



VIVIANE GLASER

**EFEITOS DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA E SEUS  
METABÓLITOS, METILGLIOXAL E PRODUTOS TERMINAIS  
DE GLICAÇÃO, NA FISIOLOGIA E DINÂMICA  
MITOCONDRIAL NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

Orientador: Alexandra Susana Latini  
Coorientador: Rodrigo Bainy Leal

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2014

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

Glaser, Viviane

Efeitos da hiperglicemia crônica e seus metabólitos, metilglicoxal e produtos terminais de glicação, na fisiologia e dinâmica mitocondrial no sistema nervoso central / Viviane Glaser ; orientadora, Alexandra Susana Latini ; coorientador, Rodrigo Bairy Leal. - Florianópolis, SC, 2014.

117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Hiperglicemia. 3. Mitocôndria. 4. Neurotoxicidade. I. Latini, Alexandra Susana. II. Bairy Leal, Rodrigo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

VIVIANE GLASER

**“EFEITOS DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA E SEUS  
METABÓLITOS, METILGLIOXAL E PRODUTOS  
TERMINAIS DE GLICAÇÃO, NA FISIOLOGIA E  
DINÂMICA MITOCONDRIAL NO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL”.**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de  
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e  
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina

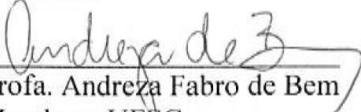
Florianópolis, 27 de fevereiro de 2014.

\_\_\_\_\_  
Prof. Rodrigo Bainy Leal  
Coordenador do Curso

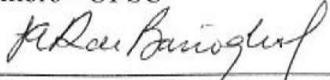
Banca Examinadora:

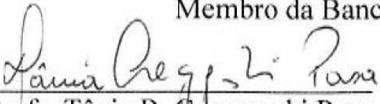
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Rodrigo Bainy Leal  
Co-orientador – UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Ana Lucia de Paul  
Membro da Banca Externo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Andreza Fabro de Bem  
Membro - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Evelise M. Nazari  
Membro - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Susana E. R. de Barroglia  
Membro da Banca Externo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Tânia B. Creczynski Pasa  
Membro - UFSC



## AGRADECIMENTOS

Algumas vezes, os agradecimentos se tornam mais difíceis de escrever do que o próprio trabalho. Isso porque não somos uma ilha, e no fim de uma caminhada sempre existiram muitas pessoas que nos ajudaram, não somente na elaboração do trabalho em si, mas fazendo com que não desanimássemos quando algo, aparentemente, não estava indo bem. De alguma forma, esquecer-me-ei de citar nomes nesta seção, e por isso tentarei evitá-los, mas quero que todos que estiveram comigo nesta caminhada acadêmica, nem que por poucos momentos, se sintam agradecidos, pois de alguma forma contribuíram para que neste momento eu esteja concluindo esta etapa.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus pais, Rainoldo e Crista Glaser, pela oportunidade que sempre me ofereceram de seguir com os meus objetivos. Por todo apoio moral e financeiro, por serem meu alicerce e meu porto seguro.

Da mesma forma em primeiro lugar, mas de “maneira acadêmica” quero agradecer à minha orientadora Prof. Dra. Alexandra Latini, que sempre me auxiliou em todas as áreas envolvidas com a profissão e pelo “ser” professor, já que essa escolha profissional é uma “condição” e não somente um emprego como outro qualquer. Com certeza, será sempre um dos meus exemplos a seguir nesta carreira e na área de pesquisa.

Agradeço também ao meu coorientador, Prof. Dr. Rodrigo Bairy Leal, e a todos os outros professores que abriram a porta de seus laboratórios para que eu pudesse realizar o meu trabalho. Isso inclui a Prof. Dra. Ana Lucia de Paul e a Prof. Dra. Susana Genti-Raimondi, que acompanharam meu trabalho durante o período de doutorado sanduíche, em Córdoba, Argentina.

Aos meus amigos de laboratório (e fora dele também): Aderbal, Aline, Ana Júlia, Anelise, Débora, Fritz, Karina, Lucila, Paulo, Priscila e Roberta.

Aos professores da pós-graduação em Neurociências, e ao secretário Nivaldo.

Aos técnicos do LAMEB e do LCME da UFSC, pelo auxílio metodológico.

Aos meus amigos, que de perto ou de longe, antigos e novos, da pós-graduação UFSC e fora dela, acompanharam este trabalho.

À FAPESC pela bolsa doutoral concedida.



## RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica comum, caracterizada por um estado de hiperglicemia persistente, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Durante um estado de hiperglicemia crônica como ocorre no DM, sabe-se que há o acúmulo de compostos carbonílicos reativos, como o metilglioxal (MG), o qual é o principal precursor de produtos terminais de glicação (AGEs). Os efeitos destes metabólitos gerados em situações de DM no sistema nervoso central (SNC) ainda permanecem desconhecidos, desta forma, neste trabalho foi investigado o efeito da hiperglicemia crônica e seus metabólitos, MG e AGEs, sobre a fisiologia e dinâmica mitocondrial no SNC. Para isso, a hiperglicemia crônica foi induzida em ratos Wistar pela injeção de uma dose única de estreptozotocina (STZ, 55 mg/kg, intraperitonealmente). Os animais com glicemia > 200mg/dL foram considerados hiperglicêmicos, sendo que alguns destes animais foram mantidos nestas condições por 60 dias (grupo STZ) e outros receberam injeção subcutânea de insulina (1,5 UI, 2 vezes ao dia; grupo STZ+INS), para a normalização da glicemia. Animais controle receberam injeção de veículo ao invés de STZ. Foi observado que a hiperglicemia crônica não alterou a dinâmica ou a biogênese mitocondrial em córtex cerebral de ratos. Entretanto, a administração de insulina causou um aumento na expressão de Tfam e no tamanho mitocondrial. Por outro lado, foi observado um grande aumento no número de mitocôndrias no bulbo olfatório de animais do grupo STZ. Com o objetivo de melhor compreender os efeitos dos metabólitos acumulados durante este estado hiperglicêmico crônico, analisou-se os efeitos da exposição ao MG e AGEs na dinâmica e fisiologia mitocondrial em cultura celular de astrócitos. Foi observado que a exposição a AGEs induziu uma reorganização mitocondrial, por reduzir o tamanho e aumentar o número de mitocôndrias em células C6 de astroglioma. Entretanto, esta característica que indica o aumento da fissão mitocondrial não foi acompanhada por uma alteração da proteína de fusão Mfn2 ou da proteína de fissão Drp1. Além disso, outro metabólito relacionado à hiperglicemia, o MG, provocou um aumento no consumo de oxigênio (respiração basal e estado IV) e diminuiu o controle respiratório nas células C6, indicando que este metabólito induziu o desacoplamento da mitocôndria. Em concordância com estes resultados, a exposição a AGEs induziu um redução do potencial de

membrana mitocondrial em cultura celular primária de astrócitos corticais de rato, sugerindo que a alteração da dinâmica mitocondrial está intimamente relacionada com o efeito desacoplador do MG. Ainda, o aumento do conteúdo de mitocôndrias despolarizadas não estimulou a autofagia, indicando que organelas disfuncionais, as quais são geradoras de espécies reativas de oxigênio, permaneçam na célula neural. Em conclusão, a hiperglicemia crônica e seus metabólitos alteram a dinâmica e a fisiologia mitocondrial em células neurais. Este fenômeno pode levar a célula à morte e, além disso, contribuir para a maior predisposição que os pacientes diabéticos possuem para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

**Palavras-chave:** hiperglicemia, metilglioxal, produtos terminais de glicação, fisiologia mitocondrial, dinâmica mitocondrial, mitofagia, neurotoxicidade.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a common metabolic disease characterized by a state of persistent hyperglycemia. The disorder is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. It is known that chronic hyperglycemic conditions elicit the accumulation of the reactive carbonyl compound methylglyoxal (MG), which has been involved in the formation of advanced glycation end products (AGE). The impact of these compounds on the central nervous system (CNS) is virtually unknown. Therefore, the effect of chronic hyperglycemia and the related metabolites, MG and AGEs, was here investigated on mitochondrial physiology and dynamics in the CNS. For this, chronic hyperglycemia was induced in Wistar rats by injecting a single dose of streptozotocin (STZ, 55 mg/kg, intraperitoneally). Animals with glycaemia > 200mg/dL were considered hyperglycemic. Some animals were maintained in this condition for 60 days (STZ group), and others received daily injections of insulin (1.5 IU, twice a day; STZ+INS group) in order to normalize blood glucose levels. Controls animals received a single injection of vehicle instead of STZ. It was observed that chronic hyperglycemia did not change mitochondrial dynamics or biogenesis in cerebral cortex of rats. However, insulin administration elicited increased Tfam expression and mitochondrial size. In contrast, a marked increase in mitochondrial number was observed in olfactory bulb preparations from STZ-treated animals. In order to better understand the effect of the accumulating metabolites under this hyperglycemic state, we then analyzed the individual effect of MG and AGEs on mitochondria dynamic or physiology in cultured astrocytes. It was observed that AGEs treatment induced mitochondrial reorganization, by reducing the size and increasing the number of this organelle in C6 astrogloma cells. However, this phenomenon that points to increased mitochondria fission, was accompanied by unchanged content of Mfn2 (fusion protein) and Drp1 (fission protein) proteins. In addition, the other hyperglycemic-linked metabolite, MG, provoked increased oxygen consumption (basal respiration and respiring state IV) and reduced the mitochondrial respiratory control, indicating MG-induced uncoupling of mitochondria. In agreement, AGEs provoked reduced mitochondrial membrane potential on rat primary cortical astrocyte cell culture, suggesting that the altered mitochondrial dynamics is directly related to the MG uncoupling properties.

Furthermore, the increased content of uncoupled mitochondria did not stimulate autophagy, indicating that dysfunctional reactive oxygen species-producing organelles are being accumulated in the nerve cell. In conclusion, chronic hyperglycemia and hyperglycemia-linked metabolites (MG and AGEs) disrupts mitochondrial dynamics and physiology in nerve cells. The phenomenon might induce cell death, and therefore, a higher predisposition for neurodegenerative disorders development in patients with DM.

**Keywords:** hyperglycemia, methylglyoxal, advanced glycation end products, mitochondria physiology, mitochondrial dynamics, mitophagy, neurotoxicity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**$\Delta\psi_m$** : Potencial de membrana mitocondrial  
**ADP**: Difosfato de Adenosina  
**AGEs**: Produtos terminais de glicação  
**AKT**: Proteína cinase serina-treonina  
**AMO**: acetol mono-oxigenase  
**AMP**: Monofosfato de adenosina  
**AMPK**: Proteína cinase dependente de AMP  
**ATP**: Trifosfato de adenosina  
**BSA**: Albumina sérica bovina  
**C6**: Linhagem celular de astroglioma de rato  
**CamKII $\alpha$** : Proteína cinase I $\alpha$  dependente de cálcio-calmodulina  
**cDNA**: Ácido Desoxirribonucleico complementar  
**CDK1**: Proteína cinase 1 dependente de ciclina  
**CEUA**: Comitê de ética no uso de animais  
**CoQ**: Coenzima Q  
**COXI**: Citocromo oxidase, subunidade I (subunidade do complexo IV)  
**CR**: Cadeia respiratória  
**CREB**: proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP cíclico (cAMP)  
**DCNT**: Doenças crônicas não transmissíveis  
**DM**: Diabetes mellitus  
**DM2**: Diabetes mellitus tipo 2  
**DMEM**: Meio Eagle's com modificação de Dubelcco  
**DMSO**: Dimetil sulfóxido  
**DNA**: Ácido desoxirribonucleico  
**dNTP**: Desoxirribonucleotídeos trifosfato  
**Drp1**: Proteína 1 relacionada à dinamina  
**DTT**: Ditiotreitól  
**EDTA**: Ácido etilenodiaminotetracético  
**eNOS**: Óxido nítrico sintase endotelial  
**ERK1/2**: cinase regulada por sinal extracelular  
**ERR $\alpha$** : Receptor  $\alpha$  relacionado ao estrogênio  
**EROs**: Espécies reativas de oxigênio  
**FAD**: Flavina adenina dinucleotídeo  
**FADH<sub>2</sub>**: Flavina adenina dinucleotídeo, forma reduzida  
**FCCP**: Carbonilcianeto-4-trifluorometoxi fenil-hidroxona  
**Fis1**: Proteína de fissão

**FMN:** Flavina mononucleotídeo  
**GLUT:** Transportador de glicose  
**GSH:** Glutaciona  
**i.p.:** Intraperitoneal  
**INS:** Insulina  
**IRS:** Substrato do receptor de insulina  
**JAK-2:** *Janus* cinase 2  
**Keap1:** *Kelch-like ECH-associated protein 1*  
**LC3:** *Microtubule-associated protein 1 light chain 3*  
**L-DOPA:** L-3,4-dihidroxifenilalanina  
**MAPK:** Proteínas cinases ativadas por mitógenos  
**Mfn1:** Mitofusina 1  
**Mfn2:** Mitofusina 2  
**MG:** Metilglioxal  
**MG-BSA:** Albumina oxidada por metilglioxal  
**MiD:** Proteína de dinâmica mitocondrial  
**Mief:** Fator de alongação mitocondrial ligado à membrana mitocondrial externa  
**Mif:** Fator de fissão mitocondrial  
**mtDNA:** DNA mitocondrial  
**mtTFB:** Fator de transcrição mitocondrial B1  
**mRNA:** RNA mensageiro  
**MTT:** Brometo de 3-(4,5)-dimetilialzolib-2,5 difeniltetrazólio  
**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida e adenina dinucleotídeo  
**NADH:** Nicotinamida e adenina dinucleotídeo, forma reduzida  
**NADPH:** Fosfato de nicotinamida e adenina dinucleotídeo, forma reduzida  
**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>:** Vanadato de sódio  
**NDUFA6:** NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo  $\alpha$  1,6 (subunidade do complexo I)  
**NF- $\kappa$ B:** Fator nuclear kappa B  
**NRF1 e 2:** Fator nuclear de respiração 1 e 2  
**Nrf2:** Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2  
**Opa1:** Proteína 1 de atrofia óptica  
**Oma1:** *protease with overlapping activities with m-AAA proteases*  
**PAI-1:** Inibidor do ativador do plasminogênio  
**PBS:** Solução salina tamponada com fosfato  
**PGC-1 $\alpha$ :** Coativador-1 $\alpha$  do receptor ativado por proliferador do peroxissomo  
**PI3K:** Fosfatidilinositol 3-cinase

**PINK:** proteína cinase 1 induzida por proteína *fosfatase homóloga a tensina (PTEN)*

**PKC:** Proteína cinase C

**PMSF:** Fluoreto de sulfonilmetilfenil

**RAGEs:** Receptores para produtos terminais de glicação

**RNA:** Ácido ribonucleico

**ROCK1:** *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1*

**RT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

**s.c.:** Subcutâneo

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

**SFB:** Soro fetal bovino

**SHC:** *Src homology collagen*

**SIRT1:** Sirtuína 1

**SPSS:** Pacote estatístico para ciências sociais

**SSAO:** Amina oxidase sensível à ação de semicarbazida

**STZ:** Estreptozotocina

**SUMO1:** *small ubiquitin-like modifier 1*

**TBS:** Solução Salina Tamponada com Tris

**TBS-T:** Solução Salina Tamponada com Tris e Tween

**Tfam:** Fator A de transcrição mitocondrial

**TOM:** Transportador de membrana mitocondrial externa

**UDP-GlcNAc:** UDP-N-acetilglicosamina

**UI:** Unidades internacionais

**VDAC:** Canal aniônico dependente de voltagem

**VEGF:** Fator de crescimento do endotélio vascular

**VLDL:** Lipoproteínas de muito baixa intensidade



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura da mitocôndria (A) e proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (B).....	24
<b>Figura 2.</b> Dinâmica mitocondrial. A) Mecanismo de fusão mitocondrial. B) Mecanismo de fissão mitocondrial.....	28
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida mitocondrial.....	32
<b>Figura 4.</b> Formação de produtos terminais de glicação (AGEs).....	41
<b>Figura 5.</b> Formação e desintoxicação de metilglioxal (MG).....	43
<b>Figura 6.</b> Secreção de insulina pelas células $\beta$ pancreáticas.....	45
<b>Figura 7.</b> Modelo simplificado dos processos de sinalização intracelular induzidos pela interação da insulina ao seu receptor.....	47
<b>Figura 8.</b> Gráfico representativo das curvas que mostram o consumo de oxigênio por um sistema celular em um experimento de respirometria clássica.....	60
<b>Figura 9.</b> Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina, e da administração exógena de insulina, sobre a massa corporal (A), morfologia das ilhotas de Langerhans (B), glicemia (C), triglicérides plasmáticos (D) e insulinemia (E) de ratos Wistar...63	63
<b>Figura 10.</b> Conteúdo de proteínas oxidadas por metilglioxal (imunofluorescência) de proteínas oxidadas por metilglioxal em córtex cerebral de ratos Wistar submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina e/ou tratados com insulina.....	64
<b>Figura 11.</b> Conteúdo das proteínas Mfn1 (A) e Drp1 (B) em homogenato de córtex cerebral de ratos Wistar submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina, e/ou tratados com insulina.....	65
<b>Figura 12.</b> Expressão relativa de genes que codificam para as proteínas NDUF6 (A), COXI (B), Tfam (C) e NRF1 (D) no córtex cerebral de ratos Wistar submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina, e/ou tratados com insulina.....	67

<b>Figura 13.</b> Conteúdo e morfometria mitocondrial no córtex cerebral de ratos Wistar submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina, e/ou tratados com insulina.....	69
<b>Figura 14.</b> Conteúdo mitocondrial no bulbo olfatório de ratos Wistar submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina, e/ou tratados com insulina.....	71
<b>Figura 15.</b> Efeito <i>in vitro</i> de produtos terminais de glicação sobre o conteúdo e morfometria mitocondrial em células C6 de astroglioma de rato.....	73
<b>Figura 16.</b> Efeito <i>in vitro</i> de MG-BSA ou metilglioxal sobre a viabilidade celular (redução do MTT) em células C6 de astroglioma de rato.....	74
<b>Figura 17.</b> Efeito <i>in vitro</i> de produtos terminais de glicação sobre o conteúdo de Mfn1 (A) e Drp1 (B) em células C6 de astroglioma de rato.....	75
<b>Figura 18.</b> Efeito <i>in vitro</i> de produtos terminais de glicação sobre o conteúdo de vacúolos autofágicos em células C6 de astroglioma de rato.....	76
<b>Figura 19.</b> Efeito <i>in vitro</i> de produtos terminais de glicação sobre o conteúdo da proteína LC3B em células C6 de astroglioma de rato.....	77
<b>Figura 20.</b> Efeito <i>in vitro</i> de metilglioxal sobre parâmetros de respiração celular em células C6 e astroglioma de rato.....	78
<b>Figura 21.</b> Efeito <i>in vitro</i> de metilglioxal sobre a respiração basal em células C6 de astroglioma de rato.....	79
<b>Figura 22.</b> Estrutura química dos compostos metilglioxal, 2,3-butanodiona e ácido octanóico.....	80
<b>Figura 23.</b> Efeito <i>in vitro</i> de ácido octanóico e 2,3-butanodiona sobre a respiração basal em células C6 de astroglioma de rato.....	80
<b>Figura 24.</b> Efeito <i>in vitro</i> de produtos terminais de glicação sobre o potencial de membrana mitocondrial observado através do uso da sonda JC-1, em cultura primária de astrócitos corticais de ratos Wistar.....	82
<b>Figura 25.</b> Efeitos de MG e AGEs sobre a dinâmica mitocondrial em astrócitos.....	89

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Desenho experimental. Desenvolvimento de hiperglicemia pela administração de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar adultos.....	52
--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência de <i>primers</i> utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real.....	54
--	----



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1. MITOCÔNDRIA.....	23
1.1.1. Morfologia e fisiologia mitocondrial.....	23
1.1.2. Dinâmica mitocondrial.....	26
1.1.3. Biogênese mitocondrial.....	33
1.2. DIABETES MELLITUS.....	36
1.2.1. Aumento da via do poliols.....	37
1.2.2. Ativação da PKC.....	38
1.2.3. Aumento da via das hexosaminas.....	39
1.2.4. Formação de AGEs.....	39
1.2.5. Metilglioxal (MG).....	42
1.3. HORMÔNIO INSULINA.....	44
1.4. MECANISMOS DE NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADOS AO DM.....	47
1.5. HIPÓTESE.....	49
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	49
2.1. OBJETIVO GERAL.....	49
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	50
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
4.1. ANIMAIS.....	51
4.2.2. MODELO EXPERIMENTAL DE DM: INDUÇÃO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL (I.P.) DE ESTREPTOZOTOCINA (STZ).....	51
4.3. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DRP1 E MFN1 POR WESTERN BLOT.....	53

4.4. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TFAM, NRF1, NDUFA6 E COXI POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL (RT-PCR).....	54
4.5. IMUNOFLOURESCÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS OXIDADAS POR MG.....	55
4.6. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	56
4.7. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE ASTROGLIOMA C6.....	56
4.8. FORMAÇÃO DE AGES A PARTIR DE MG (MG-BSA).....	56
4.9. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	57
4.10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	57
4.11. CITOMETRIA DE FLUXO.....	58
4.12. IDENTIFICAÇÃO DE AUTOFAGIA POR IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	58
4.13. RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO.....	59
4.14. CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS.....	61
4.14. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	61
4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
5.1. DINÂMICA E BIOGÊNESE MITOCONDRIAL EM MODELO ANIMAL DE HIPERGLICEMIA CRÔNICA E EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA.....	62
5.1.1. Caracterização do modelo de hiperglicemia crônica induzido pela administração de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar.....	62
5.1.2. Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e/ou da insulina (INS) sobre o conteúdo de proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial no córtex cerebral de ratos Wistar.....	65
5.1.3. Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e/ou da insulina (INS) sobre o conteúdo de	

mRNA de proteínas envolvidas na fisiologia mitocondrial no córtex cerebral de ratos Wistar.....	66
5.1.4. Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e/o da insulina (INS) sobre o conteúdo e morfometria mitocondrial no córtex cerebral e no bulbo olfatório de ratos Wistar.....	68
5.2. DINÂMICA E FISILOGIA MITOCONDRIAL EM CULTURA DE CÉLULAS ASTROCITÁRIAS EXPOSTAS A AGES E/OU MG.....	72
5.2.1. Efeito dos produtos terminais de glicação (AGEs) no conteúdo e morfometria mitocondrial em células C6 de astroglioma de rato.....	72
5.2.2. Efeito dos produtos terminais de glicação (AGEs) e do metilglioxal sobre a viabilidade celular em células C6 de astroglioma de rato.....	74
5.2.3. Efeito dos produtos terminais de glicação (AGEs) sobre a dinâmica mitocondrial em células C6 de astroglioma de rato.....	74
5.2.4. Efeito dos produtos terminais de glicação (AGEs) sobre a autofagia em células C6 de astroglioma de rato.....	75
5.2.5. Efeito do metilglioxal (MG) sobre a fisiologia mitocondrial em células C6 de astroglioma de rato.....	77
5.2.6. Efeito de concentrações crescentes de metilglioxal (MG) sobre a respiração basal em células C6 de astroglioma de rato.....	79
5.2.7. Comparação do efeito do metilglioxal (MG) no aumento do consumo de oxigênio com um desacoplador clássico e com um composto estruturalmente similar em células C6 de astroglioma de rato.....	80
5.2.8. Efeito dos produtos terminais de glicação (AGEs) sobre o potencial de membrana mitocondrial em cultura primária de astrócitos corticais.....	81
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>

<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>90</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>

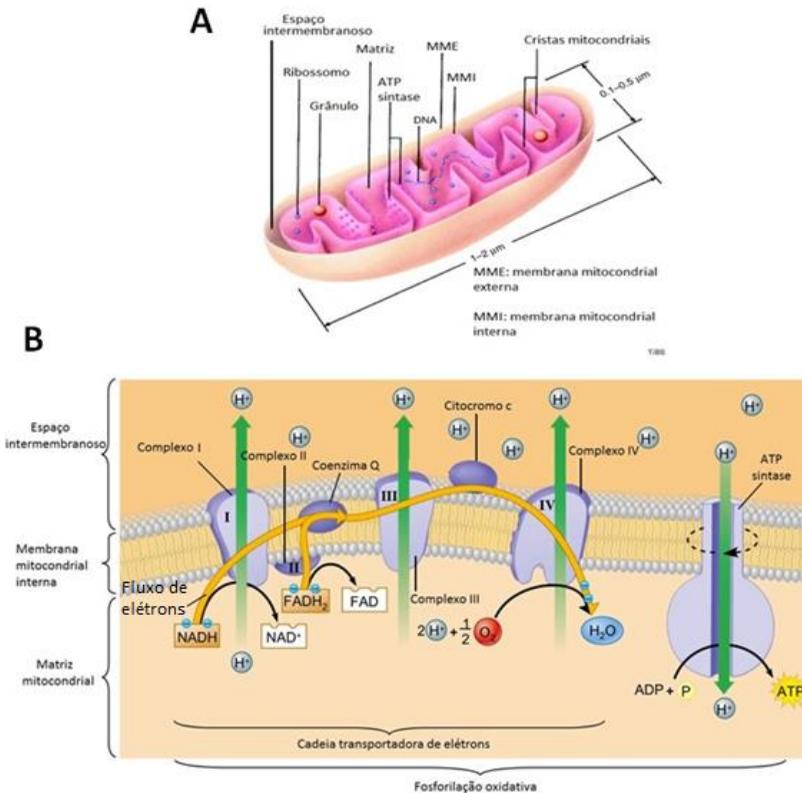
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. MITOCÔNDRIA

### 1.1.1. Morfologia e fisiologia mitocondrial

A mitocôndria é a organela celular responsável pela maior produção líquida de energia. Eugene Kennedy e Albert Lehninger descreveram a mais de 50 anos que a mitocôndria contém proteínas envolvidas com a oxidação de nutrientes, bem como, com a respiração celular com concomitante geração de ATP (Kennedy e Lehninger, 1950, 1951; Lehninger e Smith, 1949). O surgimento desta organela nos remete à origem das células eucariontes, quando a atmosfera terrestre começou a se tornar rica em oxigênio (O<sub>2</sub>). Sugere-se que as mitocôndrias teriam surgido a partir da fagocitose de um procarionte aeróbio (uma bactéria) por uma célula pré-eucarionte anaeróbia. No interior desta última, a digestão intracelular do material fagocitado não foi realizada, e o procarionte teria permanecido no interior da célula pré-eucarionte, em uma relação de endossimbiose, dando origem às mitocôndrias (Alberts et al., 2010).

A mitocôndria está delimitada por duas membranas, a membrana externa e a membrana interna; entre ambas é encontrado um espaço denominado espaço intermembranoso. A membrana interna é formada por pregas que se invaginam para o interior da matriz mitocondrial, denominadas cristas mitocondriais. Ainda, a membrana interna circunscreve a matriz mitocondrial, um componente solúvel, onde são encontradas principalmente as enzimas responsáveis pelo ciclo de Krebs, pela  $\beta$ -oxidação e pela oxidação de aminoácidos; além do DNA mitocondrial, o qual codifica para treze das subunidades proteicas que constituem a cadeia respiratória (Nelson e Cox, 2004). Na membrana interna, estão localizados os cinco complexos enzimáticos responsáveis pela produção de energia, denominados de cadeia respiratória (CR, complexos I-V, Figura 1).



**Figura 1.** Estrutura da mitocôndria (A) e proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (B). (Adaptado de Frey e Mannella, 2000 e de *Pearson Education*).

A oxidação dos principais substratos energéticos, glicose, aminoácidos, ácidos graxos etc., gera as coenzimas ricas em energia, NADH e FADH<sub>2</sub>. Cada uma dessas coenzimas reduzidas pode doar um par de elétrons através dos centros de óxido-redução presentes nas proteínas da CR, sendo o oxigênio molecular o aceptor final de elétrons, o qual é convertido em água metabólica.

O complexo I (ou NADH – Coenzima Q redutase) transfere os elétrons do NADH, principalmente formado a partir da glicólise e do ciclo de Krebs, para a coenzima Q (CoQ). O complexo I é o maior componente proteico presente na membrana mitocondrial interna e é formado por sete subunidades codificadas pelo DNA mitocondrial e por trinta e sete subunidades codificadas pelo DNA nuclear (Di Donato,

2000; Koopman et al., 2013; Voet e Voet, 1995). O complexo I apresenta uma massa de aproximadamente 850 kDa, contém uma molécula de flavina mononucleotídeo (FMN) como grupamento prostético, e de seis a sete centros ferro-enxofre que participam do processo de transferência de elétrons. FMN e CoQ podem admitir três estados de oxidação, embora o NADH possa transferir dois elétrons simultaneamente, FMN e CoQ são capazes de aceitar um elétron de cada vez, visto que suas formas semiquinonas são estáveis.

O complexo II (ou Succinato – Coenzima Q redutase) é composto por quatro subunidades proteicas, incluindo a enzima dimérica succinato desidrogenase, componente do ciclo de Krebs. Este complexo é totalmente codificado pelo DNA nuclear, sem a participação do DNA mitocondrial. Este complexo transfere os elétrons do succinato para a CoQ. Este processo envolve a participação de um FAD covalentemente ligado à succinato desidrogenase, dois centros ferro-enxofre e um citocromo *b560* (Di Donato, 2000; Voet e Voet, 1995).

O complexo III (ou coenzima Q – citocromo *c* redutase) transfere os elétrons da CoQ para o carreador móvel de elétrons, o citocromo *c*. O complexo III está arranjado assimetricamente na membrana mitocondrial interna e contém onze subunidades, onde três delas contém centros redox que são utilizados na formação de energia. Essas três unidades-chaves estão representadas pelo citocromo *b* (único codificado pelo genoma mitocondrial), um centro ferro-enxofre e o citocromo *c1* (Saraste, 1990).

O complexo IV (ou citocromo *c* oxidase) é o complexo terminal da cadeia transportadora de elétrons. O complexo IV transfere os elétrons a partir do ferrocitocromo *c* para o oxigênio molecular. O complexo IV consiste de catorze subunidades polipeptídicas (Barrientos et al., 2002; Koopman et al., 2013). As três maiores subunidades formam o centro catalítico da enzima e são codificadas pelo DNA mitocondrial. A subunidade I contém os grupamentos heme e um dos íons Cu (CuB), enquanto que a subunidade II contém um centro de Cu binuclear (CuA) (Capaldi, 1990). A subunidade III não apresenta grupamento prostético e não parece estar envolvida na transferência de elétrons, mas favorece a estabilidade estrutural. As demais subunidades, todas codificadas pelo DNA nuclear, parecem não ser essenciais ao mecanismo catalítico básico de redução de oxigênio e à transferência de prótons (Barrientos et al., 2002; Saraste, 1990). A citocromo *c* oxidase é uma enzima chave na produção energética mitocondrial, uma vez que a reação redox entre o citocromo *c* e o oxigênio molecular é

essencialmente irreversível (Poyton e McEwen, 1996). Além disso, sabe-se que a atividade desta enzima é regulada por relações aumentadas de ATP/ADP no interior da mitocôndria, e pelas concentrações do radical óxido nítrico (Cooper e Brown, 2008).

O complexo V (ou ATP sintase) realiza a síntese de ATP. Este complexo é formado por dezenove subunidades, sendo duas codificadas pelo DNA mitocondrial (ATP 6 e 8) e dezessete codificadas pelo DNA nuclear (Koopman et al., 2013). Funcionalmente e estruturalmente, o complexo V é formado por um componente catalítico solúvel na matriz mitocondrial (F1-ATPase) e um componente de membrana hidrofóbico (Fo-ATPase) que contém um canal de prótons e é sensível a oligomicina (Saraste, 1990).

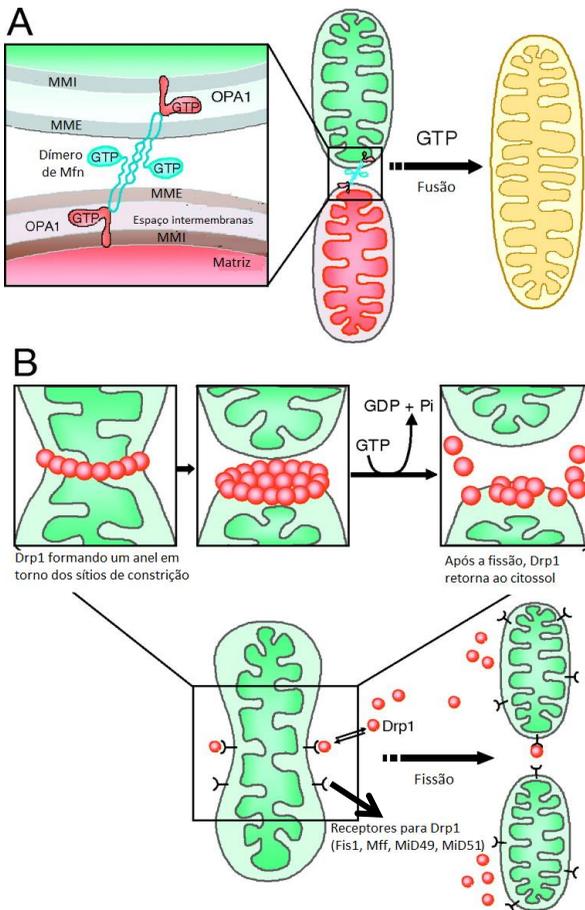
O processo de transferência de elétrons na CR encontra-se acoplado à translocação simultânea de prótons através da membrana mitocondrial interna a partir da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso. Para cada par de elétrons transferidos para o oxigênio molecular, quatro prótons são bombeados para o espaço intermembranoso pelo complexo I, quatro pelo complexo III, e dois pelo complexo IV. Este bombeamento de prótons cria um gradiente eletroquímico que determina uma polarização da membrana mitocondrial interna (potencial de membrana mitocondrial;  $\Delta\psi_m$ ). De acordo com a teoria quimiosmótica, proposta por Peter Mitchell em 1979, este gradiente é a força motriz que dirige a síntese de ATP à medida que os prótons fluem passivamente de volta para a matriz mitocondrial, através de um poro de prótons associado à ATP sintase no complexo V (Babcock e Wikstrom, 1992; Voet e Voet, 1995).

### **1.1.2. Dinâmica mitocondrial**

Em 1990, observações microscópicas reestabeleceram a visão original de que a mitocôndria é uma organela filamentosa tubular e estática. Contrariamente ao que se acreditava até este momento, observou-se que a mitocôndria é uma organela altamente dinâmica, constantemente alterando sua forma e localização dentro das células (Bereiter-Hahn, 1990; Bereiter-Hahn e Voth, 1994). As mitocôndrias das células do sistema nervoso central encontram-se formando malhas ou redes mitocondriais, similares ao retículo endoplasmático (Chinnery e Schon, 2003), e podem fundir ou fissionar a partir desta malha, determinando os processos de fusão e fissão mitocondrial, respectivamente (Twig et al., 2008b). A dinâmica entre estes dois processos determina a morfologia mitocondrial, a qual estará

caracterizada por mitocôndrias tubulares ou esféricas dependendo das demandas energéticas regionais dentro de uma mesma célula (Benard e Karbowski, 2009). Quando o processo de fissão está favorecido, observam-se mitocôndrias fragmentadas, esféricas, enquanto um excesso de fusão resulta em mitocôndrias tubulares, alongadas (Yoon et al., 2003).

O processo de fusão mitocondrial é finamente regulado pelas proteínas mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2), presentes na membrana externa da mitocôndria (Santel e Fuller, 2001) e pela Opa1 (proteína da atrofia óptica 1), presente na membrana interna (Figura 3) (Delettre et al., 2001). Embora Opa1 esteja localizado na membrana mitocondrial interna, esta proteína também regula a fusão da membrana mitocondrial externa, provavelmente pela interação com as mitofusinas (Cipolat et al., 2004; Sesaki et al., 2003). O processo de fusão das membranas mitocondriais é regulado pela clivagem proteolítica de Opa1 pela Oma1 (*protease with overlapping activities with m-AAA proteases*), o qual ocorre quando há um decréscimo no  $\Delta\psi_m$  (Head et al., 2009). Assim, caso houver uma perda do  $\Delta\psi_m$ , o processo de fusão não ocorrerá devido à clivagem de OPA1.



**Figura 2.** Dinâmica mitocondrial. A) Mecanismo de fusão mitocondrial. MMI, membrana mitocondrial interna; MME, membrana mitocondrial externa; Mfn1 e 2, mitofusinas 1 e 2; OPA1, proteína 1 de atrofia óptica. B) Mecanismo de fissão mitocondrial. Drp1, proteína 1 relacionada à dinamina; Fis1, proteína de fissão; MiD 49 e 51, proteína de dinâmica mitocondrial; Mff, fator de fissão mitocondrial (Adaptado de Nisoli e Carruba, 2006).

Para que a fusão entre as membranas externas de mitocôndrias adjacentes ocorra, primeiramente estas membranas devem sofrer um encurvamento, o qual é promovido pela hidrólise da cardiolipina dependente de fosfolipase D. Além disso, as mitofusinas contêm um domínio GTPase, envolvido na hidrólise do GTP, o qual é requerido para a oligomerização das mitofusinas e para promover a fusão da

membrana mitocondrial externa das mitocôndrias adjacentes (Ishihara et al., 2013; Zorzano et al., 2010) (Figura 3A). A fusão das membranas internas requer um processo motor semelhante, acionado por OPA1 e coordenado por várias outras proteínas, incluindo as proibitinas. Este processo básico de fusão da dupla membrana mitocondrial foi confirmado na maioria das células de mamíferos, embora a sua regulação e proteínas acessórias específicas envolvidas neste processo dependam do motivo pelo qual a mitocôndria está sendo fusionada (Song et al., 2009).

Além de promover a fusão mitocondrial, Opa1 ainda está associado com diferentes funções, como a manutenção da CR e do  $\Delta\psi_m$  (Olichon et al., 2003), a organização da estrutura das cristas mitocondriais e com a liberação de citocromo c da mitocôndria durante o processo de apoptose (Amati-Bonneau et al., 2008; Elachouri et al., 2011; Frezza et al., 2006; Griparic et al., 2004; Hudson et al., 2008; Meeusen et al., 2006). Assim como Opa1, as mitofusinas também possuem outras funções além de seu envolvimento na fusão mitocondrial. Mfn2 regula a proliferação celular, o metabolismo oxidativo, a autofagia e atua como uma proteína de sinalização antiviral mitocondrial (Bach et al., 2003; Chen et al., 2004; Hailey et al., 2010; Pich et al., 2005; Yasukawa et al., 2009). Além disso, Mfn2 está localizado nos sítios de contato da mitocôndria com o retículo endoplasmático, auxiliando na manutenção da homeostasia do cálcio intracelular (de Brito e Scorrano, 2008). Ainda, Mfn1 e Mfn2 são requeridas para a estabilidade do DNA mitocondrial (Chen et al., 2010), visto que a fusão mitocondrial evita que ocorra um acúmulo de mutações numa mesma organela (Nakada et al., 2001; Nakada et al., 2009).

Por outro lado, o processo de fissão mitocondrial é mantido pela GTPase Drp1 (proteína 1 relacionada à dinamina) - proteína localizada no citosol que migra para a mitocôndria quando estimulada à fissionar – e a proteína Fis1 e Mff (*mitochondrial fission factor*), localizadas na membrana externa mitocondrial e tem sido propostas como receptores para Drp1 (Jheng et al., 2011). No entanto, observou-se que a deleção de Fis1 em cultura de células HCT116 (células de carcinoma colo retal humano) não resultou em alterações na morfologia mitocondrial ou modificações na associação de Drp1 à mitocôndria, sugerindo que Fis1 é dispensável para que ocorra a fissão em células de mamíferos (Otera et al., 2010). Mais recentemente, foi observado que o processo de fissão envolve a atividade de outras proteínas, como as proteínas de dinâmica

mitocondrial MiD49 e MiD51 (também denominada Mief1 - *OMM-bound mitochondrial elongation factor*) (Palmer et al., 2011; Palmer et al., 2013). No entanto, há controvérsias sobre a função destas proteínas no processo de fissão mitocondrial, visto que estas proteínas recrutariam a Drp1, mas a manteriam em uma forma inativa, até que exista um sinal celular para que a fissão ocorra. O recrutamento da Drp1 à mitocôndria pode ser realizado através de vários mecanismos, os quais envolvem alterações nos resíduos da Drp1, como sumoilação pela SUMO1 (*small ubiquitin-like modifier 1*), nitrosilação e fosforilação (Chang e Blackstone, 2010; Santel e Frank, 2008). Esta última pode ser realizada pela proteína cinase C  $\delta$  (PKC $\delta$ ), ERK1/2 (cinase regulada por sinal extracelular), CDK1 (proteína cinase 1 dependente de ciclina), proteína cinase Ia dependente de cálcio-calmodulina (CaMKI $\alpha$ ) ou pela ROCK1 (*Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1*), fazendo com que a Drp1 seja translocada para a mitocôndria (Han et al., 2008; Taguchi et al., 2007; Wang et al., 2012b; Yu et al., 2011).

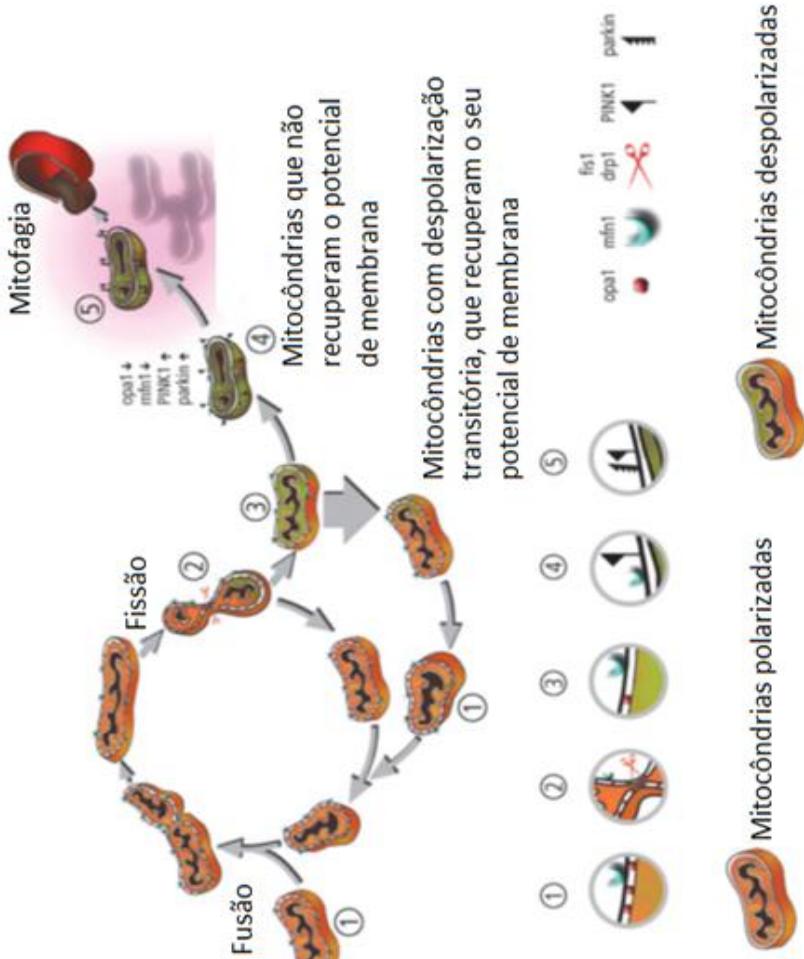
Após ser recrutada para a mitocôndria e interagir com seus receptores em locais denominados de sítios de constrição, a Drp1 se polimeriza em torno da organela e, através da hidrólise do GTP, altera a sua conformação para restringir as membranas externa e interna, ocasionando a fissão da mitocôndria (Ingerman e Nunnari, 2005; Mears et al., 2011; Yoon e McNiven, 2001) (Figura 3B).

A fissão de mitocôndrias a partir da malha mitocondrial permite que mitocôndrias funcionais sejam transportadas no interior da célula, por exemplo, do corpo celular dos neurônios para seus axônios, de acordo com a demanda energética desta célula. Este transporte das mitocôndrias é realizado através da associação do complexo proteico Miro/Milton com as proteínas motoras associadas aos microtúbulos, as dineínas e cinesinas. Miro é uma proteína ancorada à membrana mitocondrial externa, e Milton é uma proteína adaptadora entre Miro e as proteínas motoras (Schwarz, 2013). O resultado da fissão mitocondrial são mitocôndrias pequenas e esféricas, que perdem transientemente o  $\Delta\psi_m$ . Caso estas mitocôndrias sejam disfuncionais e não consigam recuperar este potencial, não serão reincorporadas à malha mitocondrial e, desta forma, o processo de autofagia destas organelas será induzido (Twig et al., 2008a).

A autofagia de organelas refere-se à retirada de componentes disfuncionais da célula através da formação de vacúolos autofágicos (também denominados de autofagossomos), que se fundem aos lisossomos para que as organelas sejam degradadas. Quando são as mitocôndrias que devem ser degradadas, o processo é conhecido como

mitofagia (Twig et al., 2008a), sendo que o controle de qualidade deste processo é controlado pelas proteínas PINK1 e parkina. A PINK1 acumula-se na membrana mitocondrial externa das mitocôndrias que não conseguem recuperar seu  $\Delta\psi_m$  (mitocôndrias despolarizadas) após a fissão desta a partir da malha mitocondrial (Lazarou et al., 2012). Desta forma, PINK1 pode fosforilar a Mfn2, fazendo com que esta proteína funcione como um receptor para a proteína parkina (Chen e Dorn, 2013). A interação entre parkina e seu receptor provoca a ubiquitinação de proteínas mitocondriais, como Mfn1, VDAC (*voltage-dependent anion channel*), TOMs (*transporters outer membrane*), Fis1 e Miro, as quais são todas proteínas localizadas na membrana mitocondrial externa, e desta forma marcando estas organelas para a eliminação por mitofagia (Chan et al., 2011; Jin e Youle, 2012; Yoshii et al., 2011). Subsequentemente, há o recrutamento de outras moléculas adaptadoras para a mitocôndria, como a p62, que interage com as proteínas ubiquitinadas e recruta a maquinaria autofágica, através de sua interação com LC3B, presente na membrana que formará o autofagossomo (Pankiv et al., 2007). Devido à ubiquitinação de mitofusinas, a parkina previne a fusão de mitocôndrias disfuncionais à rede mitocondrial (Palikaras e Tavernarakis, 2012). Apesar de algumas proteínas envolvidas na mitofagia já terem sido elucidadas, estudos ainda são necessários para o entendimento completo desta via em mamíferos.

Caso o processo de mitofagia for comprometido, as mitocôndrias disfuncionais podem ser acumuladas intracelularmente, resultando no comprometimento da respiração celular, o que pode resultar em apoptose (Chen e Chan, 2009; Suen et al., 2008). Desta forma, o processo de fissão mitocondrial também é responsável por isolar as mitocôndrias disfuncionais da malha mitocondrial, a fim de promover a mitofagia (Twig et al., 2008a; Twig et al., 2008b).



**Figura 3.** Ciclo de vida mitocondrial. As mitocôndrias são fragmentadas da rede mitocondrial pelo processo de fissão, devido ao recrutamento de Drp1 à mitocôndria, onde acontece a interação com o seu receptor. Após a fissão, as mitocôndrias perdem transientemente o seu  $\Delta\psi_m$ . Se estas organelas forem funcionais, elas recuperam o  $\Delta\psi_m$  rapidamente e se fundem novamente com outras mitocôndrias, através da atividade de mitofusinas e de Opa1. Caso estas mitocôndrias sejam disfuncionais, elas não são capazes de recuperar o seu  $\Delta\psi_m$  e são levadas à mitofagia, através do acúmulo de parkina e a ubiquitinação de proteínas que levam a mitocôndria à degradação (Adaptado de Twig et al., 2011).

A desregulação dos processos de dinâmica mitocondrial tem sido demonstrada em patologias neurológicas, como na doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 2A, a qual é causada por mutações em Mfn2 (Züchner et al., 2004), e na atrofia óptica autossômica dominante, relacionada a mutações em Opa1 (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). Ainda, alterações na dinâmica mitocondrial são relacionadas à fisiopatologia de doenças neurológicas associadas ao envelhecimento, incluindo as doenças de Alzheimer e Parkinson (para uma revisão, ver Chen e Chan, 2009; Itoh et al., 2013; Latini et al., 2011). Além disso, em doenças metabólicas crônicas, como no diabetes mellitus (DM), também ocorre uma alteração na dinâmica mitocondrial (para uma revisão, ver Yoon et al., 2011). Por exemplo, em músculo estriado esquelético, células endoteliais e células  $\beta$  pancreáticas de pacientes com DM tipo 2 (DM2), foi observado que as mitocôndrias são menores e apresentam morfologia alterada, apresentando vacúolos, além de possuírem um conteúdo proteico reduzido de Mfn2 e OPA1 e maior expressão de Fis1 (Anello et al., 2005; Bach et al., 2005; Bach et al., 2003; Kelley et al., 2002; Shenouda et al., 2011). Estas alterações na dinâmica mitocondrial foram também observadas em modelos animais da doença DM2 (Bach et al., 2003; Bindokas et al., 2003). O aumento na fragmentação mitocondrial foi relacionado com um decréscimo na fusão, devido a uma redução no conteúdo proteico e do mRNA de Mfn2 (Bach et al., 2005; Molina et al., 2009). Ainda, tem sido demonstrado que altas concentrações de glicose induzem a fissão mitocondrial em linhagem de células do fígado, do coração, do endotélio, das ilhotas pancreáticas e em cultura primária de neurônios e de células do sistema cardiovascular, parecendo ser este o gatilho para a desregulação da dinâmica mitocondrial no DM2 (Leininger et al., 2006; Men et al., 2009; Paltauf-Doburzynska et al., 2004; Yu et al., 2006; Yu et al., 2008).

### **1.1.3. Biogênese mitocondrial**

O número de mitocôndrias em uma determinada célula depende do equilíbrio entre fusão e fissão e da biogênese de novas mitocôndrias. A regulação da gênese e da função mitocondrial é um processo muito complexo, pois depende da modulação da expressão de mais de 1500 genes, da cooperação entre dois genomas (nuclear e mitocondrial), e da mudança na concentração de aproximadamente 20% das proteínas celulares. Tem sido descrito que o processo mais importante nesta via

parece envolver a regulação de fatores de transcrição que controlam a expressão tanto de genes nucleares quanto mitocondriais (Roy et al., 2007). A indução do processo de biogênese mitocondrial é requerida para suprir as demandas energéticas durante, por exemplo, o exercício físico, exposição ao frio ou outros estresses celulares, como o dano ao DNA (Hock e Kralli, 2009). Além disso, a biogênese mitocondrial é um processo ativo durante a organogênese embrionária, devido à ativação do metabolismo oxidativo e crescimento durante este período (Alcolea et al., 2007).

As proteínas essenciais para a transcrição, tradução, replicação e importação de proteínas mitocondriais são codificadas por uma série de genes localizados no DNA nuclear (Scarpulla, 2002, 2008). Os genes responsáveis pela biogênese da mitocôndria estão localizados no núcleo, incluindo os que codificam para os fatores de transcrição mitocondriais e para proteínas presentes nos complexos I, III e IV da CR (Menzies e Hood, 2012). Os fatores de transcrição envolvidos na transcrição de genes mitocondriais localizados no núcleo envolvem NRF1 e 2 (*nuclear respiratory factor*) e Tfam (*mitochondrial transcription factor A*), os quais são essenciais para a biogênese e função da mitocôndria (Fisher e Clayton, 1985, 1988; Scarpulla, 2008).

A ativação de NRFs envolve a sua fosforilação, o que aumenta a afinidade da molécula ao DNA, aumentando desta forma a transcrição gênica (Gugneja e Scarpulla, 1997). Os genes alvos de NRF incluem uma variedade de genes codificadores para as subunidades da CR mitocondrial, enzimas de biossíntese do heme, canais iônicos, proteínas envolvidas no importe e montagem de proteínas para o interior da mitocôndria e fatores regulatórios envolvidos na replicação e transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA), como o Tfam (Evans e Scarpulla, 1989, 1990; Scarpulla, 2002, 2008).

O Tfam é um fator de transcrição codificado pelo núcleo e que migra para a mitocôndria, ligando-se na região promotora do mtDNA, promovendo a transcrição gênica através da RNA polimerase mitocondrial (Shadel e Clayton, 1993). O Tfam age juntamente com mtTFB1 e 2, as quais são proteínas envolvidas no reconhecimento da região promotora do mtDNA (Rantanen et al., 2003). O Tfam regula a transcrição dos treze genes mitocondriais que codificam para proteínas da CR (Hood, 2001).

Outros fatores de transcrição envolvidos na biogênese mitocondrial incluem Sp1, o qual pode ativar ou inibir a transcrição de genes relacionados à CR; ERR $\alpha$  (*estrogen-related receptor*), também relacionado à transcrição de componentes respiratórios (Zaid et al.,

1999); CREB e C-myc, que podem induzir a expressão de citocromo *c*, e este último fator também à expressão de genes relacionados ao NRF1 (Evans e Scarpulla, 1989; Gopalakrishnan e Scarpulla, 1994; Morrish et al., 2003); e PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1-alpha*) (Spiegelman, 2007). Este último responde a uma série de sinais fisiológicos para ativar a transcrição de NRFs, Tfam, mtTFB e ERR $\alpha$ , culminando na biogênese mitocondrial (Whelan e Zuckerbraun, 2013; Wu et al., 1999). Estes sinais incluem, por exemplo, o exercício físico, frio e jejum (Handschin e Spiegelman, 2006), os quais estimulam a expressão de PGC-1 $\alpha$  através de fatores de transcrição como o CREB e a SIRT1 (Handschin et al., 2003). O PGC-1 $\alpha$  está envolvido na regulação dos fatores de transcrição NRF1 e 2, que além de ativarem a transcrição de proteínas mitocondriais codificadas pelo genoma nuclear, estimulam a transcrição de Tfam. O efeito final da ativação desses fatores de transcrição é o aumento do número de mitocôndrias (Scarpulla, 1997; Virbasius e Scarpulla, 1994). Sendo assim, o PGC-1 $\alpha$  é considerado o regulador-chave da biogênese mitocondrial, controlando tanto a expressão de genes nucleares como mitocondriais envolvidos na CR, além de modular a expressão dos reguladores da replicação e transcrição do DNA mitocondrial (Lehman et al., 2000; Puigserver e Spiegelman, 2003; Wu et al., 1999). Além de estar envolvido na biogênese mitocondrial, PGC-1 $\alpha$  também está relacionado à expressão de numerosas enzimas que atuam na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (St-Pierre et al., 2003; 2006; Valle et al., 2005). Ainda, outro membro desta família, o PGC-1 $\beta$ , também está relacionado na regulação da expressão de componentes da CR e de proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial, de maneira semelhante ao PGC-1 $\alpha$  (Vercauteren et al., 2009).

Além dos fatores fisiológicos citados anteriormente, mutações no mtDNA e aumento dos níveis de EROs podem sinalizar para que a biogênese mitocondrial seja ativada. Um dos exemplos de fatores de transcrição ativados por EROs é o Nrf2 (*nuclear fator erythroid 2-related factor 2*). Nrf2 reside no citoplasma e é constitutivamente degradado por Keap1, o qual na presença de EROs muda sua conformação, liberando Nrf2, que por sua vez se transloca para o núcleo (Itoh et al., 1999). No núcleo, este fator liga-se aos genes envolvidos na resposta antioxidante, como a heme oxigenase e indutores da biogênese mitocondrial, como o NRF1 (Whelan e Zuckerbraun, 2013).

Além disso, a AMPK, uma proteína cinase dependente de AMP, também está relacionada com a biogênese da mitocôndria. A AMPK é ativada quando as concentrações intracelulares de AMP aumentam, fazendo com que vias catabólicas sejam ativadas, e as anabólicas inibidas. Desta forma, a AMPK ativa os processos que produzem ATP, como o transporte de glicose, a glicólise, a oxidação de ácidos graxos e a biogênese mitocondrial (Carling, 2004; Hardie, 2004; Suwa et al., 2003). Esta última é ativada devido ao aumento na transcrição de PGC-1 $\alpha$  e consequentemente de NRF e Tfam (Jager et al., 2007; Suwa et al., 2003; Zong et al., 2002).

## 1.2. DIABETES MELLITUS

O DM é uma síndrome de etiologia múltipla decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos. O tipo 2 ou DM não-insulino dependente é o mais frequente e resulta na deficiência e resistência relativa de insulina (ADA, 2012). O DM tipo 1, ou DM insulino dependente, é caracterizado pela deficiência total de insulina, sendo um processo autoimune relacionado com as células  $\beta$  do pâncreas, que afeta geralmente pessoas jovens, nas primeiras décadas de vida (Atkinson e Eisenbarth, 2001; Malecki e Klupa, 2005). Desta maneira, o DM é caracterizado por um estado de hiperglicemia crônica, que parece ser o gatilho para induzir as alterações vasculares crônicas – como retinopatia, nefropatia e neuropatia – observadas nos pacientes afetados pela doença (Brownlee, 2005; Nishikawa et al., 2000).

A maior morbidade e mortalidade associadas com DM devem-se ao desenvolvimento de micro e macro vasculopatias (Winer e Sowers, 2004). As complicações microvasculares incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia central e periférica; enquanto que as macrovasculares, doença coronária, doença vascular periférica e infarto (Brownlee, 2001; Wirostko et al., 2008). Estas complicações vasculares permanecem na maioria dos pacientes com DM, e sua prevalência varia de 10% a 50%, um ano ou 25 anos, após do diagnóstico de DM, respectivamente (Pirart, 1977; Sima, 1994; Vinik et al., 1992), ainda em pacientes onde as concentrações de glicose sanguínea foram rigorosamente controladas (The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, 2008; The Advance Collaborative Group, 2008; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). Desta forma, surge o conceito de “memória metabólica”, onde a hiperglicemia, como consequência da falha de sinalização da insulina,

induziria efeitos deletérios de longa duração, os quais não podem ser revertidos a menos que o controle glicêmico seja iniciado nos estágios mais precoces da doença (Ceriello et al., 2009; Ihnat et al., 2006; Nathan et al., 2005).

Os mecanismos moleculares e celulares das complicações vasculares crônicas no DM ainda não se encontram totalmente elucidados, no entanto, uma série de evidências sugere que a hiperglicemia seria o gatilho para induzir tais alterações (Brownlee, 2005; Nishikawa et al., 2000; Schalkwijk e Stehouwer, 2005). Neste sentido, resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que o estado hiperglicêmico crônico em ratos Wistar (modelo experimental induzido pela administração de estreptozotocina) modula negativamente a atividade dos complexos da CR mitocondrial e o controle respiratório no cérebro, e que a administração de insulina previne de tais inibições. Ainda, as alterações observadas no cérebro dos animais foram acompanhadas por uma queda significativa nas concentrações do antioxidante glutationa (Trabalho doutoral Aline Remor).

De fato, esta condição hiperglicêmica crônica causa alterações no metabolismo celular, como o aumento no fluxo da via metabólica dos polióis, glicação não enzimática de proteínas com posterior formação de produtos terminais de glicação (AGEs), ativação da PKC e aumento no metabolismo das hexosaminas. Estas modificações metabólicas culminam com a produção de espécies reativas, oxidação de proteínas, inativação de enzimas citosólicas e mitocondriais, alterações no sistema de defesa antioxidante, entre outros (Brownlee, 2005; Folmer et al., 2002; Mukherjee et al., 1998; Rosen et al., 2001).

### **1.2.1. Aumento da via do polioli**

Em condições de hiperglicemia, onde ocorre um aumento nas concentrações de glicose intracelular em células que não dependem da insulina para a captação de glicose, a enzima aldose redutase pode formar sorbitol a partir da glicose, com a utilização de NAPH. O sorbitol, por sua vez, é oxidado a frutose pela enzima sorbitol desidrogenase, reduzindo  $\text{NAD}^+$  a NADH, e posteriormente a frutose é fosforilada a frutose-6-fosfato, a qual pode ser metabolizada em 3-deoxiglicosona, um composto reativo que pode levar à formação de AGEs (Gonzalez et al., 1988; Szwergold et al., 1990).

Desta forma, além de alterar o equilíbrio osmótico celular devido à produção do sorbitol, esta via resulta na produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição das concentrações intracelulares de NADPH. Assim, o aumento da via do poliol diminui a disponibilidade do NADPH para ser utilizado por sistemas enzimáticos antioxidantes, levando a um estado de estresse oxidativo, associado à hiperglicemia (Brownlee, 2001). Ainda, como a via do poliol produz NADH, há conseqüentemente um aumento na relação NADH/NAD<sup>+</sup>, o que leva à inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (enzima da via glicolítica), aumentando as concentrações de trioses fosfato (gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato). O aumento na concentração destes intermediários glicolíticos leva à produção de metilgloxal (MG), o principal precursor de AGEs (Williamson et al., 1993). Além da produção de MG, o aumento das concentrações de trioses fosfato conduz à formação de diacilglicerol, levando à ativação de PKC (Brownlee, 2001).

### 1.2.2. Ativação da PKC

A família das PKCs (proteínas cinases C) consiste de proteínas com atividade cinase contendo pelo menos onze isoformas diferentes, distribuídas amplamente em tecidos de mamíferos. Para sua atividade, estas enzimas dependem de íons cálcio e de fosfatidilserina, além do diacilglicerol, o qual aumenta significativamente a capacidade desta enzima para fosforilar suas diversas proteínas-alvo (Gerald e King, 2010).

A ativação persistente e excessiva da PKC é uma das conseqüências da hiperglicemia crônica, resultando em um dano tecidual decorrente da produção de EROs. A ativação da PKC nestas condições resulta da síntese *de novo* do diacilglicerol, que como mencionado, é produzido a partir de trioses fosfato. O aumento deste intermediário pode ser também uma conseqüência da inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase provocada por EROS, ou como conseqüência do aumento da via do poliol, ambas aumentando as concentrações de trioses fosfato (Brownlee, 2001; Craven et al., 1990; Inoguchi et al., 1992; Scivittaro et al., 2000; Shiba et al., 1993). Ainda, existem evidências que sugerem que a ativação da PKC também pode ser o resultado da interação de AGEs com seus receptores localizados na superfície celular (RAGEs), os quais estão presentes em vários tipos celulares como as células endoteliais, neurônios, monócitos e macrófagos. Sabe-se que a interação dos AGEs com os RAGEs ativa,

através da geração de espécies reativas, o fator de transcrição pleiotrópico NF- $\kappa$ B induzindo patologicamente a expressão de numerosos genes pro-oxidantes (Brownlee, 2001; Derubertis e Craven, 1994; Giacco e Brownlee, 2010; Liu et al., 2009). Além disso, a ativação exacerbada da PKC pode induzir a expressão não fisiológica de vários genes, como o do VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) ou inibir a expressão de proteínas como eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), diminuindo conseqüentemente a produção de óxido nítrico (Ganz e Seftel, 2000; Kuboki et al., 2000). Estes fatores provenientes da indução excessiva da PKC levam à alteração da permeabilidade e do fluxo sanguíneo nos vasos (Feener et al., 1996; Hempel et al., 1997; Pieper e Riaz ul, 1997; Williams et al., 1997).

### **1.2.3. Aumento da via das hexosaminas**

A hiperglicemia crônica também contribui para a patologia observado no DM por causar o aumento do fluxo de frutose-6-fosfato na via das hexosaminas (Chen et al., 1998; Du et al., 2000; Kolm-Litty et al., 1998; Sayeski e Kudlow, 1996). Devido ao aumento da via glicolítica e um conseqüente aumento de frutose-6-fosfato formado, esta serve como substrato para a enzima glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase para a formação de glicosamina-6-fosfato, a qual é então convertida a UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) (Giacco e Brownlee, 2010). Por sua vez, esta pode ser utilizada para formar, por exemplo, proteoglicanas e O-glicoproteínas (Brownlee, 2001; Wells et al., 2001).

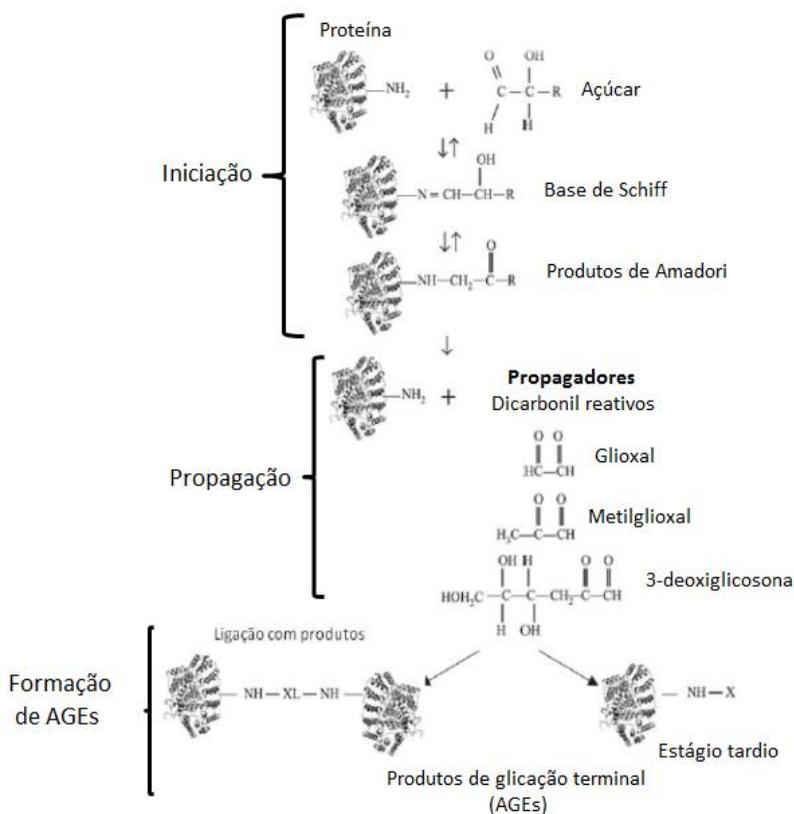
O aumento na via das hexosaminas está envolvido com o aumento da expressão de genes relacionados com o desenvolvimento das complicações vasculares que ocorrem no diabetes e/ou no desenvolvimento da resistência a insulina (Gabriely et al., 2002; Marshall e Monzon, 1989). Por exemplo, foi demonstrado que o aumento na produção de UDP-GlcNAc resulta na ativação do fator de transcrição Sp1, o qual regula a ativação do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), contribuindo para o comprometimento da fisiologia vascular (Chen et al., 1998).

### **1.2.4. Formação de AGEs**

Os AGEs são um grupo de moléculas heterogêneas produzidas através da glicação não enzimática de proteínas, lipídeos e ácidos

nucleicos. A taxa de renovação de proteínas, o nível de hiperglicemia e o estresse oxidativo são fatores cruciais para a sua formação; desta forma, se alguma destas situações está presente, as proteínas tanto intra como extracelulares são passíveis de serem glicadas, e portanto, oxidadas (Baynes e Thorpe, 1999).

A formação de AGEs envolve três principais passos: a iniciação, a propagação e a formação de AGEs propriamente dita (Figura 4), as quais são coletivamente chamadas de reações de Maillard (Thornalley, 2008). A iniciação vai desde a formação da base de Schiff até a formação do produto de Amadori. Inicialmente, ocorre a condensação não enzimática de um açúcar redutor, como a glicose, com um grupamento amino livre de várias moléculas, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, formando compostos aldimina instáveis, chamados bases de Schiff (Bierhaus et al., 1997; Njoroge e Monnier, 1989). Se a hiperglicemia persistir, em poucas horas esta base sofre um rearranjo molecular originando uma cetoamina estável, os produtos de Amadori, os quais são produtos mais estáveis que a base de Schiff. Um exemplo de produto de Amadori é a hemoglobina glicosilada, onde a glicose se conjuga com a globina (componente proteico da hemoglobina, presente nos eritrócitos) (Jakus e Rietbrock, 2004). Essa reação não requer a participação de enzimas e depende da concentração de glicose e proteínas, e também da meia vida das proteínas, além de depender da sua reatividade em termos de grupos aminos livres. Esta reação é irreversível (Hunt et al., 1988; Lapolla et al., 2005; Zhang et al., 2009). Por sua vez, a fase de propagação envolve reações de oxidação e desidratação dos produtos de Amadori, sendo estes convertidos a compostos carbonílicos (glioxal, deoxiglicosanas e metilglioxal), os quais, por serem mais reativos do que os açúcares que os originaram, agem como propagadores da glicação não enzimática de proteínas (Lapolla et al., 2005). Estes compostos dicarbonílicos possuem uma meia-vida longa (minutos a horas) e atravessam facilmente a membrana plasmática, podendo atuar longe do seu local de produção, modificando desta forma, biomoléculas intra e extracelulares. O acúmulo destes compostos é chamado de estresse por carbonilação (Thornalley et al., 1999). Os compostos propagadores reagem com grupamentos amino livres de proteínas através de reações de oxidação, desidratação e ciclização, formando compostos amarelo-marrons, insolúveis e irreversíveis, chamados de AGEs (Lapolla et al., 2005; Ravelojaona et al., 2007; Zhang et al., 2009), o qual seria a fase de formação de AGE propriamente dita.



**Figura 4.** Formação de produtos terminais de glicação (AGEs).  
(Adaptado de Lapolla, 2005).

Os AGEs podem causar alterações patológicas por três mecanismos distintos. Primeiramente, os AGEs podem alterar as vias de transdução de sinal envolvendo os ligantes de matriz extracelular. Segundo, AGEs podem alterar as concentrações de sinais solúveis, como as citocinas, hormônios e radicais livres, através da interação com os RAGEs. Por fim, a formação intracelular de AGEs pela glicose, frutose e seus intermediários reativos podem diretamente alterar as funções das proteínas (Brownlee, 1995).

A relação entre concentrações de glicose sanguínea e acúmulo tecidual de AGEs tem sido mais estudada em modelos animais. Por exemplo, em vasos sanguíneos da retina de ratos com hiperglicemia

crônica foi observado que há cerca de 10-45 vezes mais AGEs que em animais não diabéticos, após 5-20 semanas de hiperglicemia. Esta relação sugere que mesmo um aumento modesto na concentração de glicose sanguínea resulta em um aumento substancial no acúmulo de AGEs nos tecidos (Brownlee, 1995). No caso de pacientes diabéticos foi encontrado uma aumento na concentração do MG, principal composto precursor de AGEs, em fluidos corporais e tecidos, o que leva a presupor que este composto é um dos principais responsáveis pelas complicações diabéticas (Messier e Gagnon, 1996; Vander Jagt e Hunsaker, 2003).

### **1.2.5. Metilglioxal (MG)**

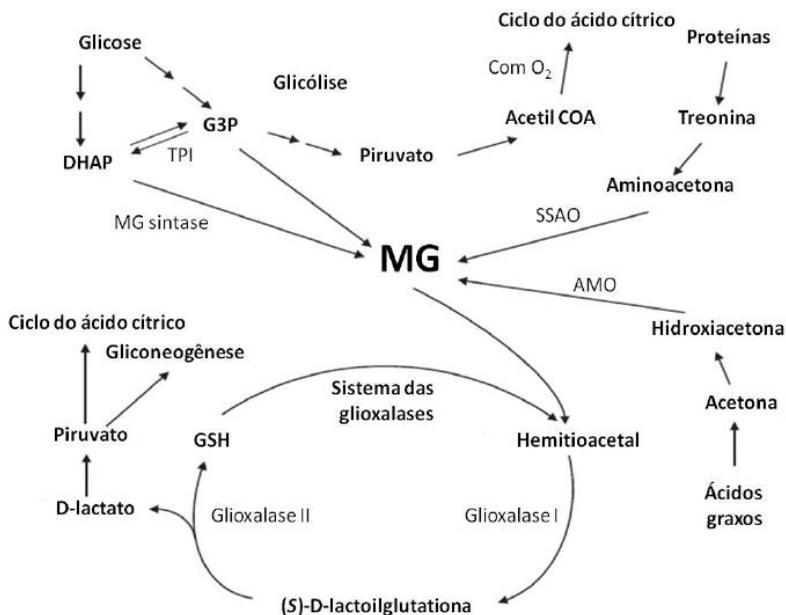
O MG é um alfa-oxaldeído altamente reativo o qual pode ser formado a partir de trioses-fosfato, através de acetonas durante o metabolismo dos ácidos graxos e a partir do catabolismo do aminoácido treonina (Figura 5) (Koop e Casazza, 1985; Lyles e Chalmers, 1992; Reichard et al., 1986; Thornalley, 1996).

O MG pode ser formado não enzimaticamente a partir das trioses-fosfato, (Phillips and Thornalley, 1993; Richard, 1991) ou com a participação das enzimas triose-fosfato isomerase, a qual converte o gliceraldeído-3-fosfato a diidroxiacetona fosfato (Pompliano et al., 1990), sendo este último convertido a MG pela metilglioxal sintase (Ray e Ray, 1981). A formação não enzimática de metilglioxal ocorre em todas as células, sendo que cerca de 0,1% do metabolismo de trioses-fosfato resultam na formação de MG em condições normoglicêmicas (Phillips e Thornalley, 1993; Thornalley, 1988).

A formação de MG a partir de acetonas formadas durante o metabolismo de ácidos graxos é realizada pelo citocromo P450 2E (acetona e acetol monooxigenase) (Gonzalez, 1988), utilizando NAD(P)H como cofator (Gonzalez, 1988; Koop e Casazza, 1985). Outras fontes de MG envolvem os corpos cetônicos acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato, os quais são espontaneamente convertidos em acetona, sendo esta convertida a MG de acordo com o mecanismo acima descrito (Beisswenger et al., 2005).

As aminoacetonas formadas durante o catabolismo da treonina podem resultar na formação de MG pela ação da enzima amina oxidase sensível à ação de semicarbazida (SSAO), a qual realiza a desaminação das aminoacetonas formadas a partir da treonina à MG (Figura 5). A SSAO está localizada na superfície da membrana mitocondrial externa e

no citoplasma do tecido adiposo, células da musculatura lisa vascular e em células endoteliais (Yu et al., 2003).



**Figura 5.** Formação e desintoxicação de metilglicoxal (MG). SSAO: Amina oxidase sensível à ação de semicarbazida; AMO: acetol mono-oxigenase, G3P: gliceraldeído-3-fosfato, TPI: enzima triose-fosfato isomerase, DHAP: diidroxiacetona fosfato. (Adaptado de Chang e Wu, 2006).

Após formado, o MG é mantido em concentrações basais devido ao seu catabolismo pela via das glicoxalases, compreendida pelas enzimas glicoxalase I e II e glutaciona (GSH) (Chang e Wu, 2006). A glicoxalase I catalisa a formação de S-D-lactoilglutaciona a partir de MG e GSH. A glicoxalase II catalisa a hidrólise de S-D-lactoilglutaciona à D-lactato, regenerando a GSH consumida na reação catalisada pela glicoxalase I (Figura 5). Posteriormente, o D-lactato é metabolizado a piruvato (Thornalley, 1993). Desta forma, é evidente que o normal funcionamento do catabolismo do MG é dependente de concentrações adequadas de GSH, bem como glutaciona peroxidase e glutaciona redutase, situações comprometidas pelo estresse oxidativo que caracteriza o estado hiperglicêmico (Desai e Wu, 2007; Wang et al.,

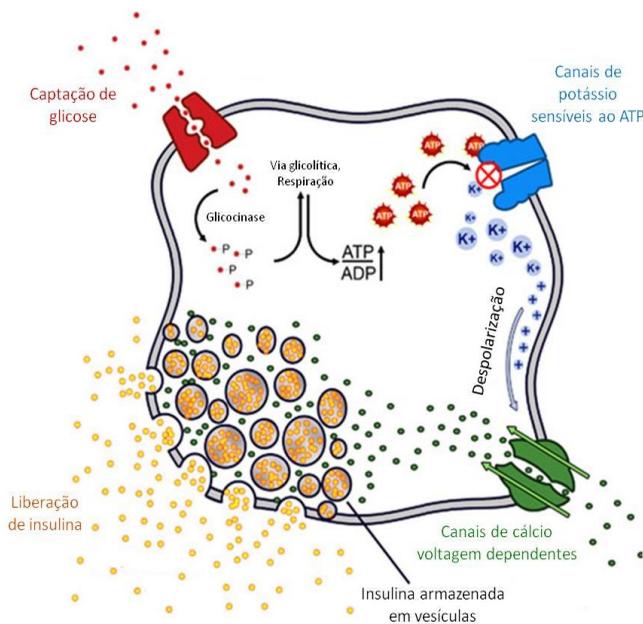
2005; Wu e Juurlink, 2002). O MG é também metabolizado pela aldose redutase, uma aldeído redutase envolvida na desintoxicação de aldeídos (Grimshaw, 1992). Esta enzima converte MG principalmente a hidroxiacetona e em pequeno percentual a o-lactaldeído (Vander Jagt et al., 1992). Entretanto, em humanos o MG é principalmente catabolizado pelo sistema das glicoxalases. No entanto, em condições de hiperglicemia, as concentrações de MG aumentam, pois esta via não é capaz de catabolizar todo o MG formado. Desta maneira, o MG que não for eficientemente catabolizado, liga-se às proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos, promovendo modificações na estrutura destes compostos, formando AGEs (Lo et al., 1994; Vaca et al., 1994). Neste contexto, o MG foi identificado como o principal precursor na formação de AGEs (Shinohara et al., 1998; Thornalley, 1990; Wells-Knecht et al., 1995). Acredita-se que menos que 1% do MG ocorra em forma livre, e cerca de 99% é encontrado conjugado à proteínas (Ahmed e Thornalley, 2002; Chaplen et al., 1998). O MG reage com resíduos cisteína, lisina e arginina de proteínas, podendo levar à degradação não fisiológica destas, inativação de enzimas, desnaturação proteica e ainda desencadear a resposta imune (Papoulis et al., 1995; Thornalley et al., 1999; Westwood et al., 1994). O DNA também pode ser modificado através da glicação pelo MG, e a excessiva modificação de ácidos nucleicos por este composto é associada com mutagênese e apoptose. Por outro lado, o excesso na glicação de lipídios de membrana leva à perda de integridade da mesma (Thornalley et al., 1999). Estas proteínas modificadas podem ser proteínas de vida longa, como as encontradas no cristalino, o colágeno das membranas basais dos capilares da retina e do glomérulo, e a mielina do sistema nervoso periférico, prejudicando a função destes tecidos (Bastias et al., 2006; Sakurai et al., 2003; Stern et al., 2002).

### 1.3. HORMÔNIO INSULINA

A insulina é um hormônio sintetizado pelas células  $\beta$ -pancreáticas, localizadas nas ilhotas pancreáticas ou ilhotas de Langerhans, as quais constituem a porção endócrina do pâncreas. Nestas células, a insulina é produzida na forma de pré-pró-insulina no retículo endoplasmático rugoso, e estocada em vesículas na forma de pró-insulina pelo complexo de Golgi. Após estímulo, a pró-insulina é convertida por proteases à insulina madura e peptídeo C, os quais são liberados na corrente sanguínea. O peptídeo C é liberado em quantidades equimolares à insulina madura, desta forma este é um

excelente indicador da produção endógena de insulina, principalmente em indivíduos que se encontram sob terapia exógena com o hormônio (Nelson e Cox, 2004).

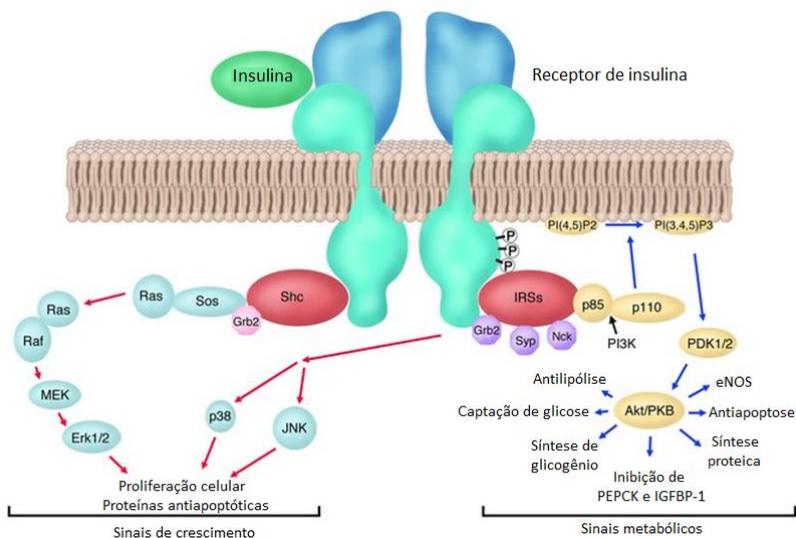
Este estímulo para a fusão das vesículas e clivagem da pró-insulina em insulina e peptídeo C se deve ao aumento dos níveis de glicose no sangue, onde esta entra na célula  $\beta$ -pancreática através do transportador GLUT2. No meio intracelular, a glicose é metabolizada pela via glicolítica, sendo oxidada para a formação de ATP. O aumento na concentração de ATP e conseqüentemente da relação ATP/ADP faz com que os canais de potássio sensíveis ao ATP sejam fechados, resultando em um aumento das concentrações deste íon no meio intracelular, levando a uma despolarização da membrana plasmática. Esta despolarização causa a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, permitindo a entrada de cálcio na célula. Por fim, o cálcio provoca a fusão das vesículas à membrana, fazendo com que a insulina seja liberada na corrente sanguínea (Marchetti et al., 2008; Oosawa et al., 1992; Rorsman e Renstrom, 2003) (Figura 6).



**Figura 6.** Secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas (Adaptado de [http://ciitn.missouri.edu/cgi-bin/pub\\_view\\_project\\_ind.cgi?g\\_num=11&c\\_id=2007009](http://ciitn.missouri.edu/cgi-bin/pub_view_project_ind.cgi?g_num=11&c_id=2007009)).

Os três principais tecidos-alvo da insulina são o hepático, muscular e adiposo. No fígado, a insulina estimula tanto a glicólise quanto a glicogênese. Ao mesmo tempo, ela suprime a lipólise e promove a lipogênese. Os lipídeos são empacotados nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que são secretadas para o sangue. Nos tecidos periféricos, a insulina induz a lipoproteína lipase, uma enzima que libera triacilglicerol tanto de VLDL hepática quanto de quilomícrons da dieta, a partir da hidrólise destes em glicerol e ácidos graxos. No tecido adiposo, este hormônio também estimula a síntese de triacilglicerol a partir de glicerol-3-fosfato e ácidos graxos. No músculo, a insulina estimula o transporte de glicose, o metabolismo de glicose e a síntese de glicogênio. Ainda, este hormônio aumenta a captação celular de aminoácidos e estimula a síntese de proteínas e inibe a sua degradação (Baynes e Dominiczak, 2007). Desta forma, a insulina promove um estado anabólico por conduzir o metabolismo em direção ao armazenamento de carboidratos, lipídeos e à síntese de proteína.

A insulina age em receptores específicos presentes na superfície da maioria das células de mamíferos, fazendo com que seu receptor do tipo tirosina cinase, composto por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$  ligadas por pontes dissulfeto, se dimerize e se autofosforile. Esta autofosforilação recruta proteínas citosólicas denominadas de acessórias, entre elas as proteínas conhecidas como substratos do receptor de insulina (IRS-1-4), SHC (*Src homology collagen*) e JAK-2. A fosforilação dos IRSs provoca a ativação da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e proteína cinase serina-treonina (AKT), entre outras (Prada et al., 2005). A ativação da PI3K está relacionada com o transporte de glicose, via glicolítica, síntese de glicogênio e síntese de proteínas, enquanto que a AKT está associada à proliferação e diferenciação celular (Combettes-Souverain e Issad, 1998). Por outro lado, a ativação de SHC está relacionada com a ativação da via das MAPK (proteínas cinases ativadas por mitógenos), afetando a proliferação celular e inibindo a apoptose (Figura 7) (Van den Berghe, 2004).



**Figura 7.** Modelo simplificado dos processos de sinalização intracelular induzidos pela interação da insulina com seu receptor (Adaptado de Van den Berghe, 2004).

#### 1.4. MECANISMOS DE NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADOS AO DM

Além dos efeitos já bem caracterizados da hiperglicemia crônica em tecidos periféricos, como rins, fígado, músculo estriado esquelético e cardíaco e na vasculatura, os efeitos desta condição vem sendo demonstrado também no sistema nervoso central, o qual é um tecido que não depende de insulina para a captação de glicose. Desta forma, o conteúdo de glicose intracelular é um reflexo das concentrações de glicose sanguínea. A persistência de altas concentrações de glicose no interior das células neurais, como observado na hiperglicemia que caracteriza o DM, leva a uma condição que foi definida como neurotoxicidade da glicose (Tomlinson e Gardiner, 2008).

Em células neurais, o aumento da via do poliol, das hexosaminas, da formação de AGEs e da ativação da PKC no DM culminam com a produção de EROs, levando ao estresse oxidativo. O principal local de produção de EROs é a mitocôndria, sendo as proteínas localizadas nesta organela altamente susceptíveis ao dano oxidativo. O estresse oxidativo mitocondrial associado ao DM já foi observada em

trabalhos prévios de nosso grupo, onde foi demonstrada uma diminuição da atividade dos complexos da CR em cérebro de animais com hiperglicemia crônica induzida pela STZ (Trabalho doutoral de Aline Remor). Devido ao fato de as células neurais possuírem uma alta demanda metabólica e um grande requerimento de energia, estas são muito vulneráveis às alterações que envolvem disfunção mitocondrial. Esta grande demanda energética deve-se ao fato que os neurônios são células altamente diferenciadas que necessitam grandes quantidades de ATP para a correta manutenção dos gradientes iônicos transmembrana, e para os processos de neurotransmissão (Silver e Erecinska, 1998).

Além da disfunção mitocondrial observada em cérebro de modelos animais de hiperglicemia crônica, prejuízos na aprendizagem e memória têm sido documentados em pacientes com DM (tipo 1 e 2) (Biessels et al., 2006; Li e Holscher, 2007). Além disso, a DM tem sido considerada como um fator de risco para a predisposição para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e de Alzheimer (Hu et al., 2007; Kroner, 2009). A incidência destas patologias neurológicas parece ser maior em indivíduos com DM2 (Craft e Watson, 2004) e ainda, já está descrito na literatura que estes pacientes possuem mais que o dobro de chances para desenvolver doença de Alzheimer que indivíduos não diabéticos (Ott et al., 1996).

A relação entre DM e as doenças neurodegenerativas parece ser a produção exacerbada de EROs e a disfunção mitocondrial, fatores que estão associados tanto com o DM como com as doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e de Parkinson (Cheng et al., 2010; Reddy et al., 2009). Neste contexto, tecidos que necessitam de uma alta demanda energética, como o cérebro, são os mais afetados pela disfunção mitocondrial. Além disso, as membranas neuronais apresentam grande quantidade de lipídeos poli-insaturados, os quais podem ser facilmente oxidados por EROs, e uma baixa defesa antioxidante, quando comparado aos tecidos periféricos, o que colaboraria para a propagação do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Além do DM e das doenças neurodegenerativas terem este aspecto em comum, outra relação entre elas consiste nas altas concentrações de MG encontrados tanto no líquido de pacientes com doença de Alzheimer como no plasma de indivíduos diabéticos (Han et al., 2007; Lu et al., 2011). O MG é o principal precursor dos AGEs que, além de serem encontrados no DM, acumulam-se nos agregados neurofibrilares e nas placas amilóides presentes na doença de Alzheimer, além de serem encontrados nos corpos de Lewy,

característico da doença de Parkinson (Dalfo et al., 2005). Ainda, algumas evidências demonstram que em estudos com roedores hiperglicêmicos, proteínas da mielina tanto no sistema nervoso central como periférico, são susceptíveis à glicação não enzimática, desenvolvendo os efeitos tóxicos causados pelos AGEs com subsequente perda de sua função (Vlassara et al., 1983; Weimbs e Stoffel, 1994). Também, proteínas do citoesqueleto, como a tubulina, actina e neurofilamentos, as quais são responsáveis pela manutenção da estrutura e função do axônio, quando glicadas, contribuem para atrofia e degeneração axonal (Cullum et al., 1991; Pekiner et al., 1993; Ryle et al., 1997; Williams et al., 1982). Desta forma, parece existir uma relação entre hiperglicemia, formação de AGEs e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas crônicas.

### 1.5. HIPÓTESE

Considerando-se a relação do DM com a predisposição para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e a participação da disfunção mitocondrial na fisiopatologia destas, hipotetizamos que a formação de MG e/ou AGEs durante condições de hiperglicemia crônica seria o responsável por alterar a fisiologia, dinâmica e/ou biogênese mitocondrial em células do sistema nervoso central.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da hiperglicemia crônica e dos metabólitos formados durante esta condição metabólica, MG e AGEs, sobre a fisiologia, dinâmica e biogênese mitocondrial no sistema nervoso central.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os seguintes parâmetros em córtex cerebral e/ou bulbo olfatório de ratos submetidos à hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de STZ, e em animais hiperglicêmicos com glicemia normalizada pela administração de insulina:

- Expressão de genes que codificam para proteínas presentes na CR mitocondrial (NDUFA6 e COXI), bem como de proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial (Tfam e NRF1), através de RT-PCR em tempo real;
  - Conteúdo proteico de Mfn1 e Drp1, proteínas envolvidas nos processos de fusão e fissão mitocondrial, respectivamente, utilizando-se a técnica de Western Blot;
  - Número, tamanho e morfologia mitocondrial através de microscopia eletrônica de transmissão.
- Quantificar os seguintes parâmetros em células astrocíticas de linhagem C6 ou em cultura primária de astrócitos corticais expostas a MG ou AGEs:
    - Conteúdo proteico de Mfn1 e Drp1, por citometria de fluxo;
    - Número, tamanho e morfologia mitocondrial através de microscopia eletrônica de transmissão;
    - Autofagia, por microscopia eletrônica de transmissão e por microscopia de fluorescência;
    - Respiração mitocondrial por respirometria de alta resolução;
    - Potencial de membrana mitocondrial, utilizando-se a sonda JC-1, e análise por fluorimetria e microscopia de fluorescência.

### 3. JUSTIFICATIVA

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são um problema de saúde global e uma ameaça à saúde e ao desenvolvimento humano. A carga dessas doenças recai especialmente sobre países de baixa e média renda (WHO, 2005), e é estimado que três DCNTs, incluindo diabetes, doença de coração e acidente vascular cerebral, levarão a uma perda da economia brasileira de aproximadamente R\$ 8 bilhões entre 2006 e 2015 (Schramm et al., 2004). Embora o DM represente um dos principais problemas de ordem mundial, ainda pouco se sabe sobre os efeitos da hiperglicemia sobre o sistema nervoso central e a predisposição destes pacientes ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. Considerando que *i*) um dos principais problemas que acometem os pacientes diabéticos é a neuropatia, tanto central como periférica; *ii*) a disfunção mitocondrial está envolvida tanto no DM como em doenças neurodegenerativas; *iii*) a sobrevivência de células nervosas dependem do correto funcionamento mitocondrial, e *iv*) a

hiperglicemia persistente gera potentes oxidantes mitocondriais (MG e AGEs), o desenvolvimento deste trabalho se justificou na forma de auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pelas alterações neurológicas no DM e/ou na predisposição de indivíduos com hiperglicemia crônica ter aumentado o risco para o desenvolvimento de doenças do sistema nervoso central, e na possibilidade de desenvolver novos horizontes terapêuticos, que terão como alvo a manutenção do correto funcionamento mitocondrial em situações de hiperglicemia crônica.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

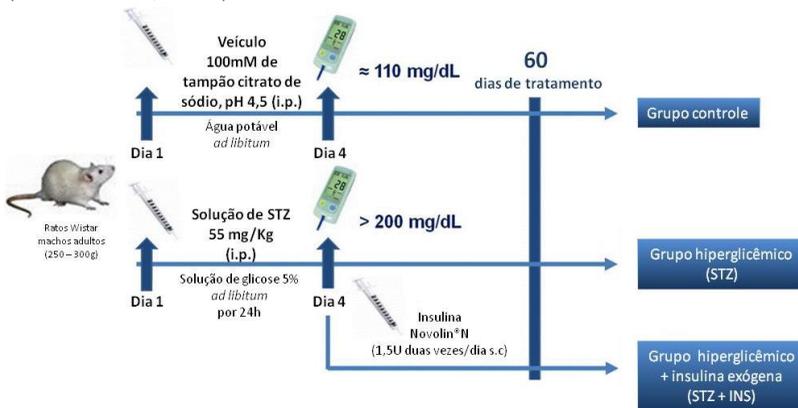
### **4.1. ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar machos de 60 dias de vida (250-300 g), obtidos a partir do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, Brasil. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da mesma Universidade, com temperatura controlada ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e em um ciclo claro/escuro de 12h. Estes foram mantidos em caixas de plástico individuais, com livre acesso à água e à ração comercial para roedores (Nuvital -PR, Brasil), com exceção dos períodos em que os ratos deveriam permanecer em jejum (6 horas), para as mensurações relacionadas à glicose sanguínea. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA (PP00350/CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, e foi realizado em conformidade com o “Guia de Princípios para o uso de Animais em Toxicologia” adotado pela sociedade de toxicologia em Julho de 1989. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

### **4.2. MODELO EXPERIMENTAL DE DM: INDUÇÃO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL (I.P.) DE ESTREPTOZOTOCINA (STZ)**

A hiperglicemia foi induzida por uma única injeção i.p. de 55 mg/kg de STZ diluída em tampão citrato de sódio (pH 4,5), após um período de jejum de 14 horas. Controles foram executados em paralelo, os quais receberam somente a injeção i.p. de veículo (tampão citrato de sódio, pH 4,5, grupo controle). Após a administração de STZ, os ratos

receberam para beber água contendo glicose a 5 % durante 24 horas, a fim de evitar a morte por hipoglicemia. As concentrações de glicose no sangue foram avaliadas quatro dias após a administração de STZ (ou veículo). A glicemia foi mensurada utilizando-se um glicosímetro (Optium™ Xceed , Abbott, EUA). Os animais com níveis de glicose sanguínea superior a 200 mg/dL (11 mmol/L) foram considerados hiperglicêmicos, e foram divididos em dois grupos, o grupo STZ, em que os animais permaneceram hiperglicêmicos durante 60 dias, e o grupo STZ + INS, em que os animais receberam por via subcutânea (s.c.) 1,5 UI de insulina Novolin® N (Novo Nordisk Laboratories, Princeton, NJ, EUA), duas vezes ao dia durante 60 dias, afim de normalizar os níveis de glicose no sangue, como indicado no Esquema 1. De modo a assegurar o estrito controle glicêmico exercido pela insulina, os níveis de glicose no sangue foram analisados semanalmente (Remor et al., 2011).



**Esquema 1.** Desenho experimental. Desenvolvimento de hiperglicemia pela administração de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar adultos. Para detalhes, ver Material e Métodos.

Após 60 dias de hiperglicemia, alguns animais foram mortos por decapitação e o córtex cerebral foi dissecado para análise, conforme descrito nas seções seguintes. Os demais animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.) e perfundidos com heparina (1000 U/ml) em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), seguido pela perfusão com paraformaldeído a 4%, em solução salina fisiológica. O córtex cerebral e o bulbo olfatório foram rapidamente removidos e pós-fixados em paraformaldeído a 4% (para a realização da técnica de imunofluorescência) ou estas estruturas foram seccionadas em peças de

1 mm x 1 mm e imersas em uma solução contendo paraformaldeído a 4% e glutaraldeído 1,5 % em tampão cacodilato 0,1 M, durante 24 horas, para a análise por microscopia eletrônica de transmissão.

#### 4.3. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DRP1 E MFN1 POR WESTERN BLOT

O córtex cerebral foi homogeneizado em cinco volumes (1:5, v/v) de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM, Triton X-100 a 1% , glicerol a 10% e coquetel inibidor de protease [Sigma]). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, durante 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi coletado e diluído em 1 volume (1:1, v/v) de tampão Tris 100 mM, pH 6,8 contendo EDTA 4 mM e SDS a 8%. Após, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos e o tampão de diluição (Tris 100 mM, com 40% de glicerol e azul de bromofenol, pH 6,8), numa proporção 25:100 (v/v), e  $\beta$ -mercaptoetanol (na concentração final de 8%), foram adicionados nas amostras.

As proteínas foram isoladas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio [SDS]) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 10% e gel de entrada a 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 150 mV durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e transferidos para membranas de nitrocelulose usando um sistema *semi-dry* (1,2 mA/cm<sup>2</sup>; 1,5 h) como descrito por Bjerrum e Heegaard (1988). Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S.

Após, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Drp1 e Mfn1 foram detectadas após incubação *overnight* (4°C) com anticorpos específicos para estas proteínas diluídos em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) na diluição de 1:250 (Santa Cruz Technology). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-coelho (conjugado à peroxidase) e reveladas em filme radiográfico, após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose (LumiGLO), de acordo com as recomendações do fabricante. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- $\beta$ -

actina (1:2000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas foi aplicada no gel. Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguidos por três lavagens (5 minutos) com TBS-T. As bandas imunorreativas foram quantificadas usando o software Scion Image® (Lopes et al., 2012).

#### 4.4. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TFAM, NRF1, NDUFA6 E COXI POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL (RT-PCR)

O RNA total foi isolado a partir de córtex cerebral dos grupos controle, STZ e STZ+INS, como indicado pelo fabricante do produto TRI Reagent (Sigma). A concentração e pureza do RNA extraído foram determinadas através de um espectrofotômetro NanoDrop, a 260 nm e a 280 nm. O cDNA foi construído a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se o kit “M-MLV Reverse Transcriptase” (Sigma). A reação foi realizada em microtubo de 0,2 mL contendo o tampão da enzima M-MLV transcriptase reversa, 0,1 M DTT, RNase OUT, Oligodt, 10 mM dNTP e a enzima M-MLV transcriptase reversa (e quantidade de água suficiente para completar 20 µL). Os microtubos foram colocados para reação em um Termociclador Eppendorf, de acordo com o seguinte protocolo: 25°C por 10 minutos, 37°C durante 50 minutos e 4°C por 10 minutos, seguindo as instruções do manual do produto e descrito previamente (Jiang et al., 2006).

A reação foi realizada utilizando o kit “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), contendo cerca de 10-100 ng de cDNA, em um volume final de 15 µL e na presença de 0,3 µM de *primers* dos tipos *forward* ou *reverse*. Foram utilizados primers específicos para proteínas envolvidas na transcrição de genes mitocondriais e de proteínas mitocondriais, conforme descritos na tabela a seguir:

**Tabela 1.** Sequência de *primers* utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real.

Proteína	Primer sequência <i>forward</i>	Primer sequência <i>reverse</i>
β-actina	5'GCGTCCACCCGCGAGTACAAC3'	5'CGACGACGAGCGCAGCGATA3'
Tfam	5'AAATGGCTGAAGTTGGGCGAAGTG3'	5'AGCTTCTTGTGCCCAATCCAATG3'
NRF1	5'AGCATGGGCGGGAGGACCTT3'	5'TCCAACGGCTGCTGCGGTTT3'
NDUFA6	5'TAGCCTGGGCTGGAAC TAGA3'	5'TGTTGTGTTTGGCATGGACT3'
COXI	5'TCGCATCAAAAACGAG AAGTG3'	5'GGGTTCGAATCCTTCCTTTC3'

Os *primers* utilizados foram desenhados utilizando o programa “BLAST” disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, de acordo com os exons específicos para cada proteína. As reações foram realizadas num equipamento ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems), instalado no Laboratório Multiusuário de Estudo em Biologia (LAMEB), CCB, UFSC. A reação foi realizada com o seguinte protocolo: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 1 minuto, como descrito previamente (Jiang et al., 2006). Os resultados foram analisados utilizando o software Sequence Detection Systems (SDS) versão 2.4. Os dados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo β-actina, empregado como padrão (*housekeeping gene*). Os dados foram expressos em conteúdo relativo de mRNA em relação ao grupo controle.

#### 4.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS OXIDADAS POR MG

Após 24 horas em paraformaldeído a 4%, os cérebros foram seccionados, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Os cortes foram realizados em micrótomo rotativo, na espessura de 7 μM. Os cortes foram primeiramente desparafinizados em xilol e hidratados em etanol. A imunofluorescência foi realizada para identificar o conteúdo de proteínas oxidadas por MG no córtex cerebral, usando anticorpo primário monoclonal anti-metilgloxal (JaICa) em uma diluição 1:400 e incubadas *overnight*, seguido de lavagens com PBS. Após, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário Alexa Fluor 633 anti-camundongo (diluição 1:1000) durante 1 hora a 37°C, seguido

de lavagens com PBS e montagem da lâmina utilizando-se Gel Mount (Sigma). Os tecidos dos grupos controle e dos grupos STZ e STZ+INS foram colocados na mesma lâmina, dessa forma sendo processados sob as mesmas condições. A análise do conteúdo de proteínas oxidadas por MG foi realizada nas cinco camadas do córtex. As análises histológicas foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus modelo BX41 e para as fotografias foi utilizado o sistema de captura de imagens Q-capture Pro 5.1. A análise da fluorescência foi realizada em 5-8 campos aleatórios, através da análise de densidade óptica, utilizando-se o software ImageJ<sup>®</sup>, e os dados foram expressos através da média de densidade óptica.

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação de proteínas dos homogeneizados foram realizados pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

#### 4.7. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR DE ASTROGLIOMA C6

A linhagem celular de astroglioma C6 foi obtida de *American Type Culture Collection* (Rockville, Maryland, EUA). Estas células adotam características de astrócitos (células 99% GFAP positivas) e tem sido empregada como modelo experimental para o estudo do efeito *in vitro* de numerosos toxicantes (Haghighat e McCandless, 1997; Haghighat et al., 2000). As células foram cultivadas em frascos em meio Eagle's com modificação de Dubelcco (DMEM) contendo 2,5 mg/mL de Fungizone<sup>®</sup> e 100 U/L de gentamicina, suplementadas com 5 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB), e mantidas a 37 °C com um mínimo de 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram tratadas com 0,05% de tripsina/ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) e cultivadas em distintas placas para as diferentes análises (dos Santos et al., 2006). Após confluência, o meio foi trocado por DMEM contendo SFB 1% e contendo BSA 1 mg/mL ou MG-BSA 0,1 e 1 mg/mL, durante 24 ou 48 horas.

#### 4.8. FORMAÇÃO DE AGES A PARTIR DE MG (MG-BSA)

Para a geração de proteínas oxidadas por MG, BSA na concentração de 7,2 mg/mL foi exposta ao MG na concentração de 100

mM em tampão fosfato de sódio 100mM, pH 7,4 a 37°C por 50 horas em condições estéreis (as soluções foram filtradas em membrana de 0,22 µm). Após este período, estas soluções modificadas de proteínas foram dialisadas em tampão bicarbonato de amônio 30 mM, pH 7,9 a 4°C, e congeladas a -20 °C (Remor et al., 2011).

#### 4.9. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetilialzolib-2,5 difeniltetrazólio) foi utilizado para análise da viabilidade celular após exposição das células a MG, BSA ou MG-BSA. O ensaio do MTT baseia-se na clivagem deste composto, que é amarelo, pelas desidrogenases mitocondriais, formando um composto púrpura, o formazan, o qual pode ser quantificado por espectrofotometria. As células foram incubadas com BSA 1 mg/ml ou MG-BSA (0,1 e 1 mg/mL) durante 24 e 48 horas, ou com 30 µM e 300 µM de MG durante 60 min. Durante o período de incubação, as células foram mantidas em estufa a 37 °C, com um mínimo de 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO<sub>2</sub>. No final do período de incubação, o teste do MTT foi realizado. A formação do formazan foi analisada espectrofotometricamente a 570nm. Os resultados foram expressos em percentagem dos controles, no qual foram atribuídos 100% de atividade (Mosmann, 1983).

#### 4.10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As células tratadas com BSA 1 mg/mL ou MG-BSA 0,1 e 1 mg/mL, após 24 ou 48 horas de incubação, foram tripsinizadas, centrifugadas e fixadas em uma solução contendo 4% de paraformaldeído e 1,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1M durante 24 horas. Posteriormente, as células ou as peças de tecido (córtex cerebral e bulbo olfatório) foram submetidas a três lavagens de 30 minutos em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4. Em seguida, estas amostras foram colocadas em tampão cacodilato contendo tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, e foram novamente lavadas em tampão cacodilato. O material foi posteriormente desidratado em concentrações crescentes de acetona (30; 50; 10; 90 e 2 vezes em 100% durante 20 minutos, a temperatura ambiente) e imerso em solução de acetona e resina Spurr ou araldita, a temperatura ambiente (2:1; 1:1 e 1:2). Finalmente, as peças foram tratadas com resina pura (24 horas em estufa

a 58-60°C, para solidificação) para posterior microtomia, a qual foi realizada em ultramicrotomo na espessura de 60 – 70 nm (Hernandez-Fonseca et al., 2009).

As análises de morfologia mitocondrial foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM-101 (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC) e para as fotografias foi utilizado o sistema de captura de imagens Gatan Digital Micrograph; ou utilizando-se o microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Leo 906 E (Centro de Microscopia Eletrônica da *Universidad Nacional de Córdoba*) equipado com a câmera digital Megaview III. Para a análise quantitativa do conteúdo mitocondrial e dos vacúolos autofágicos, três passagens diferentes de células ou o córtex cerebral de três animais de cada condição experimental foram utilizados. Foram adquiridas sessenta micrografias, de forma aleatória, na magnificação de 10.000 X (para as células e bulbo olfatório) ou na magnificação de 40.000 X (para córtex cerebral). O software Image J foi utilizado para as análises, inclusive para a mensuração da área mitocondrial (De Paul et al., 1997).

#### 4.11. CITOMETRIA DE FLUXO

As células tratadas com BSA 1 mg/ml ou MG-BSA 0,1 e 1 mg/mL foram fixadas com a solução comercial Citofix (solução de paraformaldeído a 4%; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), durante 20 minutos a 4 °C e permeabilizadas com a solução comercial Perm/Wash (contendo soro fetal bovino e saponina; BD Biosciences Pharmingen). Em seguida, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários (anti-Mfn1: 1:250; anti-Drp1: 1:200; Santa Cruz Technology) *overnight* a 4°C, seguido por incubação com anticorpo secundário anti-coelho Alexa 647 (1:2000; Invitrogen) durante 60 min, a 4°C. Por fim, as células foram lavadas, ressuspendidas em PBS e analisadas por citometria de fluxo ( $1 \times 10^5$  eventos/tratamento experimental; Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ). A análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR), determinando o conteúdo de Mfn1 e Drp1 pela média geométrica da intensidade de fluorescência (Sosa et al., 2012).

#### 4.12. IDENTIFICAÇÃO DE AUTOFAGIA POR IMUNOFLORESCÊNCIA

Para esta metodologia, células C6 de astroglioma foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares. Após o

tratamento com BSA 1 mg/mL ou MG-BSA 0,1 e 1 mg/mL, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%, durante 24 horas. Após este período, as células foram lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%, e os antígenos inespecíficos foram bloqueados usando-se uma solução de PBS contendo BSA a 5%. A imunofluorescência foi realizada para identificar o conteúdo de vacúolos autofágicos nestas células, usando anticorpo primário monoclonal anti-LC3B (Invitrogen) em uma diluição 1:1000 e incubadas *overnight*, seguido de lavagens com PBS. Após, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-coelho durante 1 hora a 37°C, seguido da marcação nuclear com DAPI, de lavagens com PBS e montagem da lâmina utilizando-se Gel Mount (Sigma). As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência Olympus modelo BX41 e para as fotografias foi utilizado o sistema de captura de imagens Q-capture Pro 5.1. A análise da fluorescência foi realizada em 7-10 campos aleatórios, utilizando-se o software ImageJ<sup>®</sup>.

#### 4.13. RESPIROMETRIA DE ALTA RESOLUÇÃO

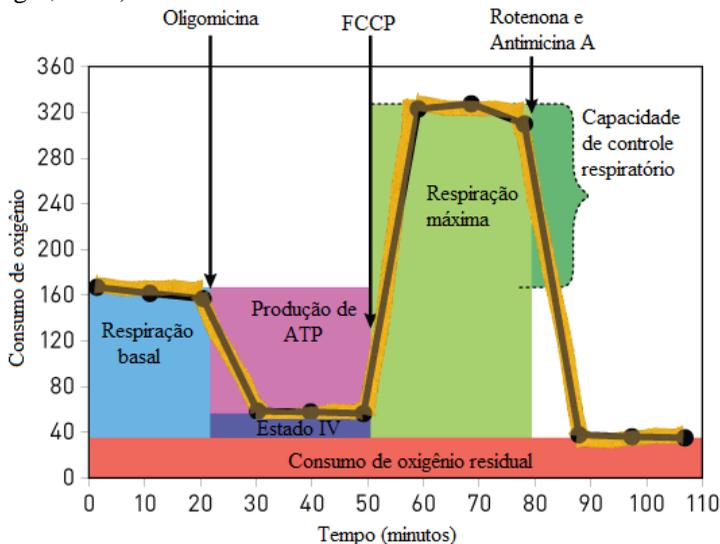
A análise da respiração mitocondrial de células de astroglioma (C6) foi realizada em um oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria), a 37°C. A calibração do equipamento com meio DMEM sem SFB foi realizada diariamente. As células foram inseridas no *chamber* a uma concentração de 250.000 células/mL em meio DMEM sem SFB. Primeiramente, aguardou-se a estabilização do consumo de oxigênio, sem a adição de substratos ou inibidores da respiração, determinado de respiração basal. Após, veículo (dimetil sulfóxido - DMSO) ou MG numa concentração final de 30 ou 300  $\mu$ M foi adicionado no *chamber* e observou-se a respiração basal durante 15 minutos, após a estabilização. Após, este período, foram observados os seguintes parâmetros da respiração mitocondrial:

1- Estado IV de respiração mitocondrial: Este estado respiratório está representado pelo consumo de oxigênio ocasionado pela transferência de elétrons através da CR. Neste estado não há síntese de ATP e experimentalmente é estudado analisando o consumo de oxigênio (aproximadamente durante 4 minutos) após adicionar oligomicina no meio. A oligomicina é um inibidor da subunidade F<sub>0</sub> da ATP sintase ou complexo V da CR. O efeito induzido por esta inibição é caracterizado por uma marcada redução no consumo de oxigênio (Nelson e Cox, 2004).

2- Respiração máxima: Este parâmetro representa o consumo de oxigênio observado após titular o sistema experimental com o desacoplador mitocondrial FCCP (carbonilcianeto-4-trifluorometoxi fenil-hidroxona). Ionóforos como o FCCP permitem que íons inorgânicos passem facilmente através das membranas. Eles desacoplam a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa por dissipar os prótons que formam o gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial (Nelson e Cox, 2004). Este parâmetro indica a capacidade máxima mitocondrial em transferir elétrons (Gnaiger, 2001).

3- Capacidade de controle respiratório (respiração máxima / estado IV): Índice utilizado para determinar a contribuição dos diferentes estados respiratórios, calculado utilizando a respiração máxima e o estado IV da respiração (Sjovall et al., 2010).

4- Consumo de oxigênio residual: Indica o consumo de oxigênio não proveniente da respiração mitocondrial, representado pela redução incompleta do oxigênio em espécies reativas. A produção de espécies reativas de oxigênio é observada após adicionar rotenona, que inibe o complexo I da CR, e antimicina A, inibidor do complexo III. Desta forma, com a cadeia transportadora de elétrons inibida, o oxigênio que está sendo consumido não é devido a passagem de elétrons pela CR (Gnaiger, 2001).



**Figura 8.** Gráfico representativo das curvas que mostram o consumo de oxigênio por um sistema celular em um experimento de respirometria clássica (Adaptado de <http://www.seahorsebio.com>).

Os dados foram coletados por meio do software DatLab 4.3 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria), avaliando a concentração e o fluxo de oxigênio após a adição de inibidores e desacopladores da CR mitocondrial.

Além disso, observou-se a respiração basal de células C6 na presença de ácido octanóico (os ácidos graxos são conhecidos desacopladores mitocondriais (Berg et al., 2007) e 2,3-butanodiona (um composto estruturalmente semelhante ao MG). Estes compostos foram adicionados no *chamber* do oxígrafo para comparar os efeitos destes com o efeito observado pelo MG. Além disso, uma curva de titulação foi realizada com MG (1-30  $\mu\text{M}$  e 100-3000  $\mu\text{M}$ ) e a respiração basal foi observada.

#### 4.14. CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS CORTICAIS

Cultura primária de astrócitos foram preparados a partir de córtex cerebral de ratos com 1-2 dias de vida, de acordo com Olivera et al. (2008) (Olivera et al., 2008). Os astrócitos foram cultivados a  $2 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  e mantidas em meio DMEM suplementado com SFB a 10%, 3,6 g/l de HEPES, 100 IU/mL de penicilina e 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina; e mantidas em uma estufa a 37 °C, com um mínimo de 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de  $\text{CO}_2$ . Quando as células adquiriram confluência, os astrócitos foram expostos a BSA 1 mg/mL e MG-BSA 0,1 e 1 mg/mL durante 48 horas. As células foram utilizadas para as análises referentes à mensuração do  $\Delta\psi\text{m}$ , através da sonda JC-1.

#### 4.15. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

A sonda JC-1 foi utilizada para a mensuração do  $\Delta\psi\text{m}$ , de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, após as células serem expostas ao BSA 1 mg/mL ou ao MG-BSA 0,1 e 1 mg/mL, estas foram lavadas com PBS estéril e em seguida incubadas com a sonda JC-1 (3  $\mu\text{M}$ ), durante 10 min, em uma estufa com atmosfera controlada (37 °C, 95% de  $\text{O}_2$ /5% de  $\text{CO}_2$ ) (Cassina et al., 2008). As células foram novamente lavadas com PBS e imediatamente fotografadas em um microscópio de fluorescência Olympus FV300, ou analisadas fluorimetricamente, a 590 nm e 520 nm.

#### 4.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA), seguido pelo *post hoc* de Tukey, quando *F* foi considerado significativo. Para a análise estatística referente aos resultados de titulação com o MG, utilizou-se a ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Apenas valores significativos de *F* são citados no texto. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Os gráficos foram construídos utilizando-se o software GraphPad Prism 5<sup>®</sup>.

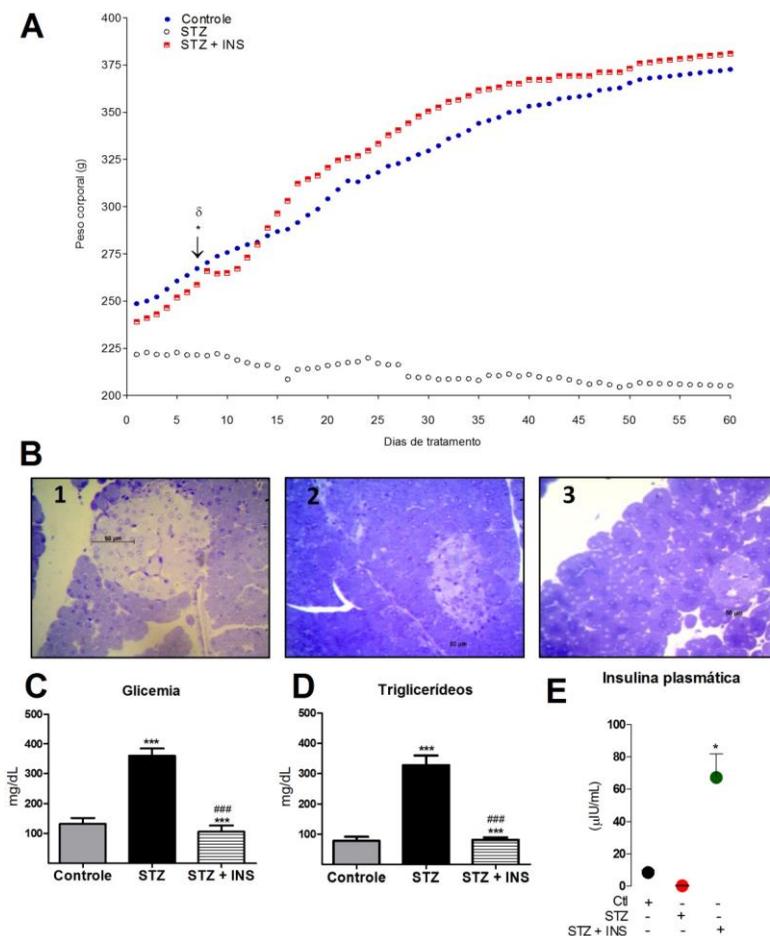
### 5. RESULTADOS

#### 5.1. DINÂMICA E BIOGÊNESE MITOCONDRIAL EM MODELO ANIMAL DE HIPERGLICEMIA CRÔNICA E EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA

##### 5.1.1. Caracterização do modelo de hiperglicemia crônica induzido pela administração de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar

A Figura 9 mostra o efeito da administração de STZ sobre a massa corporal, anatomia das ilhotas de Langerhans e sobre parâmetros bioquímicos em ratos Wistar adultos. A Figura 9A mostra a redução do ganho de peso corporal em animais que receberam injeção i.p. de STZ, durante os 60 dias que permaneceram hiperglicêmicos. Pode-se observar que o tratamento com insulina (grupo STZ+INS) preveniu contra a redução do ganho de peso corporal, apresentando massa corporal semelhante aos animais do grupo controle. A Figura 9B mostra uma diminuição no tamanho e alteração da arquitetura das ilhotas de Langerhans em todos os grupos tratados com STZ. Na Figura 9C observa-se um aumento na glicemia nos animais do grupo STZ, que foi prevenido pela administração de insulina. O perfil lipídico dos animais que receberam STZ também foi alterado, como mostra a Figura 9D, onde se observa um aumento nas concentrações plasmáticas de triglicérides, o qual foi prevenido pela administração de insulina. A Figura 9E mostra uma depleção quase total nas concentrações de insulina nos animais do grupo STZ, enquanto que os ratos que

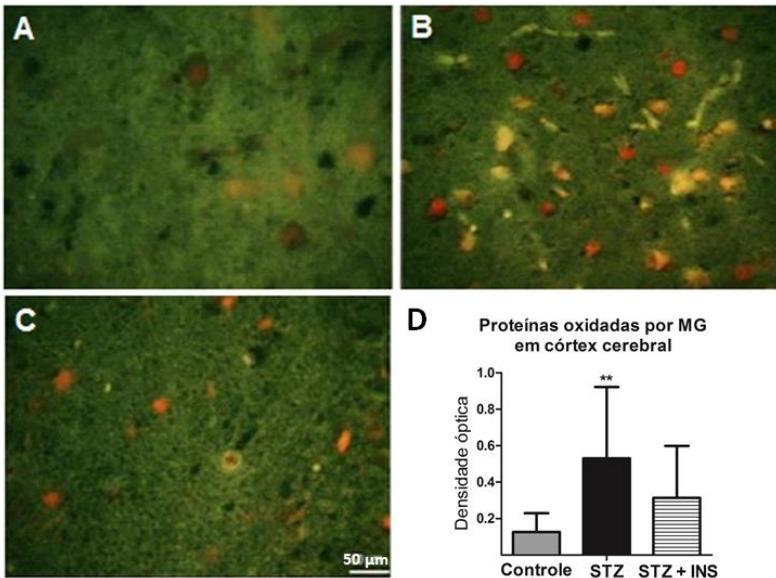
receberam insulina possuem valores maiores do que os controles (aumento de 1322% nos animais do grupo STZ + INS, comparados aos controles) (Matos et al., 2013; Trabalho de Mestrado em Bioquímica, ano de 2013).



**Figura 9.** Efeito da hiperglicemia crônica (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55mg/kg, via intraperitoneal), e da administração exógena de insulina (INS; insulina Novolin®N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea), sobre a massa corporal (A), morfologia das ilhotas de Langerhans (B), glicemia (C), triglicerídeos plasmáticos (D) e insulinemia (E) de ratos Wistar (machos, 60 dias, 250 – 300g). Os dados estão representados como média do peso (N= 7 a 11 animais por grupo). O peso corporal foi

significativamente diferente entre os grupos controle e STZ no dia 7 (\*) e entre STZ e STZ + INS no dia 7 ( $\delta$ ) (ANOVA de uma via com modelo linear). A morfologia das ilhotas de Langerhans foi obtida a partir de cortes semifinos de pâncreas corados com azul de toluidina e observados em microscópio óptico em uma magnificação de 400X. B1: Controle; B2: STZ; B3: STZ + INS. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média (n = 4-6 animais por grupo). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ , comparado ao grupo controle; ## $P < 0,01$ , comparado ao grupo STZ (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey). Reproduzido com autorização de Matos, 2013.

A Figura 10 mostra o efeito da hiperglicemia crônica sobre a formação e acúmulo de proteínas oxidadas por MG (MG-AGEs) no cérebro de animais hiperglicêmicos. A Figura 10B mostra o acúmulo de MG-AGEs no córtex cerebral de animais com hiperglicemia crônica, efeito que foi prevenido de forma parcial pela administração de insulina (Figura 10C) [ $F_{(2,37)} = 6,29$ ;  $P < 0,01$ ].

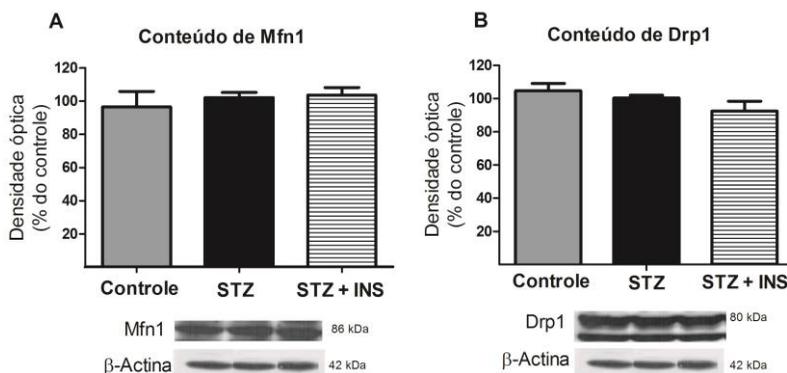


**Figura 10.** Conteúdo de proteínas oxidadas por metilglioxal (imunofluorescência) em córtex cerebral de ratos Wistar (machos; 60 dias de vida; 250-300 g) submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg; via intraperitoneal; durante 60 dias), e/ou tratados com insulina (STZ+INS; insulina Novolin<sup>®</sup>N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea). A magnificação das fotografias corresponde a 400x. A: Grupo Controle; B: Grupo STZ; C: Grupo STZ + INS. A barra

representa 50  $\mu\text{m}$ . A intensidade total de pixels foi determinada e os dados representam a média da densidade óptica  $\pm$  erro padrão da média ( $n=3$  animais por grupo). \*\* $P < 0,01$ ; comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey).

### 5.1.2. Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e/ou da insulina (INS) sobre o conteúdo de proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial no córtex cerebral de ratos Wistar

As Figuras 11 A e B mostram o conteúdo das proteínas Mfn1 e Drp1, proteínas relacionadas aos processos de fusão e fissão mitocondrial, respectivamente, no córtex cerebral de animais dos grupos controle, STZ e STZ+INS. As figuras mostram que nem o estado hiperglicêmico crônico, nem a normalização desta pela administração de INS modificaram o conteúdo total (incluindo a fração fosforilada) das proteínas Mfn1 e Drp1, em homogeneizados corticais de ratos Wistar.



**Figura 11.** Conteúdo das proteínas Mfn1 (A) e Drp1 (B) em homogenato de córtex cerebral de ratos Wistar (machos; 60 dias de vida; 250-300 g) submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg; via intraperitoneal; durante 60 dias), e/ou tratados com insulina (STZ+INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea). Os dados foram normalizados através da análise do conteúdo proteico de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos como percentagem do controle. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n= 3$  animais por grupo) (ANOVA de uma via).

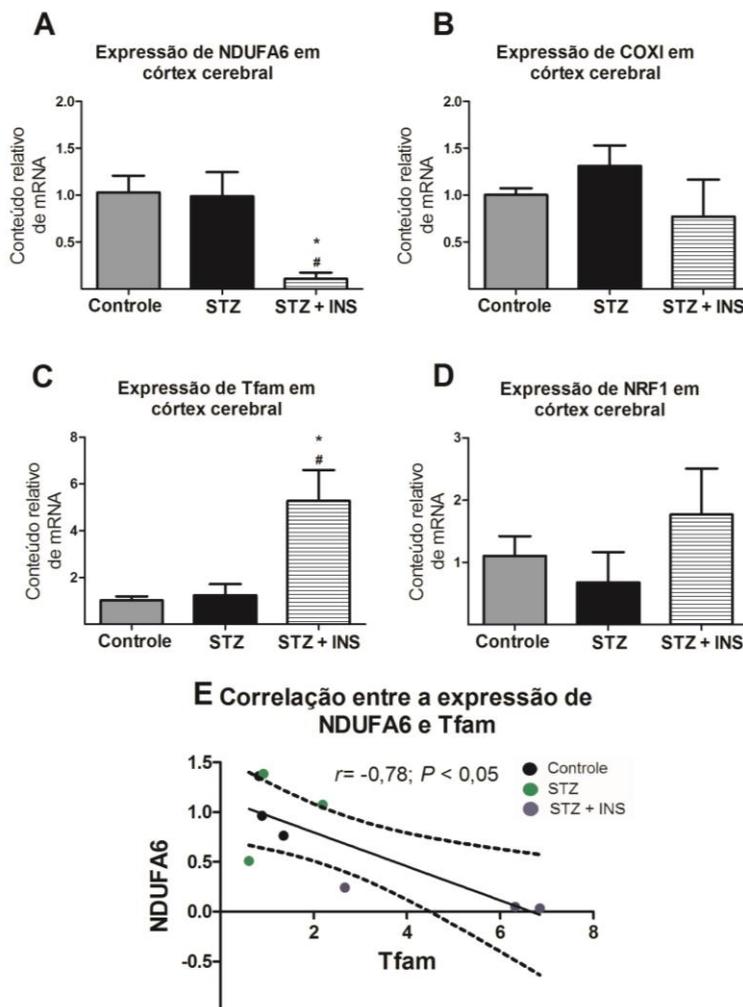
### **5.1.3. Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e/ou da insulina (INS) sobre o conteúdo de mRNA de proteínas envolvidas na fisiologia mitocondrial no córtex cerebral de ratos Wistar**

As Figuras 12 A-D mostram a expressão dos genes que codificam para as proteínas transferidoras de elétrons, NDUFA6 e COXI, e para as proteínas Tfam e NRF1, envolvidas no processo de biogênese mitocondrial. Pode ser observado na Figura 12A, que houve uma redução significativa no conteúdo de mRNA de NDUFA6 no córtex cerebral dos animais do grupo STZ+INS, quando comparado com os grupos controle e STZ [ $F_{(2,6)} = 8,05$ ;  $P < 0,05$ ]. A Figura 12C mostra um aumento significativo no conteúdo de mRNA de Tfam no córtex cerebral dos animais do grupo STZ+INS, quando comparado com os grupos controle e STZ [ $F_{(2,6)} = 8,65$ ;  $P < 0,05$ ], e que este aumento correlacionou significativamente e de forma inversa com NDUFA6 ( $r = -0,78$ ;  $P < 0,05$ ). No entanto, a quantidade de cópias de mRNA de COXI e de NRF1 não foram significativamente modificadas pelos tratamentos (Figuras 12B e D).

### **5.1.4. Efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ) e/ou da insulina (INS) sobre o conteúdo e morfometria mitocondrial no córtex cerebral e no bulbo olfatório de ratos Wistar**

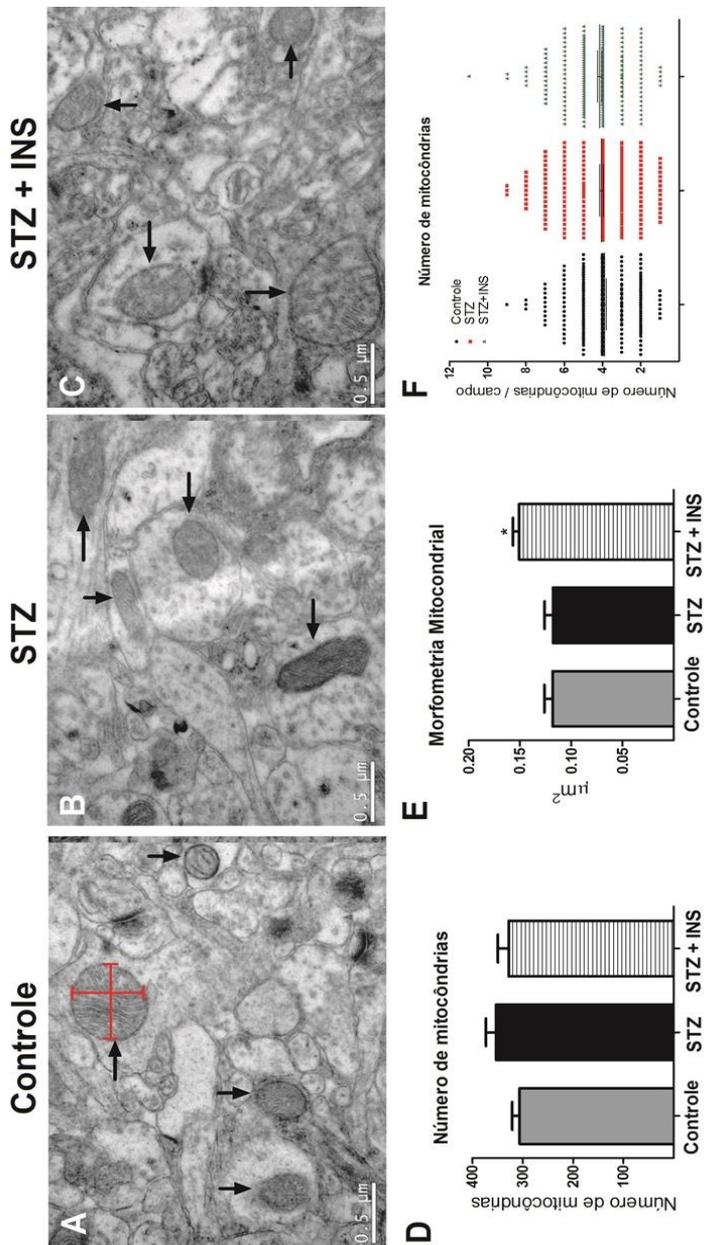
As figuras 13A-C mostram imagens representativas de células neurais do córtex cerebral de animais dos grupos controle, STZ e STZ+INS analisados por microscopia eletrônica de transmissão. A Figura 13E mostra que as mitocôndrias de córtex cerebral dos animais hiperglicêmicos que receberam a administração de insulina (grupo STZ+INS) são maiores que as mitocôndrias de córtex cerebral dos grupos de animais hiperglicêmicos (STZ) e controles [ $F_{(2,6)} = 7,39$ ;  $P < 0,05$ ]. As figuras 13D e 13F mostram que o número de mitocôndrias não foi alterado entre os grupos analisados.

As figuras 14A-C mostram imagens representativas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de células neurais do bulbo olfatório de animais do grupo controle, STZ e STZ+INS. A Figura 14D mostra que há um aumento do número de mitocôndrias em bulbo olfatório de animais do grupo STZ e STZ+INS, comparado ao controle [ $F_{(3,36)} = 18,42$ ;  $P < 0,001$ ].



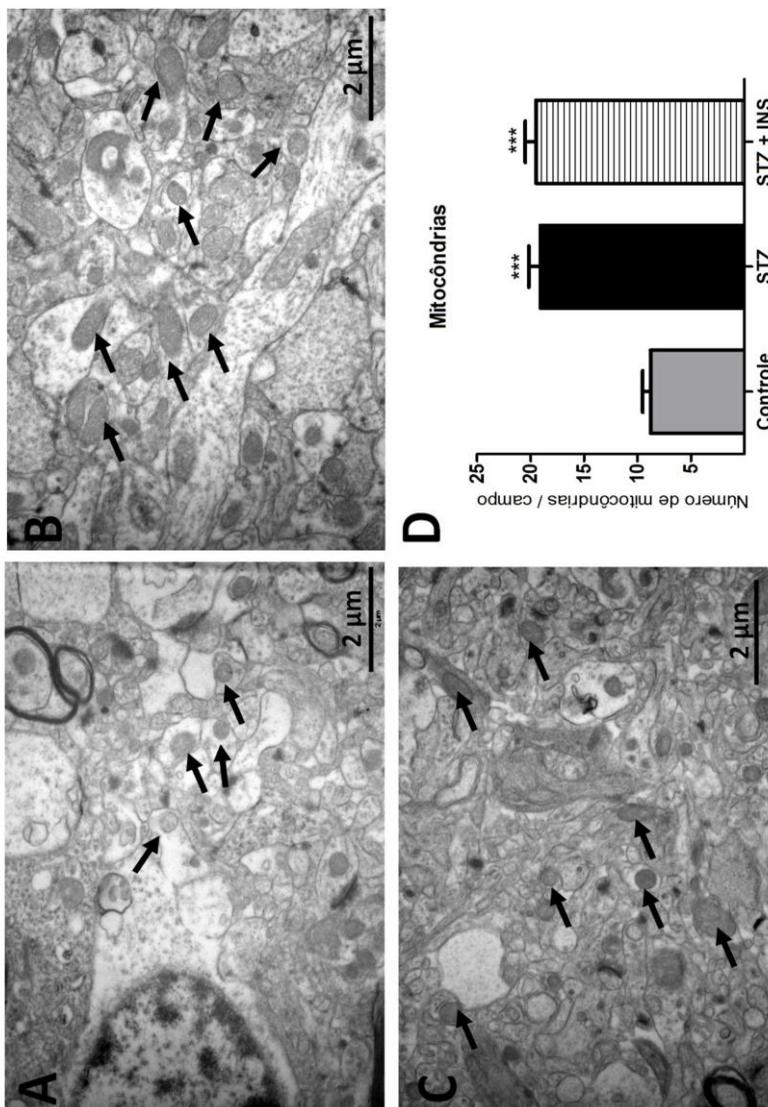
**Figura 12.** Expressão relativa de genes que codificam para as proteínas NDUFA6 (A), COXI (B), Tfam (C) e NRF1 (D) no córtex cerebral de ratos Wistar (machos; 60 dias de vida; 250-300 g) submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg; via intraperitoneal; durante 60 dias), e/ou tratados com insulina (STZ+INS; insulina Novolin<sup>®</sup>N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea). (E) Correlação entre o conteúdo de mRNA de Tfam e NDUFA6. Os resultados foram normalizados mediante a quantificação da expressão do gene que codifica para  $\beta$ -actina. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média.  $P < 0,05$ ; comparado ao grupo

controle; <sup>#</sup> $P < 0,05$ ; comparado ao grupo STZ (n= 3 animais por grupo) (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).



**Figura 13.** Conteúdo e morfometria mitocondrial no córtex cerebral de ratos Wistar (machos; 60 dias de vida; 250-300 g) submetidos à hiperglicemia

crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg; via intraperitoneal; durante 60 dias), e/ou tratados com insulina (STZ+INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea). As fotografias A-C são representativas da análise ultraestrutural realizada por microscopia eletrônica de transmissão. A magnificação das fotografias corresponde a 40.000x. As barras representam 0,5  $\mu\text{m}$ . A morfometria refere-se à mensuração da área mitocondrial empregando o software ImageJ<sup>®</sup> (demonstrado pelas setas no interior da mitocôndria na Figura A). As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3 animais por grupo). \* $P < 0,05$ ; comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).



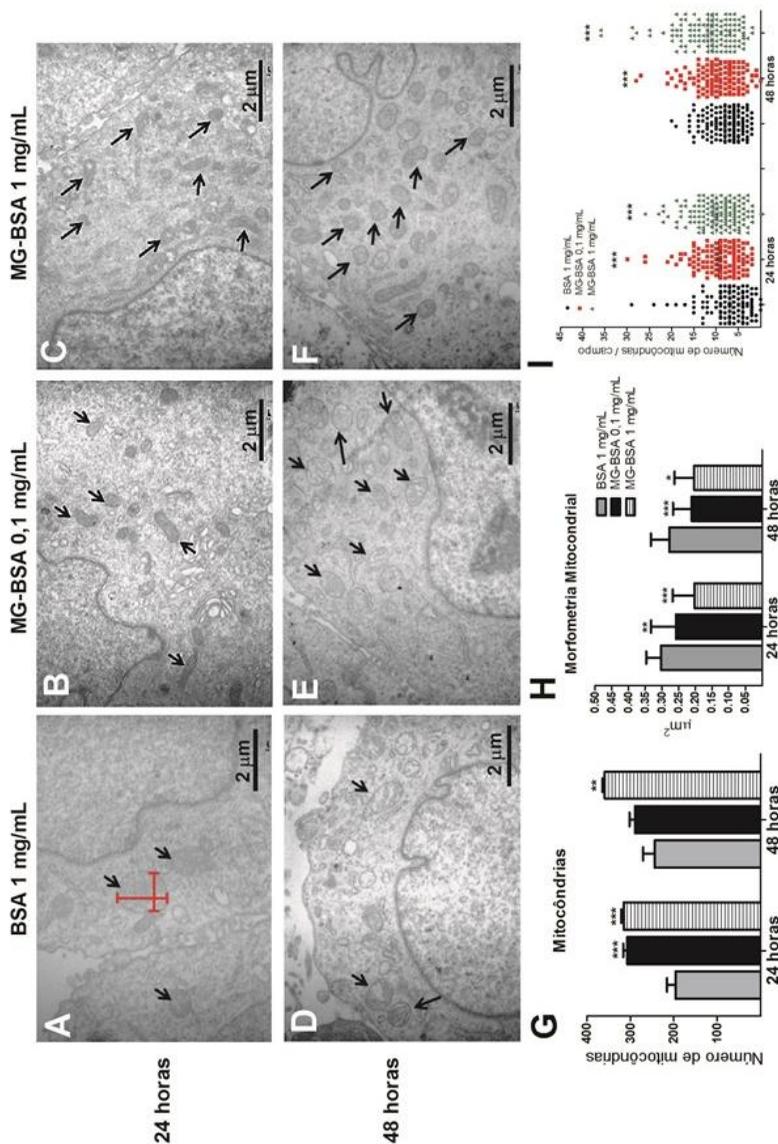
**Figura 14.** Conteúdo mitocondrial no bulbo olfatório de ratos Wistar (machos; 60 dias de vida; 250-300 g) submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg; via intraperitoneal; durante 60 dias), e/ou tratados com insulina (STZ+INS; insulina Novolin®N 1,5 UI duas vezes por dia; via subcutânea). As fotografias A-C são representativas da análise realizada por microscopia eletrônica de transmissão. A magnificação das

fotografias corresponde a 10.000x. As barras representam 2  $\mu\text{m}$ . A contagem de mitocôndrias foi realizada em campos aleatórios e a média de mitocôndrias/campo foi calculada. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3 animais por grupo). \*\*\*  $P < 0,001$ ; comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).

## 5.2. DINÂMICA E FISILOGIA MITOCONDRIAL EM CULTURA DE CÉLULAS ASTROCITÁRIAS EXPOSTAS A AGES E/OU MG

### 5.2.1. Efeito dos produtos terminais de glicação (AGEs) no conteúdo e morfometria mitocondrial em células C6 de astroglioma de rato

As Figuras 15 A-H mostram o efeito dos AGEs, representados por albumina sérica bovina oxidada com MG (0,1 e 1 mg/mL; 24 ou 48 horas), sobre o conteúdo e morfologia mitocondrial em células C6 de astroglioma de rato. Pode ser observado nas Figuras 15 A-G, um aumento significativo no número de mitocôndrias, após 24h e 48h de exposição a MG-BSA (24 horas: [ $F_{(2,6)} = 37,23$ ;  $P < 0,001$ ]; 48 horas: [ $F_{(2,6)} = 10,74$  ;  $P < 0,01$ ]). Ainda, pode ser observado que o aumento no número de mitocôndrias foi acompanhado por uma redução no tamanho da organela (Figura 15G) (24 horas: [ $F_{(2,471)} = 17,78$ ;  $P < 0,001$ ]; 48 horas: [ $F_{(2,432)} = 22,69$ ;  $P < 0,001$ ]).

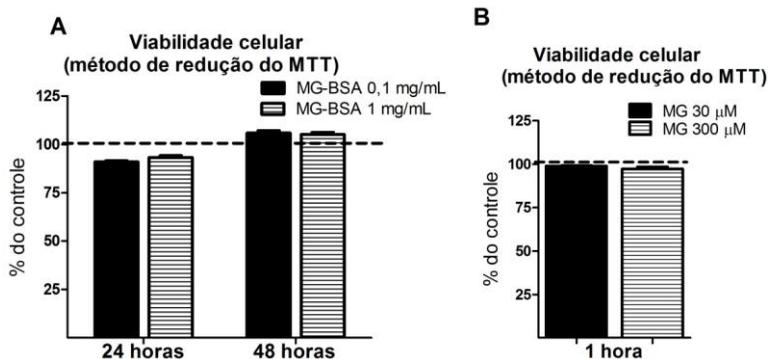


**Figura 15.** Efeito *in vitro* de produtos terminais de glicação (MG-BSA; 0,1 e 1 mg/mL; 24h e 48h) sobre o conteúdo e morfometria mitocondrial em células C6 de astroglioma de rato. As fotografias A-F são representativas da análise ultraestrutural realizada por microscopia eletrônica de transmissão. A magnificação das fotografias corresponde a 10.000x. As barras representam

2 $\mu$ m. A morfometria refere-se à mensuração da área mitocondrial, empregando o software ImageJ<sup>®</sup> (demonstrado pelas setas no interior da mitocôndria na Figura A). As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3 experimentos independentes). \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; comparado com a condição controle, representada por células expostas a 1 mg/mL de BSA por igual período de tempo (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).

### 5.2.2. Efeito dos produtos terminais de glicação (AGEs) e do metilglioxal sobre a viabilidade celular em células C6 de astroglioma de rato

As Figuras 16A e B mostram a viabilidade celular de células C6 de astroglioma de rato expostas durante 24 ou 48 horas a MG-BSA (0,1 e 1 mg/mL), ou durante 1 hora a MG (30 e 300 $\mu$ M). Como observado, os tratamentos realizados não alteraram a viabilidade destas células.

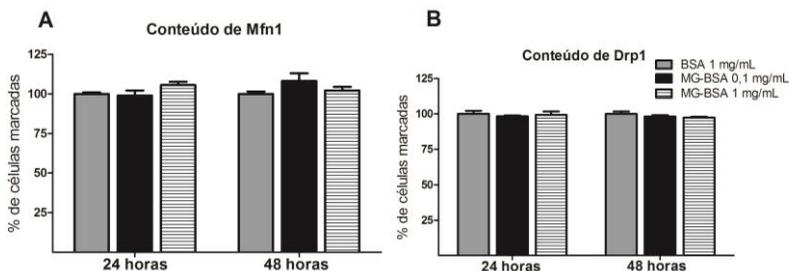


**Figura 16.** Efeito *in vitro* de MG-BSA (A; 0,1 e 1 mg/mL; 24 e 48 h) ou metilglioxal (B; MG; 30 e 300  $\mu$ M; 60 min) sobre a viabilidade celular (redução do MTT) em células C6 de astroglioma de rato. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3 experimentos independentes) (ANOVA de uma via).

### 5.2.3. Efeito dos produtos terminais de glicação (AGEs) sobre a dinâmica mitocondrial em células C6 de astroglioma de rato

As Figuras 17A e B mostram o efeito de AGEs (MG-BSA) sobre o conteúdo total das proteínas Mfn1 e Drp1, medido por citometria de fluxo, em células C6 de astroglioma de rato. Pode ser

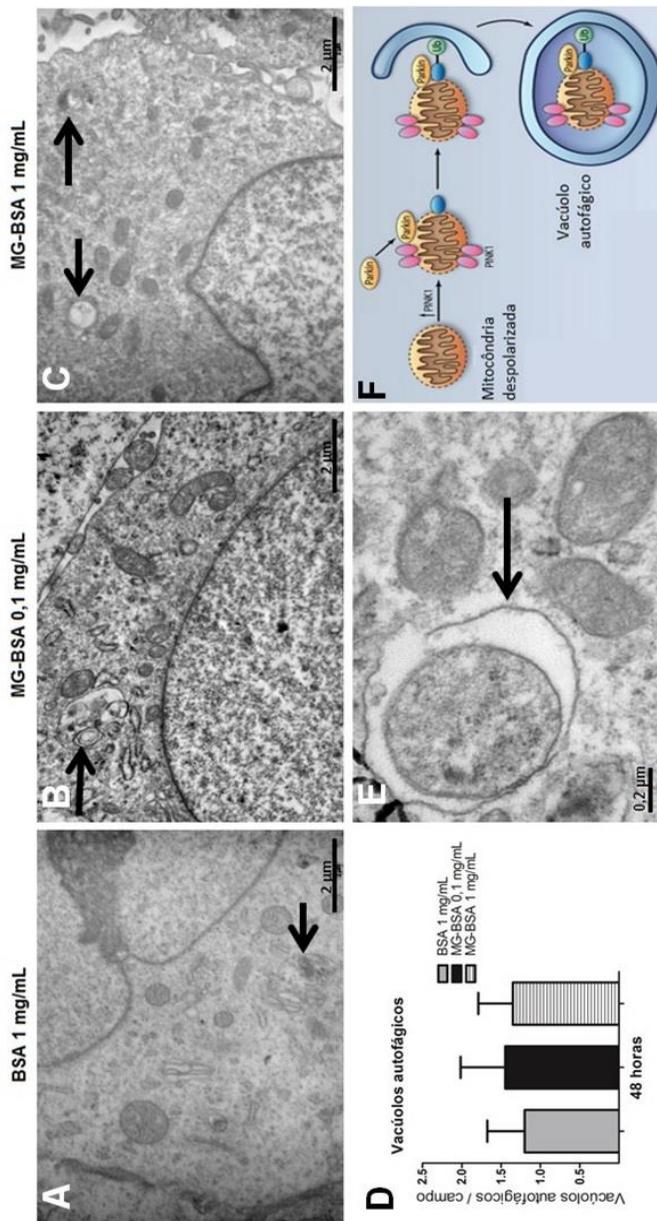
observado que o tratamento com o AGE não modificou o conteúdo total destas proteínas, incluindo a fração fosforilada.



**Figura 17.** Efeito *in vitro* de produtos terminais de glicação (MG-BSA; 0,1 e 1 mg/mL; 24h e 48h) sobre o conteúdo de Mfn1 (A) e Drp1 (B) em células C6 de astroglioma de rato. A quantificação do conteúdo proteico foi realizado por citometria de fluxo empregando anticorpo específico contra as proteínas analisadas. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3 experimentos independentes) (ANOVA de uma via).

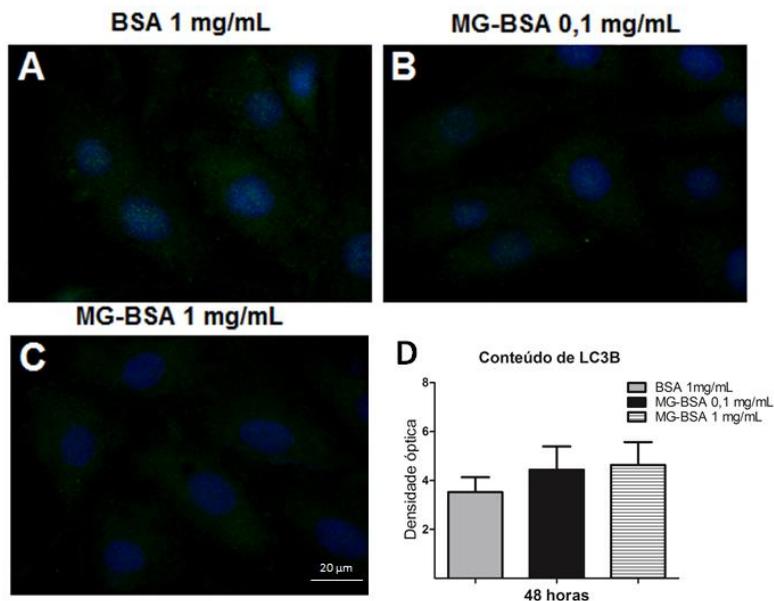
#### 5.2.4. Efeito dos produtos terminais de glicação (AGEs) sobre a autofagia em células C6 de astroglioma de rato

A Figura 18 mostra o efeito de AGEs (MG-BSA) na indução de autofagia em células gliais. Pode ser observado na Figura 18 B-D que o tratamento (48 h) não provocou alteração no número de vacúolos autofágicos em células C6 de astroglioma. Corroborando com este dado, a Figura 19 mostra que o conteúdo da proteína LC3B (relacionada à formação de vacúolos autofágicos) também não foi alterada nestas células neurais.



**Figura 18.** Efeito *in vitro* de produtos terminais de glicação (MG-BSA; 0,1 e 1 mg/mL; 48h) sobre o conteúdo de vacúolos autofágicos em células C6 de astrogloma de rato. As fotografias A-C são representativas da análise

ultraestrutural realizada por microscopia eletrônica de transmissão. A Figura E mostra um vacúolo autofágico na magnificação de 60.000x, contendo em seu interior uma mitocôndria. A barra na Figura E representa 0,2  $\mu\text{m}$ . A Figura F mostra um desenho esquemático da formação de vacúolos autofágicos (adaptado de Kubli e Gustafsson, 2012). A magnificação das fotografias A-C correspondem a 10.000x. As barras nestas imagens representam 2  $\mu\text{m}$ . As barras em F indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3 experimentos independentes) (ANOVA de uma via).



**Figura 19.** Efeito *in vitro* de produtos terminais de glicação (MG-BSA; 0,1 e 1 mg/mL; 48h) sobre o conteúdo da proteína LC3B em células C6 de astroglioma de rato. As fotografias A-C são representativas da análise em microscopia de fluorescência. A barra na imagem C representa 20  $\mu\text{m}$ . A magnificação das fotografias corresponde a 1.000x. Em D, as barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3 experimentos independentes) (ANOVA de uma via).

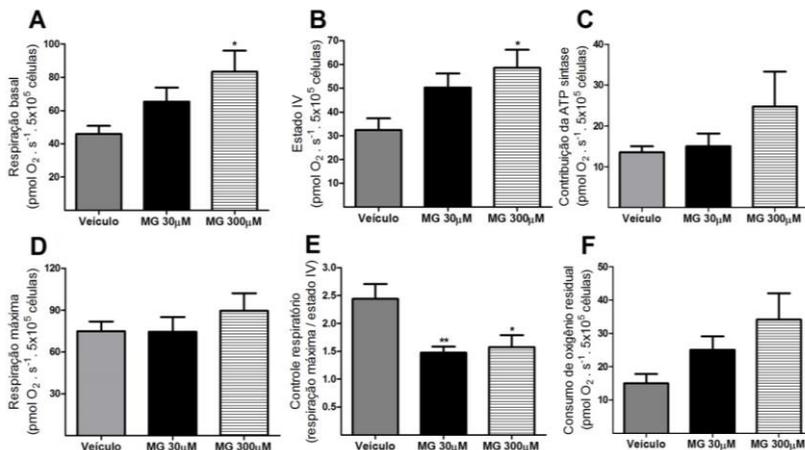
### 5.2.5. Efeito do metilgloxal (MG) sobre a fisiologia mitocondrial em células C6 de astroglioma de rato

A Figura 20 mostra o efeito de concentrações crescentes de MG sobre a respiração mitocondrial em células C6 de astroglioma de rato. A Figura 20A mostra um aumento significativo no consumo de oxigênio durante o estado de respiração basal (respiração basal medida por 15

minutos após a adição de veículo ou 30-300 $\mu$ M de MG) [ $F_{(2,13)} = 3,789$ ;  $P < 0,05$ ]. Ainda, pode ser observado que este efeito é dependente da concentração de MG [ $\beta = 0,61$ ;  $P < 0,05$ ]. De forma similar, A Figura 20B mostra um aumento significativo no consumo de oxigênio no estado IV de respiração mitocondrial (medido após a adição de oligomicina; inibidor do complexo V) [ $F_{(2,13)} = 4,11$ ;  $P < 0,05$ ], sendo este efeito também dependente da concentração do metabólito [ $\beta = 0,60$ ;  $P < 0,05$ ]. A Figura 20C mostra que não houve diferenças significativas na contribuição da ATP sintase ao consumo de oxigênio basal. Apesar destas alterações na respiração mitocondrial induzidas pelo MG, a respiração máxima (estado desacoplado induzido por concentrações crescentes de FCCP) não foi modificada pelo MG (Figura 20D). No entanto, o controle respiratório foi significativamente comprometido na presença de MG (30 e 300  $\mu$ M) [ $F_{(2,13)} = 7,81$ ;  $P < 0,01$ ] (Figura 20E). A Figura 20F mostra que o tratamento com MG não provocou um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, embora apresentem uma relativa dependência da concentração empregada [ $\beta = 0,58$ ,  $P < 0,05$ ].

#### **5.2.6. Efeito de concentrações crescentes de metilglioxal (MG) sobre a respiração basal em células C6 de astroglioma de rato**

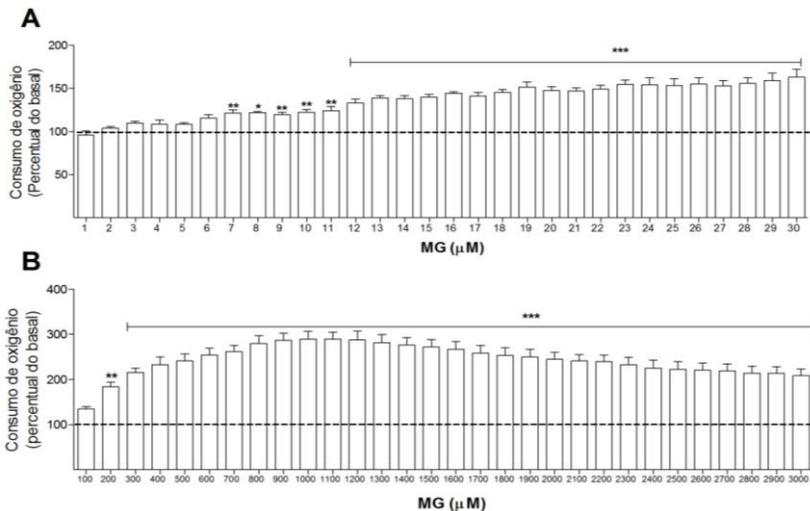
A Figura 21 mostra o efeito positivo do MG em aumentar a respiração basal após uma titulação com concentrações crescentes do composto. Pode ser evidenciado um aumento linear [ $\beta = 0,89$ ;  $P < 0,001$ ] do consumo de oxigênio desde 1 a 30  $\mu$ M de MG, com aumentos significativos a partir de 7  $\mu$ M [ $F_{(30,93)} = 143$ ;  $P < 0,001$ ] (Figura 21A). No entanto, a titulação entre 200 e 3.000  $\mu$ M provocou um aumento significativo na respiração com máximo efeito em concentrações entre 800 – 1.200  $\mu$ M [ $F_{(30,93)} = 464$ ;  $P < 0,001$ ] (Figura 21B).



**Figura 20.** Efeito *in vitro* de metilglioxal (MG; 30 e 300  $\mu$ M) sobre parâmetros de respiração celular em células C6 e astrogloma de rato. As medidas de consumo de oxigênio, respiração basal (A), estado IV de respiração mitocondrial (B), contribuição da ATP sintase ao consumo de oxigênio basal (C), respiração máxima (D), índice de controle respiratório (E) e geração de espécies reativas extramitocondriais (F), foram medidas em respirômetro de alta resolução Oroboros em meio DMEM livre de soro fetal bovino a 37 °C. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 4-7 experimentos independentes) (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).

### 5.2.7. Efeito de concentrações crescentes de metilglioxal (MG) sobre a respiração basal em células C6 de astrogloma de rato

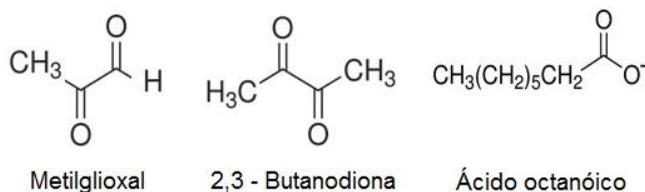
A Figura 21 mostra o efeito positivo do MG em aumentar a respiração basal após uma titulação com concentrações crescentes do composto. Pode ser evidenciado um aumento linear [ $\beta = 0,89$ ;  $P < 0,001$ ] do consumo de oxigênio desde 1 a 30  $\mu$ M de MG, com aumentos significativos a partir de 7  $\mu$ M [ $F_{(30,93)} = 143$ ;  $P < 0,001$ ] (Figura 21A). No entanto, a titulação entre 200 e 3.000  $\mu$ M provocou um aumento significativo na respiração com máximo efeito em concentrações entre 800 – 1.200  $\mu$ M [ $F_{(30,93)} = 464$ ;  $P < 0,001$ ] (Figura 21B).



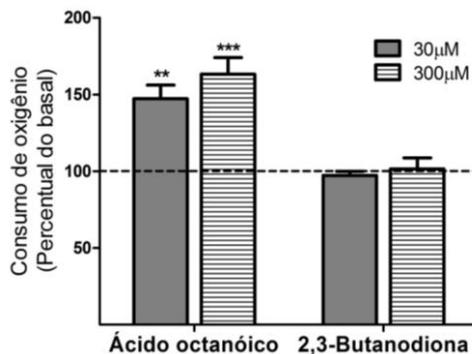
**Figura 21.** Efeito *in vitro* de metilglioxal (MG; 1- 3.000  $\mu\text{M}$ ) sobre a respiração basal em células C6 de astroglioma de rato. As barras indicam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 4$  experimentos independentes). \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; comparado ao consumo de oxigênio em condições livres de MG. As medidas foram realizadas em respirômetro de alta resolução Oroboros em meio DMEM livre de soro fetal bovino a 37 °C. O painel A indica o consumo de oxigênio de adições sucessivas de 1  $\mu\text{M}$  de MG a cada dois minutos. O painel B corresponde a adições sucessivas de 100  $\mu\text{M}$  de MG a cada dois minutos. A primeira medida de consumo de oxigênio foi determinada após 15 minutos adição do MG (ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni).

### 5.2.8. Comparação do efeito do metilglioxal (MG) no aumento do consumo de oxigênio a um desacoplador clássico e a um composto estruturalmente similar ao MG em células C6 de astroglioma de rato

A Figura 23 mostra o efeito no consumo de oxigênio de um desacoplador mitocondrial clássico, ácido octanóico, e da 2,3-butanodiona, composto estruturalmente semelhante ao MG (Figura 22). Pode ser observado na figura que o ácido octanóico aumentou significativamente o consumo basal de oxigênio nas concentrações de 30 e 300  $\mu\text{M}$  [ $F_{(2,9)} = 16,521$ ;  $P < 0,001$ ]. Esses aumentos foram similares àqueles induzidos por concentrações idênticas de MG (Figura 22).



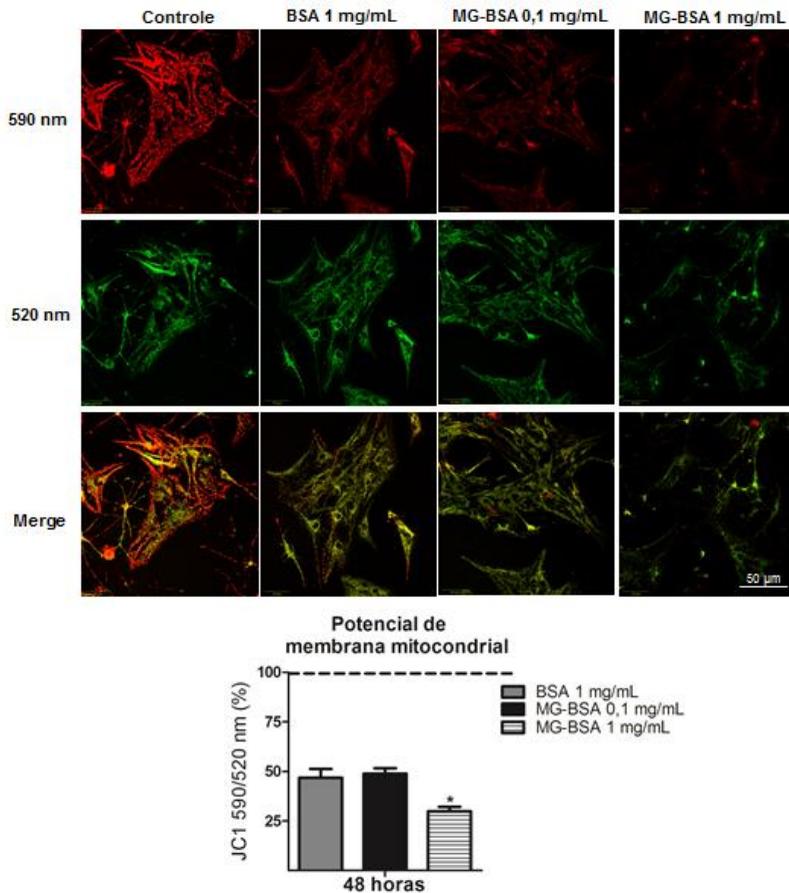
**Figura 22.** Estrutura química dos compostos metilglioxal, 2,3-butanodiona e ácido octanóico.



**Figura 23.** Efeito *in vitro* de ácido octanóico e 2,3-butanodiona (30 e 300 μM) sobre a respiração basal em células C6 de astroglioma de rato. As barras indicam a média ± erro padrão da média (n= 4 experimentos independentes). As medidas foram realizadas em respirômetro de alta resolução Oroboros em meio DMEM livre de soro fetal bovino a 37 °C. \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; comparado ao consumo de oxigênio em condições livres de ácido octanóico ou 2,3-butanodiona (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).

### 5.2.9. Efeito dos produtos terminais de glicação (AGEs) sobre o potencial de membrana mitocondrial em cultura primária de astrócitos corticais

A Figura 24 mostra o efeito de BSA e MG-BSA (0,1 - 1 mg/mL; 48 horas) sobre o potencial de membrana mitocondrial em cultura primária de astrócitos corticais. Pode ser observado na figura que o tratamento com o AGE provocou uma redução significativa neste parâmetro [ $F_{(2,6)} = 10,26$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 24.** Efeito *in vitro* de produtos terminais de glicação (MG-BSA; 0,1 e 1 mg/mL; 48h) sobre o potencial de membrana mitocondrial observado através do uso da sonda JC-1, em cultura primária de astrócitos corticais de ratos Wistar. A barra na imagem representa 50 μm. A magnificação das fotografias corresponde a 400x. As barras no gráfico indicam a média ± erro padrão da média (n= 3 experimentos independentes). \*  $P < 0,05$ ; comparado às células expostas ao BSA 1 mg/mL (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey).

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho doutoral demonstraram que o estado hiperglicêmico crônico, bem como os metabólitos vinculados, MG e AGEs, comprometem a dinâmica e fisiologia mitocondrial das

células do sistema nervoso central, podendo ser estes mecanismos envolvidos na maior predisposição ao desenvolvimento de doenças neurológicas/neurodegenerativas em indivíduos com hiperglicemia persistente.

A hiperglicemia crônica é a principal característica do DM, que é uma síndrome de etiologia múltipla decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos. A hiperglicemia parece ser o gatilho para induzir as alterações metabólicas celulares causadas pela doença (Brownlee, 2005; Nishikawa et al., 2000), os quais culminam no aumento da produção de EROs, levando a uma disfunção mitocondrial. O DM tem sido considerado como um fator de risco para a predisposição para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e de Alzheimer (Hu et al., 2007; Kroner, 2009). A incidência destas patologias neurológicas parece ser maior em indivíduos com DM2 (Craft e Watson, 2004) e ainda, já está descrito na literatura que estes pacientes possuem mais que o dobro de chances para desenvolver doença de Alzheimer que indivíduos não diabéticos (Ott et al., 1996). Por outro lado, aproximadamente 50% dos pacientes afetados pela doença de Parkinson apresentam DM ou tolerância diminuída à glicose (Barbeau et al., 1961; Boyd et al., 1971; Lipman et al., 1974), condição que é exacerbada pelo clássico tratamento farmacológico representado pela L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) (Furman and Wilson, 1979). Ainda, pacientes afetados pelas duas condições, doença de Parkinson e DM, apresentam aceleração na progressão de sintomas motores e cognitivos relacionados com o processo neurodegenerativo (Figlewicz et al., 1996; Schwab, 1960).

A relação entre DM e as doenças neurodegenerativas parece ser a produção exacerbada de EROs e a disfunção mitocondrial, fatores que estão associados tanto com o DM como com as doenças neurodegenerativas (Cheng et al., 2010; Reddy et al., 2009). Neste contexto, células que necessitam de uma alta demanda metabólica e um grande requerimento de energia, como as células neurais, são as mais vulneráveis às alterações que envolvem disfunção mitocondrial. Esta grande demanda energética deve-se ao fato que os neurônios são células altamente diferenciadas que necessitam grandes quantidades de ATP para a correta manutenção dos gradientes iônicos transmembrana, e para os processos de neurotransmissão (Silver e Erecinska, 1998). Dessa forma, a utilização da glicose pelas células do sistema nervoso central é essencial para assegurar a sobrevivência destas, visto que a reserva

energética cerebral em condições de normoglicemia, o glicogênio, é extremamente pequena (3–5  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido) (Oz et al., 2007). Ainda, o cérebro não utiliza ácidos graxos como fonte para a geração de energia, já que não há transporte quantitativamente importante através da barreira hematoencefálica. Ainda, os vasos sanguíneos que formam esta barreira expressam o transportador de glicose GLUT1 (Pardridge et al., 1990) o qual não é responsivo a insulina, apesar de GLUT4 (responsivo a insulina) ser também expresso em muitas regiões cerebrais (Tomlinson e Gardiner, 2008). Desta maneira, o funcionamento adequado do sistema nervoso requer o suprimento contínuo de glicose desde a circulação periférica (Erecinska et al., 1994) e, devido ao fato que os transportadores de glicose das células neurais não dependem de insulina para a captação de glicose, o conteúdo de glicose intracelular é um reflexo das concentrações de glicose sanguínea. No entanto, a persistência de altas concentrações de glicose no interior das células neurais, como observado na hiperglicemia que caracteriza o DM, leva a uma condição definida como neurotoxicidade da glicose (Tomlinson e Gardiner, 2008).

De fato, a persistência de altas concentrações de glicose no interior das células neurais altera o metabolismo celular, causando o aumento da via do poli-ol, das hexosaminas, da ativação da PKC e da formação de AGEs, culminando com a produção de EROs, levando ao estresse oxidativo. O principal local de produção de EROs é a mitocôndria, sendo as proteínas localizadas nesta organela altamente susceptíveis ao dano oxidativo.

Com intuito de melhor entender a participação da disfunção mitocondrial na fisiopatologia do DM e seu envolvimento na predisposição de pacientes com DM ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, células astrogliais foram expostas a AGEs e/ou MG, principais metabólitos formados durante condições hiperglicêmicas, para posterior análise de parâmetros relacionados a respirometria e dinâmica mitocondrial. Os AGEs causaram alterações morfológicas na mitocôndria, aumentando a prevalência de mitocôndrias esféricas e pequenas, indicando um desequilíbrio entre os processos de fusão e fissão mitocondrial. Estas características morfológicas – mitocôndrias esféricas, menores e em maior número – são um indicativo de que o processo de fissão está sendo favorecido (Yoon et al., 2003; Yu et al., 2011), provavelmente devido à translocação de Drp1 do citosol à mitocôndria. Frank e colaboradores (2001) observaram que há um aumento do conteúdo de mitocôndrias fragmentadas concomitante com a redistribuição de Drp1 do citosol para a mitocôndria, caracterizando o

processo de fissão mitocondrial, em cultura celular de epitélio renal quando estimuladas a apoptose com estaurosporina. Esta redistribuição da Drp1 à mitocôndria ocorre devido às modificações na proteína, como a fosforilação no resíduo de serina 616 da proteína pela PKC $\delta$ , ERK1/2 ou pela CDK1 (Qi et al., 2011; Taguchi et al., 2007), ou pela fosforilação da serina 637 pela CaMKI $\alpha$  ou ROCK1 (Han et al., 2008; Wang et al., 2012a). Ainda, modificações como a sumoilação e a nitrosilação também desencadeiam a migração da Drp1 à mitocôndria (Braschi et al., 2009; Cho et al., 2009).

Estas alterações na morfologia mitocondrial relacionadas ao aumento da fragmentação mitocondrial já foram observadas tanto em modelos animais de hiperglicemia crônica como em pacientes com DM. Por exemplo, em músculo estriado esquelético, células endoteliais e células  $\beta$  pancreáticas de pacientes com DM2, foi observado que as mitocôndrias são menores e apresentam morfologia alterada, apresentando vacúolos, além de possuírem um conteúdo proteico reduzido de Mfn2 e OPA1 e maior expressão de Fis1 (Anello et al., 2005; Bach et al., 2003, 2005; Kelley et al., 2002; Shenouda et al., 2011). Estas alterações na dinâmica mitocondrial foram observadas também em modelos animais de DM2 (Bach et al., 2003; Bindokas et al., 2003). Neste caso, o aumento na fragmentação mitocondrial correlacionou com um decréscimo na fusão, devido a uma redução no conteúdo proteico e do mRNA de Mfn2 (Bach et al., 2005; Molina et al., 2009). Ainda, tem sido demonstrado que altas concentrações de glicose induzem a fissão mitocondrial em linhagem de células do fígado, do coração, do endotélio, das ilhotas pancreáticas e em cultura primária de neurônios e de células do sistema cardiovascular, parecendo ser este o gatilho para a desregulação da dinâmica mitocondrial no DM2 (Leininger et al., 2006; Men et al., 2009; Paltauf-Doburzynska et al., 2004; Yu et al., 2006; Yu et al., 2008). Apesar de todos estes estudos demonstrando alterações na dinâmica mitocondrial durante condições de hiperglicemia, este é o primeiro estudo que demonstra que em células do sistema nervoso central quem desencadearia estas alterações na dinâmica mitocondrial seriam os metabólitos formados durante estas condições.

Alguns autores sugerem que o elemento chave na alteração da dinâmica mitocondrial poderia ser a maior e persistente produção EROs (Shenouda et al., 2011). As mitocôndrias podem lidar com o estresse oxidativo e nitrosativo realizando a fusão e formando uma rede mitocondrial, o que induz à morfologia tubular. No entanto, se o estresse

e dano mitocondrial é elevado, as mitocôndrias serão fissionadas da rede mitocondrial, perderão a capacidade de gerar energia, e poderão induzir morte celular (Alavi e Fuhrmann, 2013; Olichon et al., 2003). No que se refere à produção de EROs no DM, esta pode ter sido induzida pela interação do MG ou dos AGEs formados durante a hiperglicemia com as proteínas da cadeia transportadora de elétrons, alterando sua atividade e desta forma aumentando a produção de EROs. Em concordância, Makino e colaboradores (2010) demonstraram que o tratamento com antioxidantes previne a indução de fissão mitocondrial em endotélio de camundongos hiperglicêmicos, sugerindo que a produção de EROs seria um possível gatilho para induzir fissão nessas condições.

Considerando a relação existente entre produção de EROs, a indução de fissão mitocondrial e alterações na respiração mitocondrial, como por exemplo, a indução do processo de fissão tem sido associada à redução na capacidade respiratória mitocondrial (Koopman et al., 2005), foi observado que o MG estaria atuando como um ionóforo (desacoplador da respiração mitocondrial), por causar uma dissipação parcial do  $\Delta\psi_m$ . Os desacopladores dissipam o  $\Delta\psi_m$  (Nelson e Cox, 2004) e desta forma a transferência de elétrons na cadeia respiratória é estimulada para restabelecer este potencial, tendo como consequência o aumento do consumo de oxigênio. Este efeito do MG pode ser observado já a partir de concentrações tão baixas quanto 7  $\mu\text{M}$  do metabólito. Considerando que a concentração de MG em plasma de indivíduos normoglicêmicos é de aproximadamente 3,3  $\mu\text{M}$  (Wang et al., 2007), e que em indivíduos hiperglicêmicos esta pode chegar até 400  $\mu\text{M}$  de MG (Lapolla et al., 2005), um pequeno aumento nas concentrações do metabólito já alteraria a funcionalidade da mitocôndria, o que poderia levar a um aumento da produção de EROs e consequente disfunção mitocondrial. Ainda, a hiperglicemia com a consequente formação de MG e AGEs, embora transiente, pode provocar alterações de longo prazo que envolvem alterações epigenéticas, como a ativação do promotor do gene do fator de transcrição pró-oxidante e pró-inflamatório, NF- $\kappa\text{B}$  (El-Osta et al., 2008), perpetuando o estado de estresse oxidativo. Desta forma, mesmo com o estrito controle glicêmico estas alterações não são revertidas, como previamente observados pelo nosso grupo em tecidos periféricos de animais com hiperglicemia crônica (Remor et al., 2011).

Além do MG, os AGEs também causaram a alteração do  $\Delta\psi_m$ ; desta forma, pode-se inferir que essa dissipação do potencial ocasionado pelo MG e/ou AGEs pode levar as mitocôndrias a fragmentar da rede

mitocondrial, com o intuito de eliminar mitocôndrias disfuncionais por posterior autofagia (Twig et al., 2008a). No entanto, o processo de autofagia não foi alterado, fazendo com que as mitocôndrias fissionadas da rede mitocondrial permaneçam na célula. Uma diminuição no processo autofágico também foi observada em músculo estriado cardíaco e em podócitos de animais com hiperglicemia induzida pela administração de STZ (Fang et al., 2013; Xu et al., 2013). Desta forma, a hiperglicemia e os AGEs formados durante estas condições poderiam estar causando uma falha na remoção de mitocôndrias disfuncionais, fazendo com que estas sejam acumuladas no interior da célula, aumentando a produção de EROs e levando a célula à morte (Christophe e Nicolas, 2006; Twig e Shirihai, 2011). Isto poderia ocorrer, por exemplo, se a expressão e/ ou conteúdo da proteína PINK1 fosse diminuída e desta maneira estas organelas não seriam degradadas, como foi observado em biópsia de músculo estriado esquelético de pacientes com DM2 (Scheele et al., 2007). Esta inibição da autofagia poderia estar contribuindo com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, pois contribui para a formação de agregados proteicos insolúveis, como observado na doença de Alzheimer, já que estes agregados poderiam ser removidos por autofagia (Talaie et al., 2014).

Estas alterações relacionadas à dinâmica mitocondrial além de serem observadas no DM, tem também sido observadas em doenças neurodegenerativas, como nas doenças de Parkinson e de Alzheimer, apesar de que os mecanismos destas modificações ainda não encontram-se totalmente elucidados. Por exemplo, em cultura neuronal onde foi induzido um aumento da expressão de  $\alpha$ -sinucleína (principal componente dos corpos de Lewy, característicos da doença de Parkinson), observou-se alterações na dinâmica mitocondrial relacionadas ao aumento da fragmentação mitocondrial, sendo sugerido pelos autores que a  $\alpha$ -sinucleína interagiria com a membrana mitocondrial interna, inibindo a fusão da organela (Kamp et al., 2010). Ainda, uma forma de doença de Parkinson familiar pode ser causada pela perda ou diminuição da expressão de parkina e PINK1 que marcam as mitocôndrias para a degradação (Ahlskog, 2009), desta forma, organelas disfuncionais permanecem na célula, aumentando a produção de EROs (Christophe e Nicolas, 2006; Twig e Shirihai, 2011). Outro exemplo de disfunção na dinâmica mitocondrial em doenças neurodegenerativas ocorre na doença de Alzheimer. A literatura recente sobre o tema descreve um aumento na atividade ou na expressão de Drp1 e Fis1 e um decréscimo em Mfn1 e 2 e OPA1, causando o

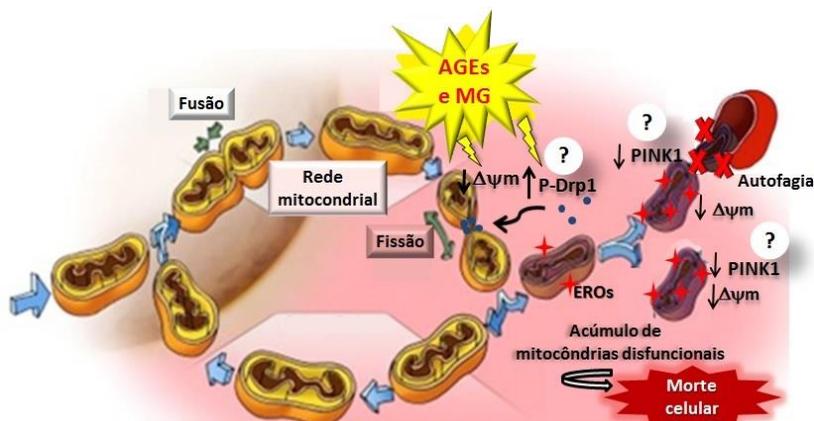
processo de fissão mitocondrial em tecido cerebral *post mortem* de pacientes com a doença, em cérebro de modelos animais transgênicos para o peptídeo  $\beta$ -amilóide e em cultura de células neuronais expostos ao peptídeo  $\beta$ -amilóide (Bossy et al., 2010; Cho et al., 2009; Manczak et al., 2011; Manczak e Reddy, 2012). No entanto, há também relatos sobre a diminuição de Drp1, Mfn1 e 2 e OPA1 e aumento de Fis1 em neurônios de pacientes com a doença de Alzheimer (tecido *post mortem*) e em cultura de célula neuronais com maior expressão da proteína precursora amilóide (Wang et al., 2008; 2009). O processo autofágico também encontra-se prejudicado nesta patologia, fazendo com que tanto organelas disfuncionais quanto os agregados proteicos descritos na doença permaneçam na célula. Desta forma, além da disfunção mitocondrial e aumento da produção de EROs, a alteração da dinâmica mitocondrial causada por AGEs e/ou MG no sistema nervoso central encontrada neste trabalho poderia ser um dos fatores relacionados à predisposição de pacientes com DM ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Por outro lado, a insulina, utilizada para o controle glicêmico no DM, pode agir também como um fator trófico sobre a função mitocondrial, podendo prevenir estes efeitos tóxicos da hiperglicemia crônica sobre a dinâmica e fisiologia mitocondrial, como observado em resultados prévios do nosso grupo de pesquisa que demonstram que a insulina causou um aumento na atividade dos complexos da cadeia respiratória de tecidos periféricos (Remor et al., 2011). Ainda, no presente trabalho observamos o papel da insulina como um fator trófico sobre a mitocôndria devido ao aumento da expressão de Tfam. Esta propriedade da insulina estaria relacionada provavelmente com a via de sinalização da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)-AKT, a qual resulta na fosforilação e ativação de NRF1, aumentando a transcrição de Tfam (Bijur e Jope, 2003; Yang et al., 2012). O NRF1 também ativa a transcrição de genes nucleares que codificam para proteínas da cadeia respiratória, como a COX (Dhar et al., 2008) e por pelo menos uma subunidade dos complexos I, II, III e V (Chau et al., 1992; Evans e Scarpulla, 1989; Kelly e Scarpulla, 2004). Ainda, foi observado que mitocôndrias de córtex cerebral de animais do grupo STZ+INS são maiores, pois ativação da AKT causa a ativação de mTOR e de NF- $\kappa$ B, o que aumenta a expressão de OPA1, aumentando a fusão das mitocôndrias, como descrito por Parra e colaboradores (2013). Desta forma, além da via desencadeada pela insulina aumentar a expressão de Tfam, ela também promove a fusão das mitocôndrias.

No entanto, o excesso de insulina no cérebro de animais STZ que receberam a administração exógena de insulina poderia inibir a ativação de PCG-1 $\alpha$ , e como consequência reduzir a expressão de genes controlados por este ativador, incluindo o NDUFA6. Estes resultados estariam de acordo com Mootha e colaboradores (2003) (Mootha et al., 2003) que demonstraram este fenômeno em músculo esquelético de pacientes acometidos por DM. Neste contexto, a inibição da expressão deste polipeptídio do complexo I levaria ao aumento na expressão do Tfam como um mecanismo compensatório.

## 5. CONCLUSÕES

Com os resultados observados, foi possível verificar que a administração de insulina pode prevenir os efeitos tóxicos da hiperglicemia crônica sobre a mitocôndria, pois induz a expressão de Tfam e também a fusão mitocondrial. Ainda, podemos sugerir que a dissipação do  $\Delta\psi_m$  mitocondrial provocado pelo MG e/ou AGEs gera um estado de déficit energético, que atua como estímulo sensível para induzir a fissão mitocondrial. Devido ao déficit energético, quando fissionadas as mitocôndrias não reestabelecem seu potencial, e o processo de autofagia que poderia ser promovido para a remoção de mitocôndrias disfuncionais não é ativado, fazendo com que ocorra a perpetuação de um estado de estresse oxidativo crônico que pode levar as células neurais a morte celular (Figura 25).



**Figura 25.** Efeitos de MG e AGEs sobre a dinâmica mitocondrial em astrócitos. AGEs e MG causam uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, o

que leva à fragmentação mitocondrial. Esta fragmentação pode ter ocorrido devido à fosforilação de Drp1 e sua translocação para a mitocôndria, pois o conteúdo desta proteína não foi alterada pelo tratamento com AGEs. Estas mitocôndrias que foram fragmentadas da rede mitocondrial não recuperam o seu potencial e se tornam disfuncionais, produzindo EROs. Estas organelas não são levadas à autofagia, pois não foi observado um aumento neste processo nas células expostas a AGEs. Desta forma, estas mitocôndrias disfuncionais acumulam-se na célula, o que pode resultar em morte celular.

## 6. PERSPECTIVAS

- Observar o conteúdo de p53, PINK1 e a fosforilação de Drp1 em células C6 expostas a AGEs e em córtex cerebral e em bulbo olfatório de animais com hiperglicemia induzida pela STZ e/ou tratados com insulina, com o objetivo de melhor elucidar as alterações encontradas nos processos de dinâmica mitocondrial no presente trabalho;
- Isolar plaquetas de pacientes com DM1 com o objetivo de analisar se as alterações na morfologia e morfometria da mitocôndria encontradas no presente estudo também são observadas;
- Isolar linfócitos de pacientes com DM1 para mensuração da fisiologia mitocondrial, com o objetivo de verificar se nestas células há alterações semelhantes às encontradas neste trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADA (2012). American Diabetes Association. *Diabetes Care* 35 Suppl 1:S64-71
- Ahlskog, J.E. (2009). Parkin and PINK1 parkinsonism may represent nigral mitochondrial cytopathies distinct from Lewy body Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 15, 721-727.
- Ahmed, N., and Thornalley, P.J. (2002). Chromatographic assay of glycation adducts in human serum albumin glycosylated in vitro by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and intrinsic fluorescence. *Biochem J* 364, 15-24.
- Alavi, M.V., and Fuhrmann, N. (2013). Dominant optic atrophy, OPA1, and mitochondrial quality control: understanding mitochondrial network dynamics. *Molecular neurodegeneration* 8, 32.

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2010). *Biologia Molecular da célula*, 5 edn (Rio de Janeiro: Artmed).
- Alcolea, M.P., Colom, B., Llado, I., Garcia-Palmer, F.J., and Gianotti, M. (2007). Mitochondrial differentiation and oxidative phosphorylation system capacity in rat embryo during placentation period. *Reproduction* 134, 147-154.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., *et al.* (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26, 211-215.
- Amati-Bonneau, P., Valentino, M.L., Reynier, P., Gallardo, M.E., Bornstein, B., Boissiere, A., Campos, Y., Rivera, H., de la Aleja, J.G., Carroccia, R., *et al.* (2008). OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain : a journal of neurology* 131, 338-351.
- Anello, M., Lupi, R., Spampinato, D., Piro, S., Masini, M., Boggi, U., Del Prato, S., Rabuazzo, A.M., Purrello, F., and Marchetti, P. (2005). Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 48, 282-289.
- Atkinson, M.A., and Eisenbarth, G.S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358, 221-229.
- Babcock, G.T., and Wikstrom, M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356, 301-309.
- Bach, D., Naon, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Rieusset, J., Laville, M., Guillet, C., Boirie, Y., Wallberg-Henriksson, H., *et al.* (2005). Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 54, 2685-2693.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., *et al.* (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278, 17190-17197.

- Barbeau, A., Giguere, R., and Hardy, J. (1961). [Clinical experience with tolbutamide in Parkinson's disease]. *L'union medicale du Canada* 90, 147-151.
- Barrientos, A., Barros, M.H., Valnot, I., Rotig, A., Rustin, P., and Tzagoloff, A. (2002). Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286, 53-63.
- Bastias, A.M., Toro, C.L., and Olmos, C.P. (2006). [Intensified insulin therapy plus antineuritic medication is more effective than antineuritics alone in painful diabetic neuropathy]. *Revista medica de Chile* 134, 1507-1515.
- Baynes, J.W., and Dominiczak, M.H. (2007). *Bioquímica Médica* (Rio de Janeiro: Mosby).
- Baynes, J.W., and Thorpe, S.R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48, 1-9.
- Beisswenger, B.G., Delucia, E.M., Lapoint, N., Sanford, R.J., and Beisswenger, P.J. (2005). Ketosis leads to increased methylglyoxal production on the Atkins diet. *Ann N Y Acad Sci* 1043, 201-210.
- Benard, G., and Karbowski, M. (2009). Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol* 20, 365-374.
- Bereiter-Hahn, J. (1990). Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol* 122, 1-63.
- Bereiter-Hahn, J., and Voth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27, 198-219.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2007). *Biochemistry* (New York: W.H. Freeman and company).
- Bierhaus, A., Illmer, T., Kasper, M., Luther, T., Quehenberger, P., Tritschler, H., Wahl, P., Ziegler, R., Muller, M., and Nawroth, P.P. (1997). Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96, 2262-2271.
- Biessels, G.J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., and Scheltens, P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet neurology* 5, 64-74.
- Bijur, G.N., and Jope, R.S. (2003). Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 87, 1427-1435.

- Bindokas, V.P., Kuznetsov, A., Sreenan, S., Polonsky, K.S., Roe, M.W., and Philipson, L.H. (2003). Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 278, 9796-9801.
- Bjerrum, O.J., and Heegaard, N.H.H. (1988). *CRC handbook of immunoblotting of proteins*. CRC Press 1.
- Bossy, B., Petrilli, A., Klinglmayr, E., Chen, J., Lutz-Meindl, U., Knott, A.B., Masliah, E., Schwarzenbacher, R., and Bossy-Wetzel, E. (2010). S-Nitrosylation of DRP1 does not affect enzymatic activity and is not specific to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 20 *Suppl* 2, S513-526.
- Boyd, A.E., 3rd, Lebovitz, H.E., and Feldman, J.M. (1971). Endocrine function and glucose metabolism in patients with Parkinson's disease and their alternation by L-Dopa. *J Clin Endocrinol Metab* 33, 829-837.
- Braschi, E., Zunino, R., and McBride, H.M. (2009). MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep* 10, 748-754.
- Brownlee, M. (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46, 223-234.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
- Capaldi, R.A. (1990). Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 59, 569-596.
- Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends in biochemical sciences* 29, 18-24.
- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de Leon, A., Robinson, K.M., Mason, R.P., Beckman, J.S., Barbeito, L., *et al.* (2008). Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci* 28, 4115-4122.
- Ceriello, A., Ihnat, M.A., and Thorpe, J.E. (2009). Clinical review 2: The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J Clin Endocrinol Metab* 94, 410-415.

- Chan, N.C., Salazar, A.M., Pham, A.H., Sweredoski, M.J., Kolawa, N.J., Graham, R.L., Hess, S., and Chan, D.C. (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. *Hum Mol Genet* 20, 1726-1737.
- Chang, C.R., and Blackstone, C. (2010). Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci* 1201, 34-39.
- Chang, T., and Wu, L. (2006). Methylglyoxal, oxidative stress, and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 1229-1238.
- Chaplen, F.W., Fahl, W.E., and Cameron, D.C. (1998). Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5533-5538.
- Chau, C.M., Evans, M.J., and Scarpulla, R.C. (1992). Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *J Biol Chem* 267, 6999-7006.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18, R169-176.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141, 280-289.
- Chen, K.H., Guo, X., Ma, D., Guo, Y., Li, Q., Yang, D., Li, P., Qiu, X., Wen, S., Xiao, R.P., *et al.* (2004). Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nature cell biology* 6, 872-883.
- Chen, Y., and Dorn, G.W., 2nd (2013). PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 340, 471-475.
- Chen, Y.Q., Su, M., Walia, R.R., Hao, Q., Covington, J.W., and Vaughan, D.E. (1998). Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273, 8225-8231.
- Cheng, H.C., Ulane, C.M., and Burke, R.E. (2010). Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol* 67, 715-725.
- Chinnery, P.F., and Schon, E.A. (2003). Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 1188-1199.
- Cho, D.H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-

- amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* *324*, 102-105.
- Christophe, M., and Nicolas, S. (2006). Mitochondria: a target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia-reperfusion. *Curr Pharm Des* *12*, 739-757.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 15927-15932.
- Combettes-Souverain, M., and Issad, T. (1998). Molecular basis of insulin action. *Diabetes & metabolism* *24*, 477-489.
- Cooper, C.E., and Brown, G.C. (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr* *40*, 533-539.
- Craft, S., and Watson, G.S. (2004). Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet neurology* *3*, 169-178.
- Craven, P.A., Davidson, C.M., and DeRubertis, F.R. (1990). Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes* *39*, 667-674.
- Cullum, N.A., Mahon, J., Stringer, K., and McLean, W.G. (1991). Glycation of rat sciatic nerve tubulin in experimental diabetes mellitus. *Diabetologia* *34*, 387-389.
- Dalfo, E., Portero-Otin, M., Ayala, V., Martinez, A., Pamplona, R., and Ferrer, I. (2005). Evidence of oxidative stress in the neocortex in incidental Lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol* *64*, 816-830.
- de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* *456*, 605-610.
- De Paul, A.L., Pons, P., Aoki, A., and Torres, A.I. (1997). Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes. *Acta histochemica* *99*, 277-289.
- Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P., and Hamel, C.P. (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* *109*, 584-591.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C.,

- Perret, E., *et al.* (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26, 207-210.
- Derubertis, F.R., and Craven, P.A. (1994). Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 43, 1-8.
- Desai, K., and Wu, L. (2007). Methylglyoxal and advanced glycation endproducts: new therapeutic horizons? *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2, 89-99.
- Dhar, S.S., Ongwijitwat, S., and Wong-Riley, M.T. (2008). Nuclear respiratory factor 1 regulates all ten nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase in neurons. *J Biol Chem* 283, 3120-3129.
- Di Donato, S. (2000). Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 23, 247-263.
- dos Santos, A.Q., Nardin, P., Funchal, C., L.M., d.A., Jacques-Silva, M.C., Wofchuk, S.T., Gonçalves, C.A., and Gottfried, C. (2006). Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys* 453, 161-167.
- Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., and Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12222-12226.
- El-Osta, A., Brasacchio, D., Yao, D., Poci, A., Jones, P.L., Roeder, R.G., Cooper, M.E., and Brownlee, M. (2008). Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med* 205, 2409-2417.
- Elachouri, G., Vidoni, S., Zanna, C., Pattyn, A., Boukhaddaoui, H., Gaget, K., Yu-Wai-Man, P., Gasparre, G., Sarzi, E., Delettre, C., *et al.* (2011). OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome research* 21, 12-20.
- Erecinska, M., Nelson, D., Yudkoff, M., and Silver, I.A. (1994). Energetics of the nerve terminal in relation to central nervous system function. *Biochem Soc Trans* 22, 959-965.
- Evans, M.J., and Scarpulla, R.C. (1989). Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter.

- Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem* 264, 14361-14368.
- Evans, M.J., and Scarpulla, R.C. (1990). NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* 4, 1023-1034.
- Fang, L., Zhou, Y., Cao, H., Wen, P., Jiang, L., He, W., Dai, C., and Yang, J. (2013). Autophagy attenuates diabetic glomerular damage through protection of hyperglycemia-induced podocyte injury. *PLoS One* 8, e60546.
- Feener, E.P., Xia, P., Inoguchi, T., Shiba, T., Kunisaki, M., and King, G.L. (1996). Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor expression. *Contributions to nephrology* 118, 180-187.
- Figlewicz, D.P., Brot, M.D., McCall, A.L., and Szot, P. (1996). Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res* 736, 54-60.
- Fisher, R.P., and Clayton, D.A. (1985). A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J Biol Chem* 260, 11330-11338.
- Fisher, R.P., and Clayton, D.A. (1988). Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* 8, 3496-3509.
- Folmer, V., Soares, J.C., and Rocha, J.B. (2002). Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34, 1279-1285.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1, 515-525.
- Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* 25, 319-324.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., *et al.* (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126, 177-189.

- Furman, B.L., and Wilson, G.A. (1979). The effects of levodopa on plasma glucose in two strains of rat. *Eur J Pharmacol* 55, 241-246.
- Gabriely, I., Yang, X.M., Cases, J.A., Ma, X.H., Rossetti, L., and Barzilai, N. (2002). Hyperglycemia induces PAI-1 gene expression in adipose tissue by activation of the hexosamine biosynthetic pathway. *Atherosclerosis* 160, 115-122.
- Ganz, M.B., and Seftel, A. (2000). Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E146-152.
- Geraldes, P., and King, G.L. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circulation research* 106, 1319-1331.
- Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research* 107, 1058-1070.
- Gnaiger, E. (2001). Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol* 128, 277-297.
- Gonzalez, F.J. (1988). The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacological reviews* 40, 243-288.
- Gonzalez, R.G., Miglior, S., Von Saltza, I., Buckley, L., Neuringer, L.J., and Cheng, H.M. (1988). <sup>31</sup>P NMR studies of the diabetic lens. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 6, 435-444.
- Gopalakrishnan, L., and Scarpulla, R.C. (1994). Differential regulation of respiratory chain subunits by a CREB-dependent signal transduction pathway. Role of cyclic AMP in cytochrome c and COXIV gene expression. *J Biol Chem* 269, 105-113.
- Grimshaw, C.E. (1992). Aldose reductase: model for a new paradigm of enzymic perfection in detoxification catalysts. *Biochemistry* 31, 10139-10145.
- Griparic, L., van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J., and van der Blik, A.M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* 279, 18792-18798.
- Gugneja, S., and Scarpulla, R.C. (1997). Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J Biol Chem* 272, 18732-18739.

- Haghighat, N., and McCandless, D.W. (1997). Effect of ammonium chloride on energy metabolism of astrocytes and C6-glioma cells in vitro. *Metab Brain Dis* 12, 287-298.
- Haghighat, N., McCandless, D.W., and Geraminegad, P. (2000). Responses in primary astrocytes and C6-glioma cells to ammonium chloride and dibutyryl cyclic-AMP. *Neurochem Res* 25, 277-284.
- Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656-667.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (2007). *Free radicals in biology and medicine* (New York: Oxford University Press).
- Han, X.J., Lu, Y.F., Li, S.A., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A.C., Takei, K., Matsui, H., and Matsushita, M. (2008). CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 182, 573-585.
- Han, Y., Randell, E., Vasdev, S., Gill, V., Gadag, V., Newhook, L.A., Grant, M., and Hagerty, D. (2007). Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Mol Cell Biochem* 305, 123-131.
- Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P.T., and Spiegelman, B.M. (2003). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7111-7116.
- Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* 27, 728-735.
- Hardie, D.G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117, 5479-5487.
- Head, B., Griparic, L., Amiri, M., Gandre-Babbe, S., and van der Blik, A.M. (2009). Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol* 187, 959-966.
- Hempel, A., Maasch, C., Heintze, U., Lindschau, C., Dietz, R., Luft, F.C., and Haller, H. (1997). High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circulation research* 81, 363-371.

- Hernandez-Fonseca, J.P., Rincon, J., Pedreanez, A., Viera, N., Arcaya, J.L., Carrizo, E., and Mosquera, J. (2009). Structural and ultrastructural analysis of cerebral cortex, cerebellum, and hypothalamus from diabetic rats. *Exp Diabetes Res* 2009, 329632.
- Hock, M.B., and Kralli, A. (2009). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annual review of physiology* 71, 177-203.
- Hood, D.A. (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90, 1137-1157.
- Hu, G., Jousilahti, P., Bidel, S., Antikainen, R., and Tuomilehto, J. (2007). Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care* 30, 842-847.
- Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E.L., Stewart, J.D., He, L., Schaefer, A.M., Griffiths, P.G., Ahlqvist, K., Suomalainen, A., Reynier, P., *et al.* (2008). Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain : a journal of neurology* 131, 329-337.
- Hunt, J.V., Dean, R.T., and Wolff, S.P. (1988). Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256, 205-212.
- Ihnat, M.A., Thorpe, J.E., and Ceriello, A. (2006). Hypothesis: the "metabolic memory", the new challenge of diabetes. *Diabetic Med* 24, 582-586.
- Ingerman, E., and Nunnari, J. (2005). A continuous, regenerative coupled GTPase assay for dynamin-related proteins. *Methods Enzymol* 404, 611-619.
- Inoguchi, T., Battan, R., Handler, E., Sportsman, J.R., Heath, W., and King, G.L. (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11059-11063.
- Ishihara, N., Otera, H., Oka, T., and Mihara, K. (2013). Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antioxid Redox Signal* 19, 389-399.

- Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., and Sesaki, H. (2013). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in cell biology* *23*, 64-71.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* *13*, 76-86.
- Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 12017-12022.
- Jakus, V., and Rietbrock, N. (2004). Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* *53*, 131-142.
- Jheng, H.F., Tsai, P.J., Guo, S.M., Kuo, L.H., Chang, C.S., Su, I.J., Chang, C.R., and Tsai, Y.S. (2011). Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* *32*, 309-319.
- Jiang, L., Saetre, P., Radomska, K.J., Jazin, E., and Lindholm Carlstrom, E. (2006). QKI-7 regulates expression of interferon-related genes in human astrocyte glioma cells. *PLoS One* *5*.
- Jin, S.M., and Youle, R.J. (2012). PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *J Cell Sci* *125*, 795-799.
- Kamp, F., Exner, N., Lutz, A.K., Wender, N., Hegermann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K., *et al.* (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *Embo J* *29*, 3571-3589.
- Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V., and Ritov, V.B. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* *51*, 2944-2950.
- Kelly, D.P., and Scarpulla, R.C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* *18*, 357-368.
- Kennedy, E.P., and Lehninger, A.L. (1950). The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* *185*, 275-285.
- Kennedy, E.P., and Lehninger, A.L. (1951). Activation of fatty acid oxidation by dihydrodiphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* *190*, 361-368.

- Kolm-Litty, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R., and Schleicher, E.D. (1998). High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* *101*, 160-169.
- Koop, D.R., and Casazza, J.P. (1985). Identification of ethanol-inducible P-450 isozyme 3a as the acetone and acetol monooxygenase of rabbit microsomes. *J Biol Chem* *260*, 13607-13612.
- Koopman, W.J., Visch, H.J., Verkaart, S., van den Heuvel, L.W., Smeitink, J.A., and Willems, P.H. (2005). Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol* *289*, C881-890.
- Koopman, W.J.H., Distelmaier, F., Smeitink, J.A.M., and Willems, P.H.G.M. (2013). OXPHOS mutations and neurodegeneration. *The EMBO Journal* *32*, 9-29.
- Kroner, Z. (2009). The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* *14*, 373-379.
- Kubli, D.A., and Gustafsson, A.B. (2012). Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circulation research* *111*, 1208-1221.
- Kuboki, K., Jiang, Z.Y., Takahara, N., Ha, S.W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E.P., Herbert, T.P., Rhodes, C.J., and King, G.L. (2000). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* *101*, 676-681.
- Lapolla, A., Traldi, P., and Fedele, D. (2005). Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clinical biochemistry* *38*, 103-115.
- Latini, A., Bem, A.F., Raisman-Vozari, R., and Tasca, C. (2011). Biochemical Mechanisms of Neurodegeneration in Parkinson's Disease: Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Glutamatergic Excitotoxicity. In *Frontiers in Parkinson's Disease* (New York, USA: Nova Science Publishers, Inc).
- Lazarou, M., Jin, S.M., Kane, L.A., and Youle, R.J. (2012). Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell* *22*, 320-333.
- Lehman, J.J., Barger, P.M., Kovacs, A., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., and Kelly, D.P. (2000). Peroxisome proliferator-activated

- receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 106, 847-856.
- Lehninger, A.L., and Smith, S.W. (1949). Efficiency of phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. *J Biol Chem* 181, 415-429.
- Leininger, G.M., Backus, C., Sastry, A.M., Yi, Y.B., Wang, C.W., and Feldman, E.L. (2006). Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol Dis* 23, 11-22.
- Li, L., and Holscher, C. (2007). Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. *Brain research reviews* 56, 384-402.
- Lipman, I.J., Boykin, M.E., and Flora, R.E. (1974). Glucose intolerance in Parkinson's disease. *Journal of chronic diseases* 27, 573-579.
- Liu, Y., Zhang, X.J., Yang, C.H., and Fan, H.G. (2009). Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF-kappaB expression. *Brain Res* 1268, 174-180.
- Lo, T.W., Westwood, M.E., McLellan, A.C., Selwood, T., and Thornalley, P.J. (1994). Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 269, 32299-32305.
- Lopes, M.W., Soares, F.M., de Mello, N., Nunes, J.C., de Cordova, F.M., Walz, R., and Leal, R.B. (2012). Time-Dependent Modulation of Mitogen Activated Protein Kinases and AKT in Rat Hippocampus and Cortex in the Pilocarpine Model of Epilepsy. *Neurochem Res* 37, 1868-1878.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu, J., Randell, E., Han, Y., Adeli, K., Krahn, J., and Meng, Q.H. (2011). Increased plasma methylglyoxal level, inflammation, and vascular endothelial dysfunction in diabetic nephropathy. *Clinical biochemistry* 44, 307-311.
- Lyles, G.A., and Chalmers, J. (1992). The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochem Pharmacol* 43, 1409-1414.
- Makino, A., Scott, B.T., and Dillmann, W.H. (2010). Mitochondrial fragmentation and superoxide anion production in coronary

- endothelial cells from a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 53, 1783-1794.
- Malecki, M.T., and Klupa, T. (2005). Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. *Pharmacol Rep* 57 *Suppl*, 20-32.
- Manczak, M., Calkins, M.J., and Reddy, P.H. (2011). Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20, 2495-2509.
- Manczak, M., and Reddy, P.H. (2012). Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum Mol Genet* 21, 2538-2547.
- Marchetti, P., Dotta, F., Lauro, D., and Purrello, F. (2008). An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regulatory peptides* 146, 4-11.
- Marshall, S., and Monzon, R. (1989). Amino acid regulation of insulin action in isolated adipocytes. Selective ability of amino acids to enhance both insulin sensitivity and maximal insulin responsiveness of the protein synthesis system. *J Biol Chem* 264, 2037-2042.
- Matos, F.J. de. Efeito do estrito controle da glicemia sobre parâmetros neuroquímicos em animais hiperglicêmicos. 2013. 78 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2013.
- Mears, J.A., Lackner, L.L., Fang, S., Ingerman, E., Nunnari, J., and Hinshaw, J.E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nature structural & molecular biology* 18, 20-26.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383-395.
- Men, X., Wang, H., Li, M., Cai, H., Xu, S., Zhang, W., Xu, Y., Ye, L., Yang, W., Wollheim, C.B., *et al.* (2009). Dynamin-related protein 1 mediates high glucose induced pancreatic beta cell apoptosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 879-890.

- Menzies, K.J., and Hood, D.A. (2012). The role of SirT1 in muscle mitochondrial turnover. *Mitochondrion* 12, 5-13.
- Messier, C., and Gagnon, M. (1996). Glucose regulation and cognitive functions: relation to Alzheimer's disease and diabetes. *Behav Brain Res* 75, 1-11.
- Molina, A.J., Wikstrom, J.D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B.E., *et al.* (2009). Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 58, 2303-2315.
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., *et al.* (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34, 267-273.
- Morrish, F., Giedt, C., and Hockenbery, D. (2003). c-MYC apoptotic function is mediated by NRF-1 target genes. *Genes Dev* 17, 240-255.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Mukherjee, B., Anbazhagan, S., Roy, A., Ghosh, R., and Chatterjee, M. (1998). Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother* 52, 89-95.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I., and Hayashi, J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* 7, 934-940.
- Nakada, K., Sato, A., and Hayashi, J. (2009). Mitochondrial functional complementation in mitochondrial DNA-based diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 1907-1913.
- Nakamura, K., Nemani, V.M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J.M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., *et al.* (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* 286, 20710-20726.
- Nathan, D.M., Cleary, P.A., Backlund, J.Y., Genuth, S.M., Lachin, J.M., Orchard, T.J., Raskin, P., and Zinman, B. (2005). Intensive

- diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 353, 2643-2653.
- Nelson, D., and Cox, M.M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., *et al.* (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-790.
- Nisoli, E., and Carruba, M.O. (2006). Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci* 119, 2855-2862.
- Njoroge, F.G., and Monnier, V.M. (1989). The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. *Progress in clinical and biological research* 304, 85-107.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278, 7743-7746.
- Olivera, S., Fernandez, A., Latini, A., Rosillo, J.C., Casanova, G., Wajner, M., Cassina, P., and Barbeito, L. (2008). Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiol Dis* 32, 528-534.
- Oosawa, Y., Ashcroft, S.J., and Ashcroft, F.M. (1992). Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels from an insulin-secreting cell line incorporated into planar lipid bilayers. *Diabetologia* 35, 619-623.
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 191, 1141-1158.
- Ott, B.R., Lafleche, G., Whelihan, W.M., Buongiorno, G.W., Albert, M.S., and Fogel, B.S. (1996). Impaired awareness of deficits in Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders* 10, 68-76.
- Oz, G., Seaquist, E.R., Kumar, A., Criego, A.B., Benedict, L.E., Rao, J.P., Henry, P.G., Van De Moortele, P.F., and Gruetter, R. (2007). Human brain glycogen content and metabolism: implications on its role in brain energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E946-951.

- Palikaras, K., and Tavernarakis, N. (2012). Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Frontiers in genetics* 3, 297.
- Palmer, C.S., Elgass, K.D., Parton, R.G., Osellame, L.D., Stojanovski, D., and Ryan, M.T. (2013). Adaptor proteins MiD49 and MiD51 can act independently of Mff and Fis1 in Drp1 recruitment and are specific for mitochondrial fission. *J Biol Chem* 288, 27584-27593.
- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E., and Ryan, M.T. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* 12, 565-573.
- Paltauf-Doburzynska, J., Malli, R., and Graier, W.F. (2004). Hyperglycemic conditions affect shape and Ca<sup>2+</sup> homeostasis of mitochondria in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 44, 423-436.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282, 24131-24145.
- Papoulis, A., al-Abed, Y., and Bucala, R. (1995). Identification of N<sup>2</sup>-(1-carboxyethyl)guanine (CEG) as a guanine advanced glycosylation end product. *Biochemistry* 34, 648-655.
- Pardridge, W.M., Boado, R.J., and Farrell, C.R. (1990). Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem* 265, 18035-18040.
- Parra, V., Verdejo, H.E., Iglewski, M., Campo, A.D., Troncoso, R., Jones, D., Zhu, Y., Kuzmicic, J., Pennanen, C., Lopez-Crisosto, C., *et al.* (2013). Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFkappaB-Opa-1 signaling pathway. *Diabetes*.
- Pekiner, C., Cullum, N.A., Hughes, J.N., Hargreaves, A.J., Mahon, J., Casson, I.F., and McLean, W.G. (1993). Glycation of brain actin in experimental diabetes. *J Neurochem* 61, 436-442.
- Phillips, S.A., and Thornalley, P.J. (1993). The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *European journal of biochemistry / FEBS* 212, 101-105.

- Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (2005). The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Human molecular genetics* 14, 1405-1415.
- Pieper, G.M., and Riaz ul, H. (1997). Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *J Cardiovasc Pharmacol* 30, 528-532.
- Pirart, J. (1977). [Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973 (author's transl)]. *Diabete Metab* 3, 97-107.
- Pompliano, D.L., Peyman, A., and Knowles, J.R. (1990). Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 29, 3186-3194.
- Poyton, R.O., and McEwen, J.E. (1996). Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* 65, 563-607.
- Prada, P.O., Zecchin, H.G., Gasparetti, A.L., Torsoni, M.A., Ueno, M., Hirata, A.E., Corezola do Amaral, M.E., Hoer, N.F., Boschero, A.C., and Saad, M.J. (2005). Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146, 1576-1587.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24, 78-90.
- Qi, Z., He, J., Su, Y., He, Q., Liu, J., Yu, L., Al-Attas, O., Hussain, T., Ding, S., Ji, L., *et al.* (2011). Physical exercise regulates p53 activity targeting SCO2 and increases mitochondrial COX biogenesis in cardiac muscle with age. *PLoS One* 6, e21140.
- Rantanen, A., Gaspari, M., Falkenberg, M., Gustafsson, C.M., and Larsson, N.G. (2003). Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 14, 1-6.
- Ravelojaona, V., Peterszegi, G., Molinari, J., Gesztesi, J.L., and Robert, L. (2007). [Demonstration of the cytotoxic effect of Advanced Glycation Endproducts (AGE-s)]. *J Soc Biol* 201, 185-188.

- Ray, S., and Ray, M. (1981). Isolation of methylglyoxal synthase from goat liver. *J Biol Chem* 256, 6230-6233.
- Reddy, V.P., Zhu, X., Perry, G., and Smith, M.A. (2009). Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 16, 763-774.
- Reichard, G.A., Jr., Skutches, C.L., Hoeldtke, R.D., and Owen, O.E. (1986). Acetone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 35, 668-674.
- Remor, A.P., de Matos, F.J., Ghisoni, K., da Silva, T.L., Eidt, G., Burigo, M., de Bem, A.F., Silveira, P.C., de Leon, A., Sanchez, M.C., *et al.* (2011). Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: Involvement of advanced glycosylated end products. *Biochim Biophys Acta* 1812, 1460-1471.
- Richard, J.P. (1991). Kinetic parameters for the elimination reaction catalyzed by triosephosphate isomerase and an estimation of the reaction's physiological significance. *Biochemistry* 30, 4581-4585.
- Rorsman, P., and Renstrom, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1029-1045.
- Rosen, P., Nawroth, P.P., King, G., Moller, W., Tritschler, H.J., and Packer, L. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 17, 189-212.
- Roy, D., Felty, Q., Narayan, S., and Jayakar, P. (2007). Signature of mitochondria of steroidal hormones-dependent normal and cancer cells: potential molecular targets for cancer therapy. *Front Biosci* 12, 154-173.
- Ryle, C., Leow, C.K., and Donaghy, M. (1997). Nonenzymatic glycation of peripheral and central nervous system proteins in experimental diabetes mellitus. *Muscle Nerve* 20, 577-584.
- Sakurai, S., Yonekura, H., Yamamoto, Y., Watanabe, T., Tanaka, N., Li, H., Rahman, A.K., Myint, K.M., Kim, C.H., and Yamamoto, H. (2003). The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14, S259-263.
- Santel, A., and Frank, S. (2008). Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB life* 60, 448-455.

- Santel, A., and Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 114, 867-874.
- Saraste, M. (1990). Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys* 23, 331-366.
- Sayeski, P.P., and Kudlow, J.E. (1996). Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J Biol Chem* 271, 15237-15243.
- Scarpulla, R.C. (1997). Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr* 29, 109-119.
- Scarpulla, R.C. (2002). Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1576, 1-14.
- Scarpulla, R.C. (2008). Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci* 1147, 321-334.
- Schalkwijk, C.G., and Stehouwer, C.D. (2005). Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 109, 143-159.
- Scheele, C., Nielsen, A.R., Walden, T.B., Sewell, D.A., Fischer, C.P., Brogan, R.J., Petrovic, N., Larsson, O., Tesch, P.A., Wennmalm, K., *et al.* (2007). Altered regulation of the PINK1 locus: a link between type 2 diabetes and neurodegeneration? *Faseb J* 21, 3653-3665.
- Schramm, J., Oliveira, A., Leite, I.C., Valente, J.G., Gadelha, A.M.J., Portela, M.C., and Campos, M.R. (2004). Transição epidemiológica e o estudo de carga de doenças no Brasil. *Ciencia e Saúde Coletiva* 9, 897-908
- Schwab, R.S. (1960). Progression and prognosis in Parkinson's disease. *J Nerv Ment Dis* 130, 556-566.
- Schwarz, T.L. (2013). Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
- Scivittaro, V., Ganz, M.B., and Weiss, M.F. (2000). AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta(II) in neonatal mesangial cells. *American journal of physiology Renal physiology* 278, F676-683.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P., and Jensen, R.E. (2003). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* 14, 2342-2356.

- Shadel, G.S., and Clayton, D.A. (1993). Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation. *J Biol Chem* 268, 16083-16086.
- Shenouda, S.M., Widlansky, M.E., Chen, K., Xu, G., Holbrook, M., Tabit, C.E., Hamburg, N.M., Frame, A.A., Caiano, T.L., Kluge, M.A., *et al.* (2011). Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation* 124, 444-453.
- Shiba, T., Inoguchi, T., Sportsman, J.R., Heath, W.F., Bursell, S., and King, G.L. (1993). Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol* 265, E783-793.
- Shinohara, M., Thornalley, P.J., Giardino, I., Beisswenger, P., Thorpe, S.R., Onorato, J., and Brownlee, M. (1998). Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest* 101, 1142-1147.
- Silver, I., and Erecinska, M. (1998). Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv Exp Med Biol* 454, 7-16.
- Sima, A.A. (1994). Pathological definition and evaluation of diabetic neuropathy and clinical correlations. *Can J Neurol Sci* 21, S13-17.
- Sjovall, F., Morota, S., Hansson, M.J., Friberg, H., Gnaiger, E., and Elmer, E. (2010). Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Crit Care* 14, R214.
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J.M., Frey, T.G., and Chan, D.C. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Molecular biology of the cell* 20, 3525-3532.
- Sosa, L., Gutierrez, S., Petiti, J.P., Palmeri, C.M., Mascanfroni, I.D., Soaje, M., De Paul, A.L., and Torres, A.I. (2012). 17beta-Estradiol modulates the prolactin secretion induced by TRH through membrane estrogen receptors via PI3K/Akt in female rat anterior pituitary cell culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302, E1189-1197.
- Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of energy homeostasis through the PGC1 coactivators. *Novartis Foundation symposium* 286, 3-6; discussion 6-12, 162-163, 196-203.

- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., *et al.* (2006). Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397-408.
- St-Pierre, J., Lin, J., Krauss, S., Tarr, P.T., Yang, R., Newgard, C.B., and Spiegelman, B.M. (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem* 278, 26597-26603.
- Stern, D.M., Yan, S.D., Yan, S.F., and Schmidt, A.M. (2002). Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing research reviews* 1, 1-15.
- Suen, D.F., Norris, K.L., and Youle, R.J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22, 1577-1590.
- Suwa, M., Nakano, H., and Kumagai, S. (2003). Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *Journal of applied physiology* 95, 960-968.
- Szwergold, B.S., Kappler, F., and Brown, T.R. (1990). Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science* 247, 451-454.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., and Mihara, K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282, 11521-11529.
- Talaei, F., Van Praag, V.M., Shishavan, M.H., Landheer, S.W., Buikema, H., and Henning, R.H. (2014). Increased protein aggregation in Zucker Diabetic Fatty rat brain: identification of key mechanistic targets and the therapeutic application of hydrogen sulfide. *BMC cell biology* 15, 1.
- The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group (2008). Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 358, 2545-2559.
- The Advance Collaborative Group (2008). Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 358, 2560-2572.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329, 977-986.

- Thornalley, P.J. (1988). Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J* 254, 751-755.
- Thornalley, P.J. (1990). The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 269, 1-11.
- Thornalley, P.J. (1993). The glyoxalase system in health and disease. *Molecular aspects of medicine* 14, 287-371.
- Thornalley, P.J. (1996). Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol* 27, 565-573.
- Thornalley, P.J. (2008). Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact* 23, 125-150.
- Thornalley, P.J., Langborg, A., and Minhas, H.S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 344 Pt 1, 109-116.
- Tomlinson, D.R., and Gardiner, N.J. (2008). Glucose neurotoxicity. *Nature reviews Neuroscience* 9, 36-45.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., *et al.* (2008a). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J* 27, 433-446.
- Twig, G., Hyde, B., and Shirihai, O.S. (2008b). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 1777, 1092-1097.
- Twig, G., and Shirihai, O.S. (2011). The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal* 14, 1939-1951.
- Vaca, C.E., Fang, J.L., Conradi, M., and Hou, S.M. (1994). Development of a 32P-postlabelling method for the analysis of 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA adducts of methylglyoxal. *Carcinogenesis* 15, 1887-1894.
- Valle, I., Alvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S., and Monsalve, M. (2005). PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 66, 562-573.
- Van den Berghe, G. (2004). How does blood glucose control with insulin save lives in intensive care? *J Clin Invest* 114, 1187-1195.

- Vander Jagt, D.L., and Hunsaker, L.A. (2003). Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chemico-biological interactions* 143-144, 341-351.
- Vander Jagt, D.L., Robinson, B., Taylor, K.K., and Hunsaker, L.A. (1992). Reduction of trioses by NADPH-dependent aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J Biol Chem* 267, 4364-4369.
- Vercauteren, K., Gleyzer, N., and Scarpulla, R.C. (2009). Short hairpin RNA-mediated silencing of PRC (PGC-1-related coactivator) results in a severe respiratory chain deficiency associated with the proliferation of aberrant mitochondria. *J Biol Chem* 284, 2307-2319.
- Vinik, A.I., Holland, M.T., Le Beau, J.M., Liuzzi, F.J., Stansberry, K.B., and Colen, L.B. (1992). Diabetic neuropathies. *Diabetes Care* 15, 1926-1975.
- Virbasius, J.V., and Scarpulla, R.C. (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1309-1313.
- Vlassara, H., Brownlee, M., and Cerami, A. (1983). Excessive nonenzymatic glycosylation of peripheral and central nervous system myelin components in diabetic rats. *Diabetes* 32, 670-674.
- Voet, D., and Voet, J.D. (1995). *Biochemistry*. New York: John Wiley & sons, Inc.
- Wang, H., Meng, Q.H., Gordon, J.R., Khandwala, H., and Wu, L. (2007). Proinflammatory and proapoptotic effects of methylglyoxal on neutrophils from patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinical biochemistry* 40, 1232-1239.
- Wang, J., Liu, H., Chen, B., Li, Q., Huang, X., Wang, L., Guo, X., and Huang, Q. (2012a). RhoA/ROCK-dependent moesin phosphorylation regulates AGE-induced endothelial cellular response. *Cardiovascular diabetology* 11, 7.
- Wang, W., Wang, Y., Long, J., Wang, J., Haudek, S.B., Overbeek, P., Chang, B.H., Schumacker, P.T., and Danesh, F.R. (2012b). Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell metabolism* 15, 186-200.

- Wang, X., Desai, K., Chang, T., and Wu, L. (2005). Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. *J Hypertens* 23, 1565-1573.
- Wang, X., Su, B., Lee, H.G., Li, X., Perry, G., Smith, M.A., and Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29, 9090-9103.
- Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., and Zhu, X. (2008). Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19318-19323.
- Weimbs, T., and Stoffel, W. (1994). Topology of CNS myelin proteolipid protein: evidence for the nonenzymatic glycosylation of extracytoplasmic domains in normal and diabetic animals. *Biochemistry* 33, 10408-10415.
- Wells-Knecht, M.C., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (1995). Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry* 34, 15134-15141.
- Wells, L., Vosseller, K., and Hart, G.W. (2001). Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291, 2376-2378.
- Westwood, M.E., McLellan, A.C., and Thornalley, P.J. (1994). Receptor-mediated endocytic uptake of methylglyoxal-modified serum albumin. Competition with advanced glycation end product-modified serum albumin at the advanced glycation end product receptor. *J Biol Chem* 269, 32293-32298.
- Whelan, S.P., and Zuckerbraun, B.S. (2013). Mitochondrial signaling: forwards, backwards, and in between. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 351613.
- WHO (2005). Preventing chronic diseases: a vital investment. . World Health Organization.
- Williams, B., Gallacher, B., Patel, H., and Orme, C. (1997). Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* 46, 1497-1503.
- Williams, S.K., Howarth, N.L., Devenny, J.J., and Bitensky, M.W. (1982). Structural and functional consequences of increased tubulin glycosylation in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6546-6550.

- Williamson, J.R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K.S., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J.R., van den Enden, M., Kilo, C., and Tilton, R.G. (1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42, 801-813.
- Winer, N., and Sowers, J.R. (2004). Epidemiology of diabetes. *J Clin Pharmacol* 44, 397-405.
- Wirostko, B., Wong, T.Y., and Simo, R. (2008). Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog Retin Eye Res* 27, 608-621.
- Wu, L., and Juurlink, B.H. (2002). Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 39, 809-814.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., *et al.* (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.
- Xu, X., Kobayashi, S., Chen, K., Timm, D., Volden, P., Huang, Y., Gulick, J., Yue, Z., Robbins, J., Epstein, P.N., *et al.* (2013). Diminished autophagy limits cardiac injury in mouse models of type 1 diabetes. *J Biol Chem* 288, 18077-18092.
- Yang, C., Aye, C.C., Li, X., Diaz Ramos, A., Zorzano, A., and Mora, S. (2012). Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. *Biosci Rep* 32, 465-478.
- Yasukawa, K., Oshiumi, H., Takeda, M., Ishihara, N., Yanagi, Y., Seya, T., Kawabata, S., and Koshiba, T. (2009). Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Science signaling* 2, ra47.
- Yoon, K.H., Ko, S.H., Cho, J.H., Lee, J.M., Ahn, Y.B., Song, K.H., Yoo, S.J., Kang, M.I., Cha, B.Y., Lee, K.W., *et al.* (2003). Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2300-2308.
- Yoon, Y., Galloway, C.A., Jhun, B.S., and Yu, T. (2011). Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid Redox Signal* 14, 439-457.
- Yoon, Y., and McNiven, M.A. (2001). Mitochondrial division: New partners in membrane pinching. *Curr Biol* 11, R67-70.
- Yoshii, S.R., Kishi, C., Ishihara, N., and Mizushima, N. (2011). Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 286, 19630-19640.

- Yu, P.H., Wright, S., Fan, E.H., Lun, Z.R., and Gubisne-Harberle, D. (2003). Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1647, 193-199.
- Yu, T., Jhun, B.S., and Yoon, Y. (2011). High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxid Redox Signal* 14, 425-437.
- Yu, T., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2653-2658.
- Yu, T., Sheu, S.S., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2008). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 79, 341-351.
- Zaid, A., Li, R., Luciakova, K., Barath, P., Nery, S., and Nelson, B.D. (1999). On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J Bioenerg Biomembr* 31, 129-135.
- Zhang, P., Liu, N., and Wang, Y. (2009). Insulin may cause deterioration of proliferative diabetic retinopathy. *Medical hypotheses* 72, 306-308.
- Zong, H., Ren, J.M., Young, L.H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M.J., and Shulman, G.I. (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15983-15987.
- Zorzano, A., Liesa, M., Sebastian, D., Segales, J., and Palacin, M. (2010). Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Seminars in cell & developmental biology* 21, 566-574.
- Züchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., *et al.* (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36, 449-451.