa diminuição do transporte de ácidos gordos de cadeia longa através da membrana da mitocôndria, e consequentemente numa diminuição do substrato para a β -oxidação.

Depois da entrada dos ácidos gordos na mitocôndria, o primeiro processo a desenrolar-se é a β -oxidação, em que uma das enzimas envolvidas é a β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -HAD), que também surge com actividade reduzida nestes doentes [10, 25]. O mesmo se parece verificar com a actividade da enzima citrato sintetase (CS), envolvida no ciclo de Krebs [20, 26].

A comparação entre a actividade das enzimas oxidativas (e.g. CS) e glicolíticas (e.g. fosfofrutocinase) têm demonstrado que a razão fosfofrutocinase-CS está aumentada nos obesos, o que indica que o músculo destes indivíduos tem uma elevada capacidade glicolítica, em detrimento da capacidade oxidativa [10].

Por outro lado, He *et al* [27] demonstraram, por métodos histoquímicos, a diminuição de aproximadamente 25% da actividade enzimática oxidativa por fibra muscular de doentes obesos (determinada pela intensidade da actividade da enzima succinato desidrogenase – SDH, pertencente ao ciclo de Krebs e complexo II da cadeia transportadora de electrões). Além disso, tem sido demonstrada uma diminuição da actividade da cadeia transportadora de electrões (Figura 4), comprovada pela redução de NADH: O_2 oxidoreductase (Complexo I)

[20], succinato desidrogenase (Complexo II) [22] e citocromo C oxidase (COX- Complexo IV) [26].

Segundo Ritov [28], estas alterações parecem particularmente pronunciadas nas mitocôndrias subsarcoplêmicas, que têm um papel importante na capacidade de oxidação de ácidos gordos, no transporte de glucose no músculo e na propagação da cascata de sinalização da insulina (as mitocôndrias intermiofibrilares estão mais envolvidas no processo de contração muscular).

Também Heilbronn *et al* (2007) [29] determinaram, por *Immunoblotting*, que indivíduos obesos com RI tinham uma diminuição significativa da expressão das subunidades dos complexos I e III da CRM.

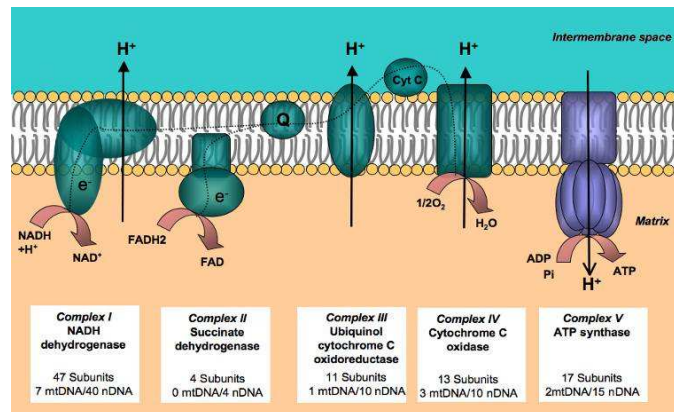


Figura 4 – Esquema representativo da Cadeia Respiratória Mitocondrial, composta por cinco complexos que permitem a produção de energia sob a forma de ATP (retirado de <http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3509/figures.htm>).

Segundo Kelley *et al* [20], a diminuição da capacidade oxidativa do músculo esquelético dos obesos e indivíduos com RI pode também estar associada a alterações estruturais das mitocôndrias, já que os seus estudos de microscopia electrónica evidenciaram que estes doentes têm mitocôndrias mais pequenas (em cerca de 35%), com disrupções membranares e membranas internas menos definidas.

Para além de alterações morfológicas e funcionais, tem sido ainda sugerida uma diminuição no número de mitocôndrias em obesos, o que é comprovado pela diminuição do conteúdo de DNA mitocondrial do músculo esquelético destes indivíduos [19, 22]. Além disso, a análise dos níveis de expressão génica no músculo esquelético demonstra uma redução na expressão de RNAm de genes codificados pelo DNA mitocondrial, como o COX1 e COX3 [19] e de genes codificados pelo DNA nuclear e reguladores da transcrição mitocondrial de genes envolvidos no metabolismo oxidativo, nomeadamente o *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator α* (PGC-1α) [19, 29-31] e o *nuclear respiratory factor 1* (NRF1) [19, 31]. O PGC-1α é um importante coativador transcrricional, que interage com o NRF1, estimulando a transcrição de inúmeros genes mitocondriais, pelo que as suas

expressões diminuídas pressupõem um deficiente controlo da biogénese mitocondrial e/ou replicação do DNA mitocondrial nos indivíduos com obesidade [19, 29].

As alterações mitocondriais observadas nestes doentes podem estar associadas ao facto de, devido ao aumento da concentração intramuscular de ácidos gordos, haver um aumento da produção de radicais livres de oxigénio libertados, por exemplo, pela cadeia transportadora de electrões [19]. O aumento do metabolismo de ácidos gordos desencadeia então um processo de stress oxidativo que conduzirá a mutações no DNA mitocondrial, à partida mais susceptível, quer pela proximidade com estes radicais, quer pelo ineficaz mecanismo de reparação de mutações [19, 20, 23].

Para além da disfunção mitocondrial em indivíduos com obesidade, têm-se sugerido também uma relação entre a diminuição da capacidade oxidativa celular e a variação de proporção de fibras musculares em doentes obesos [32].

Sabe-se que as fibras musculares diferem no seu conteúdo lipídico, na capacidade oxidativa e também na sensibilidade à insulina [5, 33]. As fibras tipo 1 (fibras oxidativas, de contracção lenta) têm uma maior quantidade de lipídios e são mais sensíveis à insulina, do que as fibras tipo 2 (fibras glicolíticas, de contracção rápida) [34]. É também aceite que as fibras tipo 1 apresentam uma maior capacidade de acumulação da glucose, o que pode dever-se ao facto de apresentarem uma expressão membranar e intracelular mais elevada de proteínas transportadoras de glucose, particularmente o transportador GLUT-4 [35].

Alguns estudos têm demonstrado uma diminuição da proporção de fibras tipo 1 e um aumento de fibras tipo 2b em doentes obesos ou com diabetes tipo 2 [30, 32, 33, 36-38], estando essa variação correlacionada com a percentagem de massa gorda dos indivíduos [5, 33] e com o HOMA-IR [21].

1.6.3. DESENVOLVIMENTO DA RESISTÊNCIA À INSULINA

Em 1963, Randle [39], descreveu pela primeira vez a existência de lipídios armazenados no músculo. Quase 30 anos depois, Pan *et al* [11] relatou a associação entre o conteúdo lipídico e o desenvolvimento da RI, tendo descrito que a quantidade de triglicéridos presente nas biópsias musculares de homens *Pima Indian* não diabéticos (grupo étnico com predisposição para desenvolver obesidade e diabetes) se relacionava com a RI, independentemente do total de gordura do corpo ou o IMC.

Outros autores têm descrito a relação directa entre o conteúdo de IMCL e a severidade da RI, em humanos [12, 40, 41] e ratinhos [42, 43]. Tem sido estabelecida uma correlação negativa entre os lipídios, especialmente os IMCL, e a sensibilidade à insulina em adultos não obesos, modelos animais altamente calóricos e descendentes saudáveis de diabéticos tipo 2.

As primeiras tentativas de explicação dos mecanismos relacionais entre a acumulação lipídica e a RI foram baseadas no Ciclo de Randle. Este autor apresentou um modelo em que os ácidos gordos livres competiam com a glucose pelo processo de oxidação, no músculo cardíaco e diafragma de ratinhos. Assim sendo, especulou-se que o aumento de lipídios nos obesos aumentaria a oxidação deste substrato em detrimento da glucose, o que a faria acumular-se nas células e provocar a RI. O mecanismo explicativo deste processo está esquematizado na Figura 5.

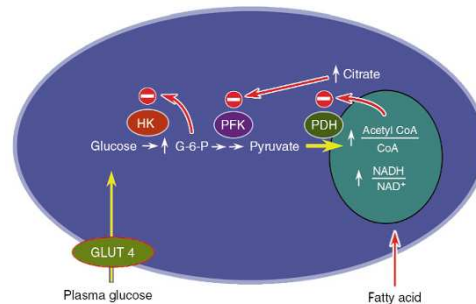


Figura 5 – Mecanismo proposto por Randle *et al* (1963) através do qual os ácidos gordos induziam a resistência à insulina (retirado de Shulman, 2000).

Segundo este modelo, o aumento da oxidação de ácidos gordos seria responsável pela elevação dos *ratios* intramitocondriais de acetil CoA/CoA e NADH/NAD⁺ com consequente inativação do piruvato desidrogenase. Isto causaria um aumento da concentração de citrato, levando à inibição da fosfofrutocinase e à acumulação de glucose-6-fosfato. O aumento da concentração de glucose-6-fosfato iria inibir a hexocinase II, o que resultaria na diminuição da entrada de glucose para a célula e sua acumulação em circulação [44, 45].

No entanto, estudos complementares foram demonstrando que elevações prologadas de ácidos gordos em circulação eram acompanhadas por reduções no conteúdo de glucose-6-fosfato intramuscular, o que contrariava o Ciclo de Randle [44, 46].

Começou então a pressupor-se que os ácidos gordos inibiam a entrada da glucose dependente da insulina através de mecanismos mais directos, associados à via de sinalização desta hormona [47].

1.6.3.1. ALTERAÇÕES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA

A acção da insulina no músculo esquelético envolve uma complexa interacção entre diferentes proteínas que permitem a transdução de sinal que conduz à entrada da glucose nas células. No primeiro nível de interacção intracelular temos a ligação da insulina ao seu receptor (localizado na membrana celular), o que activa uma tirosina cinase intrínseca, levando à autofosforilação desse receptor. A partir deste momento são activadas uma série de proteínas, incluindo o *insulin receptor substrate 1* (IRS1), IRS2 e *phosphatidylinositol 3-*

kinase (PI3K), que levarão à translocação dos transportadores de glucose das vesículas endoplasmáticas para a membrana celular e à entrada da glucose nas células [6, 48].

Várias experiências que procuram avaliar os diferentes passos da via de sinalização da insulina em indivíduos normais e obesos com RI têm demonstrado diminuições da autofosforilação do receptor da insulina, da fosforilação do IRS1 e da activação do PI3K em obesos com RI [49]. Também tem sido descrita a diminuição da actividade do *insulin-receptor tyrosine kinase* em obesos e doentes com diabetes tipo 2 [50-52].

As alterações nestes passos iniciais da via de sinalização parecem responsáveis pelo desenvolvimento da RI.

A acumulação intramuscular de triglicéridos tem sido correlacionada com a RI em indivíduos obesos [53]. Vários estudos têm também demonstrado um aumento de metabolitos resultantes da esterificação dos triglicéridos, entre eles, acil CoA de cadeia longa (LCFA-CoA), diacilgliceróis (DAG) e ceramidas, no músculo esquelético dos obesos [54, 55], o que também se parece correlacionar com a RI [56].

Actualmente, pensa-se que os triglicéridos são metabolicamente inertes, não sendo os responsáveis pelas alterações na via da insulina. Defende-se sim que são os LCFA-CoA, DAG e ceramidas que, ao acumular-se no citoplasma das células musculares, vão directa ou indirectamente interferir na transdução de sinal da insulina e/ou na actividade de enzimas envolvidas no transporte e utilização da glucose [1, 2, 4].

Estes metabolitos parecem responsáveis pela inibição de passos específicos da cascata de sinalização da insulina:

- LCFA-CoA - podem interferir directamente nesta via, através da activação da proteína cinase C (PKC), responsável pela inactivação do receptor de insulina e IRS-1 [25]. Estudos em culturas celulares [57], demonstram que a PKC (isoformas θ ou β) promove a fosforilação dos resíduos de serina e treonina destes receptores (em vez da tirosina), inactivando-os e levando à diminuição da actividade do PI3K [56, 58]; Podem ainda interferir com a via de sinalização de uma forma indirecta, já que são precursores dos DAG e ceramidas [4, 6];
- DAG – pensa-se que, tal como os LCFA-CoA, promovem a RI através da activação das isoformas de PKC, o que diminuirá a actividade da PI3K dependente da fosforilação da tirosina do IRS-1 [6];
- Ceramidas - parecem ter um papel importante na inibição da cascata de insulina através da activação da fosfatase responsável pela desfosforilação da proteína cinase B (também designada Akt), o que resulta na inibição do transportador GLUT4 e na diminuição da síntese de glicogénio [6, 53].

A Figura 6 apresenta esquematicamente o modo de interacção entre os diferentes metabolitos dos ácidos gordos e a via de sinalização da insulina:

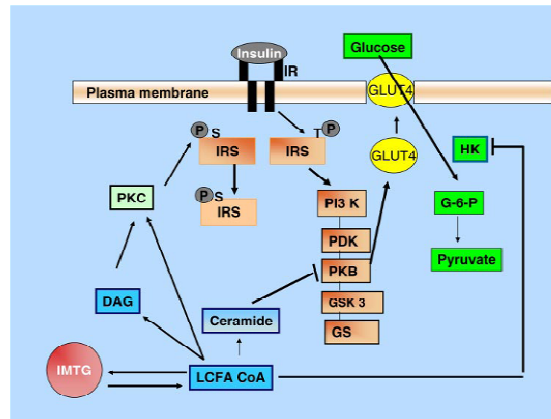


Figura 6 – Mecanismos através dos quais os lipídios intramusculares podem interferir com a via de sinalização da insulina e o metabolismo da glicose no músculo esquelético (Kiens, 2006).

Como é possível observar, o excesso de lipídios no músculo parece resultar numa diminuição da acção da insulina, através de diversos mecanismos que envolvem a acumulação intramuscular de triglicéridos, LCFA-CoA, DAG e ceramidas. Como consequência, regista-se uma diminuição da transdução de sinal da insulina e uma diminuição da acumulação de glicose nas células musculares.

1.6.3.2. ALTERAÇÕES NO SISTEMA DE TRANSPORTE DE GLUCOSE

Para além da alteração na via de sinalização da insulina, pensa-se que o desenvolvimento da RI em indivíduos obesos pode resultar de alterações específicas nos transportadores da glicose no músculo esquelético.

O transporte de glicose através da membrana das células musculares esqueléticas é mediado essencialmente por dois transportadores: GLUT-1 (envolvido no transporte basal de glicose) e GLUT-4 (responsável pelo transporte de glicose em resposta à insulina e à contracção). O transportador GLUT-4 está normalmente armazenado em vesículas intracitoplasmáticas. Após a transferência de sinais ao longo da cascata da insulina, há uma abertura destas vesículas e a redistribuição de aproximadamente 50% dos transportadores nela armazenados para a membrana celular, o que aumenta fortemente a capacidade de transporte de glicose para o interior das fibras musculares [59].

Recentemente tem sido sugerida uma diminuição da expressão génica e proteica do transportador GLUT-4, o que reduz a capacidade de transporte de glicose por estimulação da insulina [4, 60]. Alguns estudos referem também uma localização subcelular anormal deste transportador nos indivíduos com RI [4].

A ineficácia do transporte de glicose tem influência na capacidade de síntese de glicogénio no músculo esquelético, pressupondo-se uma diminuição na produção de glicogénio em indivíduos obesos e com RI [4].

CAPÍTULO 2

METODOLOGIA

2.1. CONDIÇÕES DO ESTUDO

Foi realizado um estudo prospectivo entre Julho de 2007 e Dezembro de 2008, no Centro Hospitalar Lisboa Norte, E.P.E.- Hospital de Santa Maria.

O estudo foi sujeito a aceitação pela Comissão de Ética do Hospital e todos os indivíduos integrados assinaram um consentimento informado.

2.2. AMOSTRA

Foram sequencialmente estudados 43 indivíduos com Obesidade Mórbida, sujeitos a cirurgia bariátrica de colocação de banda gástrica durante este período. Para serem sujeitos a cirurgia bariátrica os indivíduos tinham de ter mais de 18 anos e um IMC ≥ 40 Kg/m² ou IMC ≥ 35 Kg/m² com co-morbilidade. No momento da cirurgia foi-lhe realizada uma biópsia no músculo deltóide esquerdo.

Todos os indivíduos foram caracterizados de acordo com os seguintes parâmetros: sexo, idade, peso, altura, IMC e HOMA-IR¹.

Foram igualmente incluídos 34 indivíduos saudáveis, que serviram de controlos normais para o estudo. Estes indivíduos realizaram biópsias musculares durante o mesmo período temporal do grupo em estudo e foram seleccionados de modo a haver uma equivalência de sexo e idade com a amostra em estudo.

Foram excluídos todos os indivíduos portadores de doença muscular previamente conhecida, doenças auto-imunes ou infecções virais (e.g. HIV ou hepatite).

2.3. BIÓPSIA MUSCULAR

As biópsias musculares foram realizadas no músculo deltóide esquerdo, com anestesia local (5 cc de lidocaína a 2%).

Foram colhidos três fragmentos de aproximadamente 1cm por 0,5 cm para congelação em 2-metilbutano arrefecido em azoto líquido a -160°C (método do isopentano) [61]. Dois desses fragmentos seguiram para o estudo histológico e o terceiro foi utilizado para o estudo bioquímico.

¹ HOMA-IR - *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*
- Fórmula para a sua determinação: glucose (mmol/L) X insulin (m/L) / 22,5

2.4. ESTUDOS HISTOQUÍMICO E HISTOENZIMOLÓGICO

Em cada amostra procedeu-se ao estudo histoquímico e histoenzimológico para análise de quatro parâmetros: conteúdo lipídico, conteúdo de glicogénio, alterações mitocondriais e morfometria das fibras musculares.

Para a sua avaliação foram realizadas diferentes técnicas histoquímicas e histoenzimológicas, em cortes de congelação de 10 µm (Tricrómio de Gomori modificado é realizado em cortes de 12 µm), com crióstato a – 23°C. Os protocolos adoptados estão de acordo com as técnicas referenciadas [61].

2.4.1. AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO

A avaliação semi-quantitativa do conteúdo lipídico foi feita através da técnica Oil Red, que permite verificar a existência de acumulação excessiva de lipídios intramiocelulares e/ou intrafasciculares.

2.4.2. AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÉNIO

Para determinação semi-quantitativa do conteúdo de glicogénio intramuscular, realizou-se a técnica histoquímica *Periodic-Acid-Schiff* (PAS).

2.4.3. DETERMINAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS

A análise das alterações mitocondriais foi feita por observação microscópica de duas alterações histológicas específicas – presença de “ragged-red-fibers” (RRF) e fibras COX negativas. Para isso realizaram-se duas técnicas distintas:

- a técnica histoquímica de Tricrómio de Gomori modificado, que permite identificar RRF, ou seja, fibras que, devido a uma proliferação mitocondrial exagerada, apresentam uma coloração avermelhada na periferia.
- a técnica histoenzimática COX-SDH, frequentemente usada na detecção de fibras sem actividade COX (fibras brancas ou negativas), em resultado de mutações do DNA mitocondrial que afectam preferencialmente o complexo IV da CRM.

2.4.4. MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES

A caracterização do tipo de fibras musculares foi feita através da técnica ATPase com pré-incubação a pH 9.4, que permite diferenciar as fibras musculares nos seus tipos histológicos de acordo com a intensidade de coloração. Assim sendo, as fibras musculares são classificadas em fibras tipo I (claras) e fibras tipo II (escuras).

Para determinar a percentagem de cada tipo de fibras musculares e avaliar a existência de predomínio de algum dos tipos procedeu-se à contagem computadorizada de 400 fibras musculares consecutivas num corte histológico, diferenciando-as em fibras tipo 1 e tipo 2.

Para avaliar a existência de variação de tamanho das fibras musculares mediu-se, por histomorfometria, o menor diâmetro de 150 fibras consecutivas.

2.5. ESTUDO DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Para avaliar a actividade enzimática dos complexos da CRM realizou-se o estudo por método espectrofotométrico, em que se procedeu ao doseamento enzimático dos complexos I (NADH – ubiquinona redutase, sensível à rotenona), II (Succinato - ubiquinona redutase), III (Ubiquinol -citocromo c redutase, sensível à antimicina) e IV (Citocromo c oxidase) e da enzima CS.

Os valores de actividade enzimática dos complexos da CRM foram normalizados para a actividade da CS de cada amostra.

Estas determinações foram feitas a partir de homogeneizados celulares de 50-80 mg de músculo do deltóide esquerdo.

Foram feitos três ensaios para determinação de cada actividade enzimática em cada amostra, com recurso a um espectrofotómetro Shimadzu CPS-240A e com ajuda do programa informático PC160PLS.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de cada parâmetro nos indivíduos normais e nos doentes com obesidade mórbida foram apresentados sob a forma de percentagens ou médias \pm desvio-padrão.

As diferenças de médias entre grupos foram determinadas através do teste one-way ANOVA.

As correlações estatísticas entre os diferentes parâmetros foram determinadas pelos teste do Qui-Quadrado e teste não-paramétrico de Spermann.

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa informático SPSS® 12.0. O nível de significância usado foi de $P < 0.05$.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EM ESTUDO, POR SEXO



Gráfico 1 – Distribuição dos controlos, por sexo.

Gráfico 2 – Distribuição dos obesos, por sexo.

De acordo com os gráficos acima representados, é possível verificar que ambos os grupos são constituídos maioritariamente por indivíduos do sexo feminino (59% no caso da amostra de indivíduos normais e 79% no caso dos obesos).

3.2. DADOS DEMOGRÁFICOS DOS INDIVÍDUOS EM ESTUDO

	CONTROLOS (N=34)	OBESOS (N=43)
Idade (anos)	40,29 ± 16,86	43,35 ± 10,64
Peso (Kg)	---	119,85 ± 17,38
Altura (cm)	---	163,44 ± 8,19
IMC	---	45,31 ± 6,74
HOMA-IR	---	4,01 ± 2,18

Tabela 2 – Dados referentes às características demográficas dos indivíduos em estudo, separados por grupos (controlos e obesos).

A média de idades dos controlos corresponde a 40,29 anos (Min=13; Máx=73), enquanto a dos indivíduos obesos situa-se nos 43,35 anos (Min=22; Máx=67).

Os obesos têm um peso médio de 119,85 Kg (Min=80,10; Máx=163,50), uma altura que vai de 1,50m a 1,84m (valor médio de 1,63m) e um IMC que ronda os 45,31 (Min=33,11; Máx=59,29).

O HOMA-IR permite determinar se o indivíduo possui resistência à insulina, o que acontece quando o valor obtido é superior a 3. A média de HOMA-IR dos obesos é de 4,01, sendo o valor mínimo de 1,26 e o máximo de 9,84. São 19 os indivíduos que possuem um valor de

HOMA-IR superior a 3 (resistentes à insulina), o que equivale a 44,19% do total de obesos estudados.

3.3. ANÁLISE DO CONTEÚDO LIPÍDICO

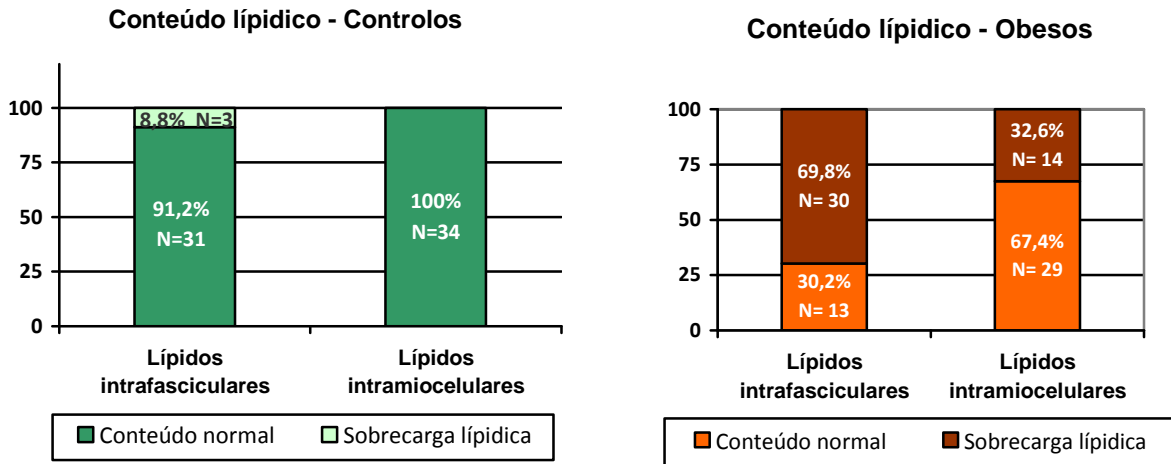


Gráfico 3 - Percentagem e número de casos de Controlos com conteúdo normal e sobrecarga de lipídios intrafasciculares e intramiocelulares.

Gráfico 4 – Percentagem e número de casos de Obesos com conteúdo normal e sobrecarga de lipídios intrafasciculares e intramiocelulares.

Pela análise do Gráfico 3 é possível constatar que a maioria dos indivíduos normais não apresenta sobrecarga de lipídios, à exceção de três casos que têm um aumento do conteúdo lipídico intrafascicular.

No caso dos indivíduos obesos (Gráfico 4) observa-se que mais de metade dos casos apresentam sobrecarga de lipídios intrafasciculares (69,8%) e cerca de 32,6% têm um excesso de lipídios intramiocelulares.

3.4. ANÁLISE DO CONTEÚDO DE GLICOGÉNIO

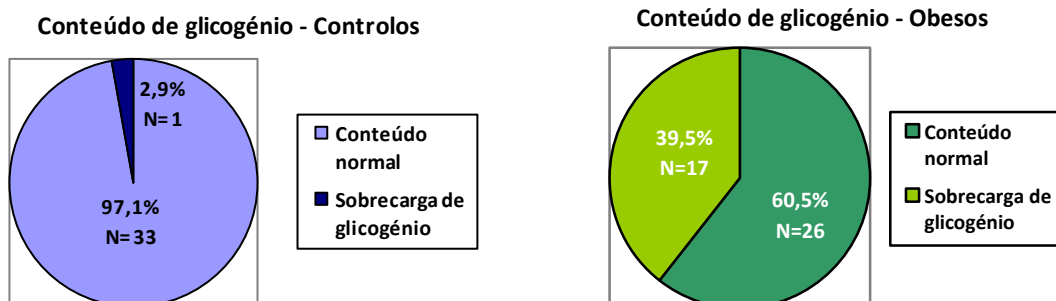


Gráfico 5 – Percentagem e número de casos de Controlos com conteúdo normal e sobrecarga de glicogénio.

Gráfico 6 – Percentagem e número de casos de Obesos com conteúdo normal e sobrecarga de glicogénio.

Pela observação dos Gráfico 5 e Gráfico 6 constata-se que a quase totalidade dos controlos (97,1%) apresenta um conteúdo normal de glicogénio, enquanto nos obesos isso acontece em 60,5% dos casos, o que equivale a 26 indivíduos. Os restantes indivíduos com obesidade mórbida (17 casos) têm uma sobrecarga de glicogénio a nível muscular.

3.5. ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS

	Nº de fibras (por corte histológico)	CONTROLOS (N=34)	OBESOS (N=43)
“Ragged-red fibers”	0	N=31; 91,2%	N=33; 76,7%
	1	N=2; 5,9%	N=7; 16,3%
	2	N=1; 2,9%	N=3; 7,0%
Fibras COX negativas	0	N=32; 94,2%	N=23; 53,5%
	1	N=1; 2,9%	N=5; 11,6%
	2	N=1; 2,9%	N=6; 13,9%
	3	--	N=2; 4,7%
	4	--	N=3; 7,0%
	5	--	N=1; 2,3%
	8	--	N=1; 2,3%
	10	--	N=2; 4,7%

Tabela 3 – Número e percentagem de Controlos e Obesos que apresentam “Ragged-red fibers” e Fibras COX negativas.

A quase totalidade dos indivíduos normais (91,2%) não apresenta RRF, havendo apenas três casos (8,8%) em que se observam estas fibras. A percentagem de obesos com este achado histológico é de 23,3%, ou seja, existem 7 casos em que se observa uma RRF e 3 casos em que se observam duas. Apesar de haver um maior número de obesos com RRF do que indivíduos normais, essa diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,129$).

Relativamente à presença de fibras COX negativas é possível dizer que apenas 2 indivíduos normais as possuem (5,8%), o que contrasta fortemente com os obesos. Neste grupo, quase metade dos indivíduos (46,5%) apresentam fibras COX negativas, que variam entre uma e dez (por corte histológico). A diferença entre o número de fibras COX negativas nos obesos e controlos é estatisticamente significativa ($p=0,001$).

3.6. ANÁLISE DA MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES

3.6.1. Proporção dos tipos de fibras musculares

	Controlos				Obesos			
	Masculino		Feminino		Masculino		Feminino	
	Fibras tipo I	Fibras tipo II	Fibras tipo I	Fibras tipo II	Fibras tipo I	Fibras tipo II	Fibras tipo I	Fibras tipo II
Proporção de fibras (%)	48,36	51,64	51,20	48,80	47,61	52,39	54,75	45,25

Tabela 4 – Proporção (%) de fibras tipo I e tipo II de Controlos e Obesos, distribuídas pelo sexo dos indivíduos.

Pela análise da Tabela 4, observa-se que tantos os indivíduos normais como os obesos do sexo masculino apresentam um maior número de fibras tipo II (51,64% e 52,39%, respectivamente). Inversamente, os indivíduos do sexo feminino incluídos no estudo apresentam, em média, uma maior proporção de fibras tipo I: 51,20% nos Controlos e 54,75% nos Obesos.

Do ponto de vista estatístico não se verificam diferenças na proporção de fibras tipo I ($p=0,147$) ou de fibras tipo II ($p=0,101$) entre os indivíduos normais e obesos (ver Anexo II).

3.6.2. Diâmetro dos tipos de fibras musculares

	CONTROLOS				OBESOS			
	Masculino		Feminino		Masculino		Feminino	
	Fibras tipo I	Fibras tipo II	Fibras tipo I	Fibras tipo II	Fibras tipo I	Fibras tipo II	Fibras tipo I	Fibras tipo II
Diâmetro de fibras (μm)	55,70 $\pm 8,25$	57,30 $\pm 10,33$	50,27 $\pm 8,93$	49,09 $\pm 10,25$	63,44 $\pm 9,77$	63,51 $\pm 11,09$	53,31 $\pm 10,04$	49,75 $\pm 11,29$
Coefficiente de variabilidade*	178,07	250,79	167,90	198,25	188,67	219,56	179,71	214,85

* Normal: Coeficiente de variabilidade² < 250

Tabela 5 – Diâmetro e Coeficiente de variabilidade de fibras tipo I e tipo II de Controlos e Obesos, distribuídas pelo sexo dos indivíduos.

Pela observação da Tabela 5 constata-se que as fibras dos indivíduos do sexo masculino (independente do grupo em estudo) têm, em média, um diâmetro superior às dos indivíduos do sexo feminino.

Não se observam diferenças estatisticamente significativas entre o diâmetro das fibras tipo I e tipo II nos dois grupos em estudo: a diferença de diâmetro de fibras tipo I entre controlos e

² Coeficiente de variabilidade (CV) é determinado por: Desvio-padrão X 1000 / média do diâmetro das fibras [61]

obesos tem um valor estatístico de $p=0,172$ enquanto a diferença de diâmetro de fibras tipo II tem um valor de $p=0,951$ (ver Anexo II).

O CV é útil para demonstrar se algum dos tipos de fibras apresenta atrofia ou hipertrofia relativamente ao normal, que corresponde a um CV até 250. Neste caso, apenas os indivíduos normais do sexo masculino apresentam um CV *borderline* (CV=250,79), podendo-se dizer que genericamente não existe uma variabilidade significativa entre cada tipo de fibras, nos diferentes grupos de indivíduos estudados.

3.7. ESTUDO BIOQUÍMICO DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

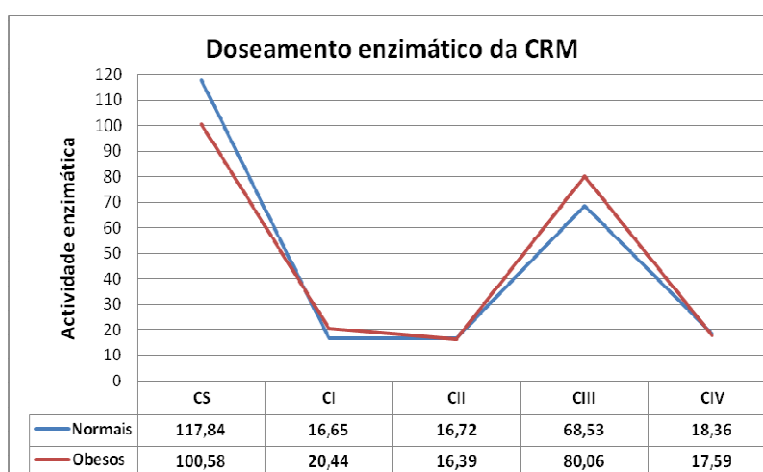


Gráfico 7 – Valor médio da actividade da Citrato Sintetase e dos Complexos I, II, III e IV da CRM.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Citrato Sintetase	Between Groups	5368,168	1	5368,168	5,519	,022
	Within Groups	70029,251	72	972,628		
	Total	75397,419	73			
Complexo I	Between Groups	258,133	1	258,133	3,593	,062
	Within Groups	5172,389	72	71,839		
	Total	5430,522	73			
Complexo II	Between Groups	1,921	1	1,921	,071	,791
	Within Groups	1960,283	72	27,226		
	Total	1962,204	73			
Complexo III	Between Groups	2393,764	1	2393,764	3,068	,084
	Within Groups	56168,416	72	780,117		
	Total	58562,180	73			
Complexo IV	Between Groups	10,730	1	10,730	,247	,621
	Within Groups	3131,415	72	43,492		
	Total	3142,146	73			

Tabela 6 - Comparação das médias dos resultados obtidos no doseamento enzimático da CRM, entre indivíduos normais e obesos (*Outputs* do programa SPSS®).

Para análise da actividade mitocondrial fez-se, por método espectrofotométrico, o doseamento da enzima CS e dos complexos I, II, III e IV da CRM em 31 dos 34 indivíduos normais estudados e nos 43 indivíduos obesos (ver Anexo III).

A leitura do Gráfico 7 e Tabela 6 permite constatar que os obesos apresentam uma diminuição da actividade da enzima CS, comparativamente aos indivíduos normais, com significância estatística ($100,58 \pm 29,78$ vs $117,84 \pm 33,06$, $p=0,022$).

A actividade do Complexo I é, em média, maior nos indivíduos obesos do que nos controlos ($20,44 \pm 10,19$ vs $16,65 \pm 5,20$, $p=0,062$), o que também se verifica com o complexo III ($80,06 \pm 26,20$ vs $68,53 \pm 30,19$, $p=0,084$). No entanto, nenhum dos resultados é estatisticamente significativo.

As actividades do complexo II ($16,72 \pm 3,15$ vs $16,39 \pm 6,29$, $p=0,791$) e do complexo IV ($18,36 \pm 4,69$ vs $17,59 \pm 7,67$, $p=0,621$) são bastante semelhantes entre indivíduos normais e obesos.

3.8. CORRELAÇÕES ESTATÍSTICAS

A - Indivíduos normais

	Sexo	Idade	Fibras COX -	RRF
EMCL	$p=0,251$	$p=0,493$	$p=1,000$	$p=0,249$
Conteúdo de glicogénio	$p=0,412$	$p=0,367$	$p=1,000$	$p=1,000$
RRF	$p=1,000$	$p=0,018$	$p=1,000$	-----
Fibras COX -	$p=0,162$	$p=0,951$	-----	$p=1,000$
Actividade da CS	$p=0,736$	$p=0,264$	$p=0,879$	$p=0,106$

Tabela 7 – Correlações estatísticas entre diferentes aspectos da actividade muscular e dados demográficos dos Indivíduos Normais.

B - Indivíduos obesos

	Sexo	Idade	IMC	HOMA-IR	Fibras COX -	RRF
IMCL	$p=0,231$	$p=0,311$	$p=0,128$	$p=0,065$	$p=0,331$	$p=0,704$
EMCL	$p=0,102$	$p=0,071$	$p=0,458$	$p=0,401$	$p=0,173$	$p=0,696$
Conteúdo de glicogénio	$p=0,445$	$p=0,591$	$p=1,000$	$p=0,350$	$p=0,494$	$p=0,269$
RRF	$p=1,000$	$p=0,202$	$p=0,031$	$p=1,000$	$p=0,028$	-----
Fibras COX -	$p=0,467$	$p=0,000$	$p=0,023$	$p=0,572$	-----	$p=0,028$
CS	$p=0,095$	$p=0,353$	$p=0,711$	$p=0,491$	$p=0,989$	$p=0,725$
Idade	$p=0,577$	-----	$p=0,102$	$p=0,324$	$p=0,000$	$p=0,202$
Sexo	-----	$p=0,577$	$p=0,413$	$p=1,000$	$p=0,467$	$p=1,000$

Tabela 8- Correlações estatísticas entre diferentes aspectos da actividade muscular e dados demográficos dos Indivíduos Obesos.

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO

A obesidade mórbida é uma patologia cada vez mais frequente nos países desenvolvidos e constitui um factor de risco acrescido para o desenvolvimento da RI e diabetes tipo 2.

O músculo esquelético é um dos órgãos metabolicamente mais activos e um dos principais alvos da acção da insulina. As perturbações na regulação do metabolismo da glucose e lipídios no músculo esquelético parecem estar envolvidas no desenvolvimento da RI, o que faz com que este órgão deva ser estudado em doentes com obesidade mórbida, com vista à compreensão da interacção desta patologia com o desenvolvimento da RI.

Neste trabalho de investigação procurou-se avaliar diferentes parâmetros da actividade muscular, tentando evidenciar as alterações musculares nos doentes com obesidade mórbida e posteriormente correlacioná-las com as características físicas dos indivíduos (e.g. sexo, idade, IMC e HOMA-IR). Assim sendo, foram estudados quatro parâmetros: conteúdo lipídico e de glicogénio, alterações mitocondriais e morfometria das fibras musculares.

A alteração mais evidente no músculo esquelético dos 43 obesos estudados foi a acumulação excessiva de lipídios, o que está de acordo com o descrito na literatura [11-14]. Através da técnica Oil Red, constatou-se que 69,8% dos indivíduos apresentavam uma sobrecarga de EMCL e quase um terço (32,6%) tinha um excesso de IMCL.

O aumento do conteúdo lipídico tem sido fortemente associado à RI, devido à interferência dos metabolitos dos ácidos gordos na via de sinalização da insulina e, conseqüentemente, na entrada de glucose nas células musculares [53]. Curiosamente, neste estudo, não conseguimos estabelecer uma correlação entre o EMCL e o valor de HOMA-IR ($p=0,401$). Apesar de haver uma tendência para os obesos com RI apresentarem uma sobrecarga de IMCL, essa correlação também não é estatisticamente significativa ($p=0,065$). Estes resultados não vão de encontro à maioria das publicações, mas não são resultados isolados, visto já ter sido constatado por outros grupos, que compararam indivíduos sensíveis à insulina com resistentes à insulina [29], estudaram diabéticos [62] ou indivíduos com excesso de peso [63].

O surgimento destes resultados leva-nos a ponderar várias questões: 1) se o conteúdo de EMCL e IMCL serão os melhores predictores para o desenvolvimento da RI (ou se se deveria ter mais atenção à concentração intramuscular de derivados dos ácidos gordos, como as ceramidas e DAG); 2) se efectivamente a RI nestes doentes será provocada pela acumulação de lipídios no músculo esquelético ou estará mais associada a outras alterações musculares ao nível, por exemplo, do funcionamento mitocondrial; 3) se poderemos associar o aparecimento da RI considerando apenas as alterações no músculo esquelético ou se

teremos de envolver simultaneamente a análise de outros órgãos chave (e.g. fígado, pâncreas e tecido adiposo).

Apesar dos diferentes estudos relacionarem a acumulação de lipídios e o desenvolvimento da RI, até hoje não tem sido possível estabelecer uma relação inequívoca entre estes dois parâmetros, já que estão descritas situações em que esta associação não está presente. É o caso dos atletas de alta competição que apesar de terem concentrações de IMCL muito elevadas também apresentam elevados níveis de sensibilidade à insulina, o que se explica pelo facto de terem uma actividade oxidativa muito elevada e, portanto, consumirem rapidamente os ácidos gordos que vão acumulando no músculo esquelético [13]. Com base nestes resultados, alguns autores propõem a existência de uma correlação entre a severidade da RI e a diminuição da capacidade oxidativa das células [24], e não entre a RI e a concentração de IMCL. Este último seria um factor secundário e apenas indicador de uma desregulação entre os lipídios armazenados e a capacidade de oxidação no músculo esquelético [25].

A mitocôndria é o principal organito celular responsável pela oxidação lipídica no músculo. Sucessivos estudos têm vindo a sugerir uma relação entre as alterações no conteúdo e/ou funcionalidade mitocondrial e a diminuição da capacidade oxidativa, o que pode conduzir à RI e à diabetes tipo 2 nos obesos.

Com base neste pressuposto, decidimos avaliar as possíveis alterações mitocondriais presentes nas biópsias musculares dos obesos. Do ponto de vista histológico, as disfunções/patologias mitocondriais são detectáveis pela presença de achados característicos, como as RRF e as fibras COX negativas. Pelos resultados obtidos podemos concluir que a incidência destas duas alterações é maior nos indivíduos com obesidade mórbida do que nos controlos estudados: existem 23,3% de obesos com RRF (contra 8,8% de indivíduos normais) e 46,5% apresentam fibras COX negativas (contra 5,8% de controlos).

Nos indivíduos normais a presença de RRF correlaciona-se com a idade dos pacientes ($p=0,018$). A mesma correlação é observada nos obesos mas entre a idade dos indivíduos e a presença de fibras COX negativas ($p=0,000$). A relação entre a idade e o aparecimento de alterações mitocondriais está bastante bem documentada na literatura [64, 65]. Diversos estudos têm demonstrado que a idade influencia o normal funcionamento das vias metabólicas mitocondriais, contribuindo, por exemplo para a diminuição da actividade de enzimas oxidativas mitocondriais (e.g. COX e CS) e/ou para a diminuição das taxas de produção de ATP [64, 65].

Tendo em conta esta correlação poderíamos pensar que os achados histológicos observáveis nas biópsias dos obesos corresponderiam apenas à idade. Contudo, analisando os resultados obtidos, constatamos que, apesar de tanto nos controlos como nos obesos

haver uma correlação entre as alterações mitocondriais e a idade, a proporção dessas alterações nos obesos é muito maior do que nos indivíduos normais. Este facto leva-nos a pressupor que, neste caso, a idade dos doentes funciona como um factor potenciador da presença deste tipo de fibras (quanto mais velhos são os indivíduos mais se reflecte a acumulação de alterações) mas que as proporções do seu aparecimento deverão ser associadas à patologia base.

Os diversos estudos que avaliam a actividade mitocondrial têm demonstrado que nos indivíduos com obesidade existe uma diminuição da actividade das enzimas oxidativas da mitocôndria (e.g. β -HAD, NADH:O₂ oxidoreductase, COX) [20, 26]. No entanto, parece importante perceber se a diminuição dessa actividade será resultado de uma deficiente funcionalidade das enzimas estudadas, de uma diminuição do conteúdo mitocondrial ou de ambos os casos.

Neste estudo, avaliámos a actividade da enzima CS (usada como referência do número de mitocôndrias presentes no músculo esquelético), tendo-se verificado que os indivíduos obesos apresentam uma diminuição estatisticamente significativa da actividade desta enzima, quando comparados com os controlos (100,58 nos obesos vs 117,84 nos controlos, $p=0,022$). Estes resultados levaram-nos a concluir que, efectivamente, os indivíduos com obesidade mórbida apresentam uma diminuição do conteúdo mitocondrial, tal como já tinha sido publicado por outros autores, estudando esta enzima [20, 26] ou mesmo determinando a quantidade de DNA mitocondrial presente nas amostras [19, 22].

A análise da disfunção mitocondrial nestes doentes passou também pelo doseamento enzimático da CRM, procurando avaliar a actividade dos complexos I a IV. Neste aspecto não se verificou diferenças de actividade enzimática entre indivíduos normais e obesos, sendo a média das actividades muito semelhante entre os dois grupos, para os quatro complexos estudados.

Para a determinação da actividade enzimática da CRM, os resultados do doseamento enzimático dos complexos foram corrigidos com o conteúdo mitocondrial (dado pela CS), o que é importante para perceber se a capacidade de fosforilação oxidativa está efectivamente reduzida ou se uma possível diminuição dos valores absolutos de actividade não seria mascarada por uma diminuição da quantidade de mitocôndrias. Neste caso, conclui-se que a fosforilação oxidativa de cada mitocôndria não está reduzida mas que, em termos globais, poderemos ter um decréscimo de actividade da CRM, por diminuição do número de mitocôndrias no músculo esquelético dos obesos, tal como verificado noutros estudos [21].

Uma das questões actuais relativamente à disfunção mitocondrial observada nos obesos passa por perceber se a redução do conteúdo e actividade mitocondriais são consequência da obesidade ou se podem estar apenas relacionadas com os hábitos de vida destes

indivíduos. A maior parte dos estudos que determinam a diminuição do metabolismo mitocondrial não tem em consideração outros factores que podem influenciar a actividade das mitocôndrias, como a idade, o sexo ou o exercício físico feito pela pessoa [64]. Há assim hipótese de as alterações observadas serem apenas consequência do nível de vida mais sedentário dos obesos, que, como têm um menor dispêndio de energia, têm uma menor actividade mitocondrial, o que diminui a biogénese mitocondrial [66]. A corroborar esta hipótese está o facto de termos obtido uma correlação estatisticamente significativa entre o IMC e a presença de RRF ($p=0,031$) e de fibras COX negativas ($p=0,023$). À partida, uma pessoa com um IMC mais elevado será mais gorda e, por isso, estará mais limitada nos seus movimentos, tendo tendência a ser mais sedentária.

Torna-se então complicado perceber se as alterações descritas ao nível do funcionamento mitocondrial são a causa, a consequência ou um evento paralelo ao desenvolvimento da RI. Neste estudo, não conseguimos encontrar nenhuma correlação entre as alterações mitocondriais e a RI. Os resultados obtidos no que se refere à disfunção mitocondrial são transversais a todos os obesos, independentemente do facto de serem RI ou não, o que nos inclina mais para a teoria de estas alterações mitocondriais serem apenas um efeito secundário da obesidade, reflectindo uma menor necessidade energética destes indivíduos. Contudo, para confirmar este ponto de vista seria importante proceder a uma análise mais detalhada, por exemplo, do conteúdo genético nuclear e mitocondrial associado à biogénese mitocondrial e à transcrição das proteínas mitocondriais, de forma a detectar possíveis mutações e/ou diminuições de expressão de genes importantes para o normal funcionamento das mitocôndrias. Por outro lado, seria interessante olhar para a morfologia deste organito celular, procurando compreender até que ponto a sua estrutura está desregulada nestes doentes e que efeito isso terá na capacidade oxidativa celular. Só assim poderemos comprovar se, efectivamente, não existem alterações na formação das mitocôndrias, que possam influenciar a sua actuação nos obesos.

A melhor compreensão da abrangência das alterações mitocondriais passa também por perceber se estas são: inatas (indicia uma predisposição à nascença para a Obesidade e RI) ou adquiridas (alterações que se desenvolvem ao longo dos anos como resultado do balanço energético positivo derivado dos estilos de vida actuais). Para ajudar no esclarecimento destas hipóteses seria importante, por exemplo, estudar a funcionalidade mitocondrial dos indivíduos *Pima Indian* não diabéticos (população com predisposição para a obesidade) e dos indivíduos obesos depois da perda de peso. O primeiro ajudar-nos-ia a perceber se estes indivíduos têm uma actividade mitocondrial diferente dos outros, que possa justificar a sua propensão para o desenvolvimento desta patologia. O segundo poderia ser útil para compreender se as alterações observáveis na obesidade são reversíveis após intervenções terapêuticas (e.g. perda de peso ou maior actividade física), o

que, em princípio, descartaria a hipótese de a disfunção mitocondrial ser uma característica inata destes indivíduos. Contudo, neste campo existem estudos bastante díspares [12, 16, 29].

Algumas publicações têm sugerido que a diminuição da capacidade oxidativa muscular nos obesos pode também estar associada a uma diminuição na proporção de fibras tipo I, que são as fibras oxidativas [30, 32, 33, 36-38]. Este facto explicaria também a maior predisposição para a RI, na medida em que as fibras tipo II, que seriam predominantes, têm uma menor sensibilidade para a insulina.

A formação do músculo começa no desenvolvimento pré-natal, pelo que se especula que, sob determinadas condições (e.g. alimentação materna), a composição das fibras musculares pode variar. Surgem por isso autores que consideram também que alterações na miogénese e particularmente na diferenciação das fibras musculares *in útero*, seriam responsáveis por uma predisposição inata para o desenvolvimento da obesidade [34].

Tendo em conta estes pressupostos, procurou-se avaliar a morfometria das fibras musculares dos doentes obesos, ao nível da proporção e tamanho de cada um dos tipos de fibras, e compará-los com o grupo controlo.

Os resultados obtidos demonstram que não foi detectada nenhuma diferença significativa entre a proporção de fibras tipo I e tipo II nos obesos, que permita determinar a predominância de um dos tipos. No que se refere à dimensão de cada tipo de fibras, também não foram detectadas diferenças, visto a média do CV de cada tipo de fibras, tanto nos obesos como nos controlos, estar dentro dos limites considerados normais. Estes resultados, apesar de não irem de encontro à maior parte das publicações, já foram descritos por outros autores, que também não conseguiram estabelecer uma relação entre a proporção de fibras e a obesidade [68, 69]. De referir que a distribuição das fibras musculares é variável entre populações e também consoante o músculo estudado [34, 61], pelo que a variação dos nossos resultados, em comparação com outros descritos, pode estar associada a estes factores.

Um indivíduo com RI tem, à partida, uma disfunção celular que impossibilita a entrada de glucose nas células. Se essa RI acontecer a nível muscular é expectável que, por se verificar uma diminuição de glucose no interior das fibras, se verifique simultaneamente uma diminuição do glicogénio. No entanto, a maioria dos estudos efectuados não tem reflectido essa suposição, na medida em que o conteúdo de glicogénio intramuscular tem sido equivalente [68] ou apenas ligeiramente inferior [70] entre obesos e controlos.

Para testarmos esta hipótese propusemo-nos avaliar o conteúdo de glicogénio no músculo esquelético dos indivíduos com obesidade mórbida, comparando-o com os indivíduos normais. Desta análise concluímos que 97,1% dos controlos apresenta um conteúdo normal de glicogénio, o que só acontece em 39,5% dos obesos. Os restantes 60,5% dos casos (26

indivíduos) apresentam um aumento dos níveis de glicogénio intramuscular, em vez da diminuição suposta inicialmente, que não se parece correlacionar com nenhum parâmetro, especialmente com o IMC ($p=1,000$) ou o valor de HOMA-IR ($p=0,350$). Este resultado pressupõe que a RI observada em grande parte dos doentes com obesidade pode não estar associada a uma resistência a nível muscular e/ou que a avaliação das variações nos níveis de glucose e glicogénio intramuscular deverá ser feita por métodos mais sensíveis do ponto de vista quantitativo, de forma a conseguirmos detectar pequenas discrepâncias entre indivíduos.

Pela análise dos resultados obtidos com esta investigação e da literatura disponível parece evidente que, apesar de conseguirmos identificar a maior parte das alterações do músculo esquelético dos obesos, não conseguimos estabelecer claramente o momento em que estas se desenvolvem nem qual o contributo de cada uma no desenvolvimento da RI.

Assim sendo, pensamos que os principais desafios desta temática passam pela compreensão e definição mais precisas da natureza e inter-relação entre as alterações observadas nas vias metabólicas da glucose e dos lipídios no músculo esquelético. Além disso, seria importante estabelecer uma cronologia das alterações nos diferentes órgãos metabolicamente mais activos e associados à acção da insulina (e.g. músculo esquelético, fígado, tecido adiposo), de forma a perceber a sequência dos diferentes acontecimentos e, assim, tentar compreender a relação causal entre cada uma das alterações observadas.

Só descobrindo completamente o modo de instalação e desenvolvimento da obesidade e da RI se conseguirão estabelecer estratégias mais efectivas de prevenção e tratamento destas patologias emergentes.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

Com o aumento da incidência da obesidade e da RI surgiram uma série de estudos que nos têm permitido compreender melhor os mecanismos que relacionam as duas doenças, na esperança de, futuramente, se encontrarem terapêuticas efectivas para estas epidemias.

Esta investigação procurou contribuir para a determinação das alterações musculares associadas à obesidade mórbida e ajudar na compreensão do efeito dessas alterações no funcionamento muscular e no desenvolvimento de patologias como a RI. Este estudo trouxe uma vantagem acrescida pelo facto de envolver a análise muscular de um elevado número de indivíduos simultaneamente e possibilitar a comparação de uma população relativamente equitativa de obesos com e sem resistência à insulina.

Actualmente, pensa-se que o processo indutor da RI na obesidade é multifactorial e envolve alterações musculares ao nível da acumulação de lipídios e da capacidade oxidativa mitocondrial. As investigações mais recentes pressupõem um modelo em que a deficiente capacidade de oxidação lipídica no músculo esquelético dos obesos conduz a uma acumulação excessiva de lipídios. Estes, ao acumular-se intracelularmente (IMCL), irão contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina, por alterações nas vias de sinalização intracelular desta hormona.

Neste estudo, determinámos que, efectivamente, a acumulação intramuscular de lipídios é uma característica dos obesos, não tendo, no entanto, havido uma correlação com o IMC ou a RI.

Os doentes estudados apresentavam também uma diminuição do conteúdo mitocondrial, o que pressupõe uma diminuição da actividade oxidativa global do músculo esquelético que, no entanto, não conseguimos relacionar com a RI. As alterações mitocondriais histológicas observadas (presença de RRF e fibras COX negativas) tinham sim correlação com a idade e IMC dos indivíduos.

Contrariamente a outros estudos não conseguimos encontrar diferenças na proporção das fibras tipo I e II que pudessem interferir na capacidade oxidativa muscular ou no desenvolvimento da RI.

Os resultados obtidos permitem-nos concluir que, apesar de existirem alterações a nível muscular nos indivíduos com obesidade mórbida, parece difícil correlacionar isoladamente essas alterações com a RI. O estudo do desenvolvimento da RI deve passar pela análise simultânea de outros tecidos alvo da insulina, nomeadamente o fígado e o tecido adiposo. Só conjugando as possíveis alterações em todos os tecidos se poderá compreender claramente os mecanismos indutores da RI na obesidade mórbida.

BIBLIOGRAFIA

1. Houmard, J., *Intramuscular lipid oxidation and obesity* Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2008. **294**: p. R1111-R1116.
2. Hulver, M.W.D., G. L., *The molecular mechanism linking muscle fat accumulation to insulin resistance*. Proceedings of Nutrition Society, 2004. **63**: p. 375-380.
3. Kelley, D.E., B.H. Goodpaster, and L. Storlien, *Muscle triglyceride and insulin resistance*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 325-46.
4. Sesti, G., *Pathophysiology of insulin resistance*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006. **20**: p. 665-679.
5. Kelley, D.G., B.; Storlien, L., *Muscle Triglyceride and Insulin Resistance*. Annu. Rev. Nutr., 2002a. **22**: p. 325-346
6. Consitt, L.A., J.A. Bell, and J.A. Houmard, *Intramuscular lipid metabolism, insulin action, and obesity*. IUBMB Life, 2009. **61**(1): p. 47-55.
7. de Ferranti, S. and D. Mozaffarian, *The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences*. Clin Chem, 2008. **54**(6): p. 945-55.
8. van Herpen, N.A. and V.B. Schrauwen-Hinderling, *Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity*. Physiol Behav, 2008. **94**(2): p. 231-41.
9. Kelley, D.E., et al., *Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(10): p. 2944-50.
10. Kim JY, H.R., Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA, *Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**: p. E1039-E1044.
11. Pan, D.A., et al., *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action*. Diabetes, 1997. **46**(6): p. 983-8.
12. Goodpaster, B.H., et al., *Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss*. Metabolism, 2000. **49**(4): p. 467-72.
13. Goodpaster, B.H., et al., *Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5755-61.
14. Simoneau, J.A. and D.E. Kelley, *Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM*. J Appl Physiol, 1997. **83**(1): p. 166-71.
15. Boesch, C., et al., *In vivo determination of intra-myocellular lipids in human muscle by means of localized 1H-MR-spectroscopy*. Magn Reson Med, 1997. **37**(4): p. 484-93.
16. Malenfant, P., et al., *Elevated intramyocellular lipid concentration in obese subjects is not reduced after diet and exercise training*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(4): p. E632-9.
17. Guo, Z.K., *Intramyocellular lipid kinetics and insulin resistance*. Lipids Health Dis, 2007. **6**: p. 18.
18. Boden, G., et al., *Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects*. Diabetes, 2001. **50**(7): p. 1612-7.
19. Bonnard, C.e.a., *Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice* The Journal of Clinical Investigation, 2008. **118** (2): p. 789-800.
20. Kelley, D.e.a., *Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes*. Diabetes, 2002b. **51**: p. 2944-2955.
21. Mogensen, M.e.a., *Mitochondrial Respiration Is Decreased in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes*. Diabetes, 2007. **56**: p. 1592-1599.
22. Ritov, V.e.a., *Deficiency of Subsarcolemmal Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes*. Diabetes, 2005. **54**: p. 8-14.
23. Kim, J.A., Y. Wei, and J.R. Sowers, *Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance*. Circ Res, 2008. **102**(4): p. 401-14.
24. Simoneau, J.A., et al., *Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss*. FASEB J, 1999. **13**(14): p. 2051-60.
25. Kiens, B., *Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 205-43.

26. Simoneau, J.e.a., *Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss*. The FASEB Journal, 1999. **13**: p. 2051-2060.
27. He, J., S. Watkins, and D.E. Kelley, *Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity*. Diabetes, 2001. **50**(4): p. 817-23.
28. Ritov, V.B., et al., *Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 8-14.
29. Heilbronn, L.e.a., *Markers of Mitochondrial Biogenesis and Metabolism Are Lower in Overweight and Obese Insulin-Resistant Subjects*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. **92**(4): p. 1467-1473.
30. Adachi, T.e.a., *Fibre type distribution and gene expression levels of both succinate dehydrogenase and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α of fibres in the soleus muscle of Zucker diabetic fatty rats* Exp Physiol, 2007. **92.2** p. 449-455.
31. Morino, K., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction*. Diabetes, 2006. **55 Suppl 2**: p. S9-S15.
32. Oberbach, A.e.a., *Altered Fiber Distribution and Fiber-Specific Glycolytic and Oxidative Enzyme Activity in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes*. Diabetes Care, 2006. **29** (4): p. 895-900.
33. Lillioja, S.e.a., *Skeletal Muscle Capillary Density and Fiber Type Are Possible Determinants of In Vivo Insulin Resistance in Man*. The Journal of Clinical Investigation, 1987. **80**: p. 415-424.
34. Maltin, C.A., *Muscle development and obesity: Is there a relationship?* Organogenesis, 2008. **4**(3): p. 158-69.
35. Gaster, M.e.a., *Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **278**: p. E910-E916.
36. Tanner, C.e.a., *Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2002. **282**: p. E1191-E1196.
37. Kriketos, A.D., et al., *Muscle fibre type composition in infant and adult populations and relationships with obesity*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1997. **21**(9): p. 796-801.
38. Helge, J.W., et al., *Interrelationships between muscle fibre type, substrate oxidation and body fat*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999. **23**(9): p. 986-91.
39. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
40. Kelley, D.E. and B.H. Goodpaster, *Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance*. Diabetes Care, 2001. **24**(5): p. 933-41.
41. Hegarty, B.D., et al., *The role of intramuscular lipid in insulin resistance*. Acta Physiol Scand, 2003. **178**(4): p. 373-83.
42. Storlien, L.H., et al., *Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid*. Diabetes, 1991. **40**(2): p. 280-9.
43. Pagliassotti, M.J., et al., *Tissue oxidative capacity, fuel stores and skeletal muscle fatty acid composition in obesity-prone and obesity-resistant rats*. Obes Res, 1995. **3**(5): p. 459-64.
44. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 171-6.
45. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 677-83.
46. Roden, M., et al., *Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans*. J Clin Invest, 1996. **97**(12): p. 2859-65.
47. McGarry, J.D., *Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 7-18.
48. Chang, L., S.H. Chiang, and A.R. Saltiel, *Insulin signaling and the regulation of glucose transport*. Mol Med, 2004. **10**(7-12): p. 65-71.

49. Goodyear, L.J., et al., *Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2195-204.
50. Zhou, Q., P.L. Dolan, and G.L. Dohm, *Dephosphorylation increases insulin-stimulated receptor kinase activity in skeletal muscle of obese Zucker rats*. Mol Cell Biochem, 1999. **194**(1-2): p. 209-16.
51. Itani, S.I., et al., *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B α* . Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2005-11.
52. Caro, J.F., et al., *Insulin receptor kinase in human skeletal muscle from obese subjects with and without noninsulin dependent diabetes*. J Clin Invest, 1987. **79**(5): p. 1330-7.
53. Hulver, M.W. and G.L. Dohm, *The molecular mechanism linking muscle fat accumulation to insulin resistance*. Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 375-80.
54. Ruderman, N.B. and D. Dean, *Malonyl CoA, long chain fatty acyl CoA and insulin resistance in skeletal muscle*. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 1998. **9**(2-4): p. 295-308.
55. Ruderman, N.B., et al., *Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance*. Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 1): p. E1-E18.
56. Schmitz-Peiffer, C., *Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply*. Cell Signal, 2000. **12**(9-10): p. 583-94.
57. Bossenmaier, B., et al., *Protein kinase C isoforms beta 1 and beta 2 inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor*. Diabetologia, 1997. **40**(7): p. 863-6.
58. Yu, C., et al., *Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50230-6.
59. Mueckler, M., *Insulin resistance and the disruption of Glut4 trafficking in skeletal muscle*. J Clin Invest, 2001. **107**(10): p. 1211-3.
60. Gaster, M.e.a., *GLUT4 Is Reduced in Slow Muscle Fibers of Type 2 Diabetic Patients – Is Insulin Resistance in Type 2 Diabetes a Slow, Type 1 Fiber Disease?*. Diabetes, 2001. **50**: p. 1324-1329.
61. Dubowitz, V.S., C. , ed. *Muscle Biopsy – A Practical Approach*. ed. r. Edition. 2007, Saunders Elsevier.
62. Kriketos, A.D., et al., *Intramyocellular lipid is not significantly increased in healthy young insulin resistant first-degree relatives of diabetic subjects*. Diabetes Care, 2005. **28**(9): p. 2332-3.
63. Larson-Meyer, D.E., et al., *Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects*. Diabetes Care, 2006. **29**(6): p. 1337-44.
64. Chanseume, E. and B. Morio, *Potential mechanisms of muscle mitochondrial dysfunction in aging and obesity and cellular consequences*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(1): p. 306-24.
65. Rooyackers, O.E., et al., *Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15364-9.
66. Levine, J.A., et al., *Interindividual variation in posture allocation: possible role in human obesity*. Science, 2005. **307**(5709): p. 584-6.
67. Chanseume, E., et al., *Chronological approach of diet-induced alterations in muscle mitochondrial functions in rats*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(1): p. 50-9.
68. Guillermin-Regost, C.e.a., *Cellular and Biochemical Features of Skeletal Muscle in Obese Yucatan Minipigs* Obesity 2006. **14** p. 1700-1707.
69. He, J.W., S.; Kelley, D. , *Skeletal Muscle lipid Content and Oxidative Enzyme Activity in Relation to Muscle Fiber Type in Type 2 Diabetes and Obesity*. Diabetes, 2001. **50**: p. 817-823.
70. He, J.K., D. , *Muscle glycogen content in type 2 diabetes mellitus* Am J. Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**: p. E1002-E1007.

ANEXOS

ANEXO I

Dados demográficos dos Indivíduos Obesos
(*Outputs* do programa SPSS®)

Sexo^a

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Masculino	9	20,9	20,9	20,9
	Feminino	34	79,1	79,1	100,0
	Total	43	100,0	100,0	

a. Indivíduo em estudo = Obesos

Descriptive Statistics^a

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Idade	43	22	67	43,35	10,64
Peso	43	80,10	163,50	119,8535	17,3805
Altura	43	150,00	184,00	163,4419	8,1862
IMC	43	33,11	59,29	45,3072	6,7392
HOMA-IR	36	,38	9,23	3,5507	2,1302
Valid N (listwise)	36				

a. Indivíduo em estudo = Obesos

ANEXO II

Resultados da análise morfométrica das fibras musculares de
Indivíduos Normais e Indivíduos Obesos
(Outputs do programa SPSS®)

Descriptive Statistics

Indivíduo em estudo	Sexo		N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Normais	Masculino	Nº fibras tipo I	14	146	259	193,43	39,11
		Nº fibras tipo II	14	141	350	213,71	53,96
		Proporção fibras tipo I	14	36,50	64,75	48,3571	9,7782
		Proporção fibras tipo II	14	35,25	87,50	53,4286	13,4912
		Média_diâmetro fibras tipo I	14	50,20	66,32	55,7043	5,0958
		Média_diâmetro fibras tipo II	14	35,66	67,53	57,2993	8,8235
		Coef Variabilidade I	14	128	226	166,14	23,52
		Coef Variabilidade II	14	146	227	188,00	23,56
		Valid N (listwise)	14				
	Feminino	Nº fibras tipo I	20	150	282	204,80	36,00
		Nº fibras tipo II	20	118	250	195,20	36,00
		Proporção fibras tipo I	20	37,50	70,50	51,2000	9,0006
		Proporção fibras tipo II	20	29,50	62,50	48,8000	9,0006
		Média_diâmetro fibras tipo I	20	37,18	69,35	50,2735	9,3848
		Média_diâmetro fibras tipo II	20	34,00	68,48	49,0940	9,9771
		Coef Variabilidade I	20	142	267	176,25	30,11
		Coef Variabilidade II	20	170	777	242,20	129,73
		Valid N (listwise)	20				
Obesos	Masculino	Nº fibras tipo I	9	142	268	190,44	36,98
		Nº fibras tipo II	9	132	258	209,56	36,98
		Proporção fibras tipo I	9	35,50	67,00	47,6111	9,2442
		Proporção fibras tipo II	9	33,00	64,50	52,3889	9,2442
		Média_diâmetro fibras tipo I	9	37,21	97,12	63,4433	15,4129
		Média_diâmetro fibras tipo II	9	47,28	103,52	63,5100	16,3751
		Coef Variabilidade I	9	142	232	180,33	28,31
		Coef Variabilidade II	9	192	305	227,44	33,63
		Valid N (listwise)	9				
	Feminino	Nº fibras tipo I	34	148	297	219,00	38,22
		Nº fibras tipo II	34	103	252	181,00	38,22
		Proporção fibras tipo I	34	37,00	74,25	54,7500	9,5561
		Proporção fibras tipo II	34	25,75	63,00	45,2500	9,5561
		Média_diâmetro fibras tipo I	34	39,77	66,22	53,3141	6,8096
		Média_diâmetro fibras tipo II	34	36,81	63,37	49,7476	7,9393
		Coef Variabilidade I	34	145	236	181,91	19,36
		Coef Variabilidade II	34	163	285	212,76	29,89
		Valid N (listwise)	34				

Descriptive Statistics

Indivíduo em estudo	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	
Normais	Nº fibras tipo I	34	146	282	200,12	37,16
	Nº fibras tipo II	34	118	350	202,82	44,49
	Proporção fibras tipo I	34	36,50	70,50	50,0294	9,2911
	Proporção fibras tipo II	34	29,50	87,50	50,7059	11,1217
	Média_diâmetro fibras tipo I	34	37,18	69,35	52,5097	8,2644
	Média_diâmetro fibras tipo II	34	34,00	68,48	52,4726	10,2364
	Coef Variabilidade I	34	128	267	172,09	27,67
	Coef Variabilidade II	34	146	777	219,88	103,16
	Valid N (listwise)	34				
Obesos	Nº fibras tipo I	43	142	297	213,02	39,33
	Nº fibras tipo II	43	103	258	186,98	39,33
	Proporção fibras tipo I	43	35,50	74,25	53,2558	9,8317
	Proporção fibras tipo II	43	25,75	64,50	46,7442	9,8317
	Média_diâmetro fibras tipo I	43	37,21	97,12	55,4342	9,9533
	Média_diâmetro fibras tipo II	43	36,81	103,52	52,6281	11,5192
	Coef Variabilidade I	43	142	236	181,58	21,16
	Coef Variabilidade II	43	163	305	215,84	30,89
	Valid N (listwise)	43				

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Proporção fibras tipo I	Between Groups	197,649	1	197,649	2,146	,147
	Within Groups	6908,532	75	92,114		
	Total	7106,180	76			
Proporção fibras tipo II	Between Groups	298,002	1	298,002	2,745	,102
	Within Groups	8141,620	75	108,555		
	Total	8439,622	76			
Média_diâmetro fibras tipo I	Between Groups	162,388	1	162,388	1,899	,172
	Within Groups	6414,726	75	85,530		
	Total	6577,114	76			
Média_diâmetro fibras tipo II	Between Groups	,459	1	,459	,004	,951
	Within Groups	9030,969	75	120,413		
	Total	9031,428	76			
Coef Variabilidade I	Between Groups	1711,111	1	1711,111	2,912	,092
	Within Groups	44067,200	75	587,563		
	Total	45778,312	76			
Coef Variabilidade II	Between Groups	310,688	1	310,688	,060	,808
	Within Groups	391253,4	75	5216,712		
	Total	391564,1	76			

ANEXO III**Resultados da actividade da enzima Citrato Sintetase e dos Complexos I a IV da Cadeia Respiratória Mitocondrial dos Indivíduos Normais e Obesos**
(*Outputs* do programa SPSS®)**Descriptive Statistics**

Indivíduo em estudo	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	
Normais	Citrato Sintetase	31	48	184	117,84	33,06
	Complexo I	31	8	27	16,65	5,20
	Complexo II	31	9	23	16,72	3,15
	Complexo III	31	23	150	68,53	30,19
	Complexo IV	31	12	30	18,36	4,69
	Valid N (listwise)	31				
Obesos	Citrato Sintetase	43	34	180	100,58	29,78
	Complexo I	43	5	49	20,44	10,19
	Complexo II	43	4	34	16,39	6,29
	Complexo III	43	33	157	80,06	26,20
	Complexo IV	43	7	38	17,59	7,67
	Valid N (listwise)	43				

ANEXO IV

Imagens microscópicas representativas dos achados histológicos avaliados em cada amostra

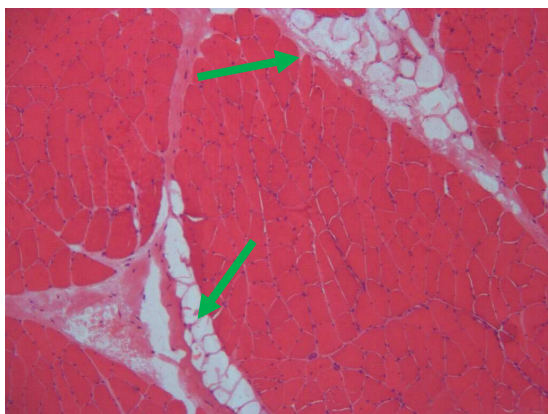


Imagem 1 – Visualização microscópica da acumulação de tecido adiposo intrafascicular (setas verdes) (coloração HE, 100X).

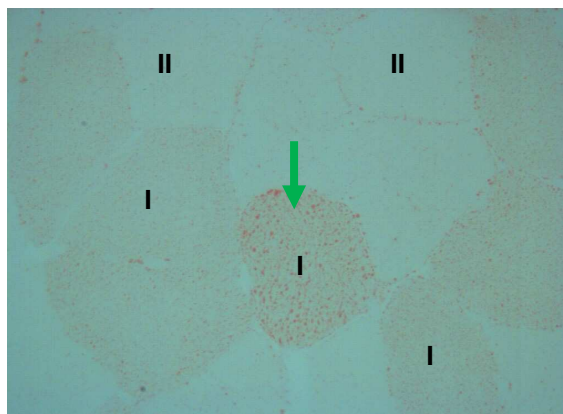


Imagem 2 – Visualização da sobrecarga de tecido adiposo intramiocelular numa fibra muscular do tipo I (seta verde) (coloração Oil Red, 400X).

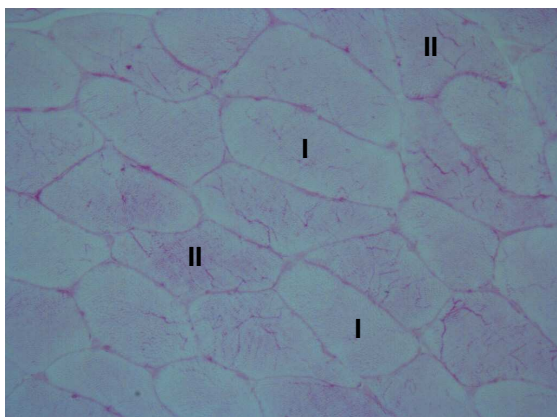


Imagem 3 – Observação do conteúdo de glicogênio, que neste caso é normal (coloração PAS, 400X).

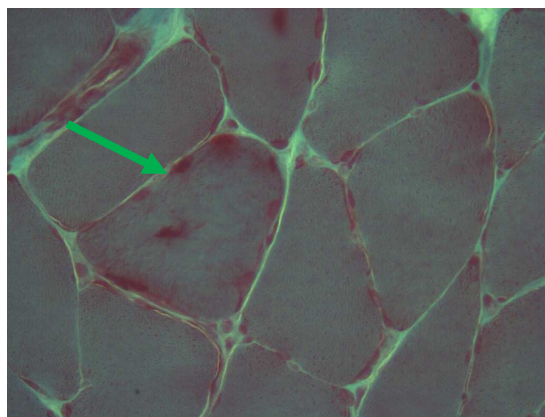


Imagem 4 – Identificação de RRF (seta verde) (coloração de Tricrômio de Gomori modificado, 400X).

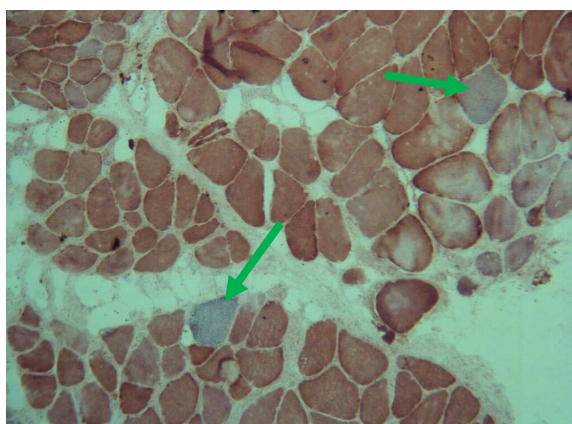


Imagem 5 – Identificação de Fibras COX negativas (setas verdes) (técnica histoenzimática COX-SDH, 100X).

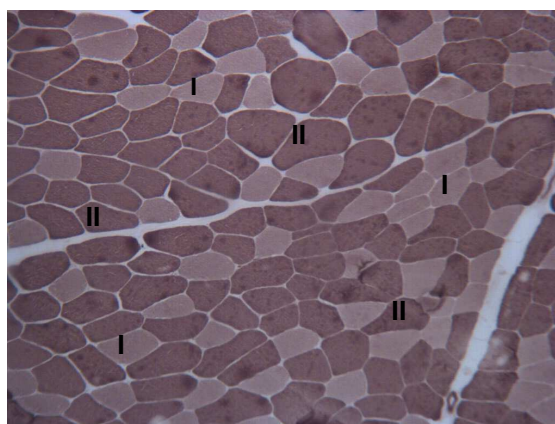


Imagem 6 – Padrão de fibras musculares tipo I e tipo II, útil para análise morfométrica (técnica histoenzimática ATPase 9.4, 100X)