

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Aline Pertile Remor

**ESTUDO DE MARCADORES DE NEURODEGENERAÇÃO E  
DE NEOVASCULARIZAÇÃO EM MODELO CRÔNICO DE  
HIPERGLICEMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Alexandra Susana Latini

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cecília Sanchez

Florianópolis  
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

P469e PertileRemor, Aline

Estudo de marcadores de neurodegeneração e de Neovascularização em modelo crônico de hiperglicemia [dissertação] / Aline PertileRemor ; orientadora, Alexandra Susana Latini. - Florianópolis, SC, 2011.

146 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Hiperglicemia. 3. Metabolismo energético. 4. Estresse Oxidativo. I. Latini, Alexandra Susana. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

**“Estudo de marcadores de neurodegeneração e de neovascularização em modelo crônico de hiperglicemia”**

por

**Aline Pertile Remor**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 02/PPGBQA/2011) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



---

Prof. Dra. Alexandra Susana Latini (Presidente /Orientadora)



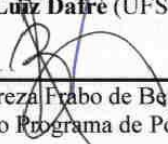
---

Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher (ICBS/UFRGS)



---

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre (UFSC)



---

Prof. Dra. Andreza Frabo de Bem  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 16 de fevereiro de 2011.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais, Elder e Eunice, pelo exemplo de pessoas que são para mim, pelos ensinamentos, pela confiança, pela força, pelo apoio, pelo amor incondicional e por todo o suporte para eu chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Thiago e Marina, pelo carinho e companheirismo.

À minha orientadora, Prof. Dra. Alexandra Latini, por me receber em seu laboratório, por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação, pela preocupação que sempre demonstrou e pelo total apoio e auxílio.

À minha co-orientadora, Maria Cecília Sanchez, pelo carinho e recepção quando estive em seu laboratório em Córdoba.

Aos professores da Pós-Graduação em Bioquímica, pelos conhecimentos repassados.

Ao meu namorado, Lucas, pelo apoio e incentivo diante das dificuldades.

À Deus, grande responsável pela minha existência e por guiar sempre meus passos.

Aos grandes amigos do Laboratório, Adalberto, Alessandra, André, Andreza, Bianca, Danúbia, Débora, Fritz, Gianni, Greici, Kaite, Karina, Jade, Marcos, Mariana, Marília, Paulo, Priscila, Thiago e Viviane.

Aos técnicos Bibiana e Dênis pela ajuda indispensável.

A todos os amigos que direta ou indiretamente participaram e contribuíram nesta fase da minha vida... Obrigada!

Ao CNPq pelo apoio financeiro.



## RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla caracterizada pela hiperglicemia persistente decorrente da falta de insulina e/ou da resistência dos tecidos à ação do hormônio. A alta morbidade e mortalidade característica desta condição estão fortemente associadas ao desenvolvimento de alterações patológicas na vasculatura. No entanto, os mecanismos fisiopatogênicos envolvidos no desenvolvimento das alterações vasculares, ainda não foram completamente elucidados. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo investigar o efeito do estrito controle das concentrações séricas de glicose através da administração de insulina em animais que desenvolveram hiperglicemia através da administração de estreptozotocina (STZ) sobre parâmetros do metabolismo energético, estresse oxidativo, apoptose, inflamação, neurodegeneração e vascularização em cérebro, tecidos periféricos, sangue e/ou líquido cefalorraquidiano. Ainda, foi investigado o efeito *in vitro* de derivados tóxicos da glicose, incluindo metilglioxal e proteínas glicadas não enzimaticamente (AGEs), sobre medidas de função mitocondrial, estresse oxidativo e neovascularização em suspensões mitocondriais obtidas a partir de músculo esquelético e fígado, bem como, em fibroblastos primários preparados a partir de pele de rato, e em células de retina (linhagem humana). A persistente hiperglicemia ocasionou estresse oxidativo o qual não conseguiu ser prevenido com a administração exógena de insulina. Esta situação pareceu ser a responsável pela severa deficiência no metabolismo energético observada nos animais tratados com STZ. Além disso, nos animais hiperglicêmicos, foi detectada uma marcada atividade da creatinaquinase mitocondrial e/ou total, provavelmente como um mecanismo compensatório para manter o estado energético da célula em situações de severo estresse oxidativo. Ainda, a hiperglicemia provocou o desenvolvimento de neurodegeneração e induziu a apoptose. Em concordância, a exposição de MG e MG-BSA em sistemas *in vitro*, também demonstrou inibições no metabolismo energético, estresse celular e angiogênese. Estes resultados demonstram que a hiperglicemia provoca deficiência no metabolismo energético celular e induz ao estresse oxidativo, e a normalização dos níveis glicêmicos foi bastante eficiente na prevenção destes processos, provavelmente devido às mudanças epigenéticas que estão relacionadas com o aumento persistente na produção de EROs.

**Palavras-chave:** hiperglicemia, metabolismo energético, estresse oxidativo.





## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic syndrome of multiple etiologies characterized by persistent hyperglycemia resulting from lack of insulin and/or resistance of tissues to the hormone action. The high morbidity and mortality characteristic of this entity are known to be strongly associated with the development of pathological changes in the vasculature. However, the mechanisms underlying the vessel physiology alterations have not been fully elucidated. Thus, this study aimed to investigate the effect of insulin administration-induced strict control of glycemia on parameters of energy metabolism, oxidative stress, apoptosis, inflammation, neurodegeneration and angiogenesis in the brain, peripheral tissues, blood and/or cerebrospinal fluid of streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic rats. Here, it was also investigated the *in vitro* effect of toxic glucose derivatives, including methylglyoxal and advanced glycation end-products (AGEs) on mitochondrial function, cellular stress and vasculogenesis in rat skin primary fibroblasts, retinal cells (human cell line) and/or mitochondrial preparations obtained from rat skeletal muscle and liver. Results showed that persistent hyperglycemia elicited enhanced oxidative stress that could not be prevented by administration of exogenous insulin. This appeared to be responsible for the severe deficiency in energy metabolism observed in animals treated with STZ. Moreover, a marked increase in the activity of mitochondrial and/or total of creatine kinase was detected in hyperglycemic animals, probably as a compensatory mechanism to maintain the cellular energy state in situations of severe oxidative stress. Furthermore, the hyperglycemic condition also caused neurodegeneration and induced apoptosis. In agreement, exposure of MG and MG-BSA to *in vitro* experimental systems also induced energy metabolism impairments, cellular stress and angiogenesis. Summarizing, the hyperglycemia causes impaired cellular energy metabolism and induces oxidative stress. Insulin-induced tight control of glycemia was mostly effective in preventing these alterations. The lack of normoglycemia effectiveness on oxidative stress alterations could be probably related to hyperglycemic-induced epigenetic changes that are associated with persistent ROS production.

**Keywords:** hyperglycemia, energetic metabolism, oxidative stress.



## LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

<b>Figura 1</b>	Esquema ilustrativo das células das ilhotas de Langerhans.....	21
<b>Figura 2</b>	Estrutura da insulina biologicamente ativa (A). Processamento proteolítico da pré-pró-insulina madura e peptídeo C (B).....	22
<b>Figura 3</b>	Secreção de insulina pelas células $\beta$ pancreáticas....	23
<b>Figura 4</b>	Processos induzidos pela sinalização intracelular da insulina.....	24
<b>Figura 5</b>	Identificação do mRNA da pré-pró-insulina no sistema nervoso.....	25
<b>Figura 6</b>	Identificação da presença de insulina em neurônios do hipocampo por técnicas de microscopia eletrônica.....	26
<b>Figura 7</b>	Mecanismos de toxicidade induzidos pela hiperglicemia.....	28
<b>Figura 8</b>	Formação e desintoxicação de metilglioxal (MG).....	30
<b>Figura 9</b>	Formação de produtos de glicação terminal (AGEs).....	33
<b>Figura 10</b>	Anatomia bioquímica da mitocôndria (A) e proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (B)..	38
<b>Figura 11</b>	Estágios de respiração mitocondrial.....	42
<b>Figura 12</b>	Efeito da hiperglicemia induzida por estreptozotocina na formação de neovasos e estresse celular na retina de ratos Wistar adultos.....	115
<b>Figura 13</b>	Efeito da hiperglicemia induzida por estreptozotocina na indução de estresse celular em retina de ratos Wistar adultos.....	116
<b>Figura 14</b>	Efeito <i>in vitro</i> do metilglioxal no conteúdo de GFAP em linhagem celular MIO-M1 humana.....	117
<b>Figura 15</b>	Efeitos celulares envolvidos durante períodos de hiperglicemia persistente.....	127

## LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO 1

<b>Figure 1</b>	Effect of 60 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin® N insulin twice / day) administration in bodyweight gain (BW) (A), blood glucose concentrations (B), blood free thiol (NPSH) content (C), blood TBA-RS levels (D), and cerebrospinal fluid (CSF) tetrahydrobiopterin (BH4) concentration (E).....	76
<b>Figure 2</b>	Effect of 10 and/or 60 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin® N insulin twice / day) administration on the activities of the complexes I, II, IV, V of the respiratory chain (A – D), mitochondrial and total creatine kinase (E), mitochondrial hexokinase (F), and mitochondrial oxygen consumption in brain from adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats.....	77
<b>Figure 3</b>	Effect of 10 and/or 60 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin® N insulin twice / day) administration on the activities of total (A) and mitochondrial (B) creatine kinase, and mitochondrial hexokinase (C) in peripheral tissues from adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats.....	78
<b>Figure 4</b>	Effect of 60 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin® N insulin twice / day) administration on caspase-3 cleaving in brain from adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats.....	79

## LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO 2

<b>Figure 1</b>	Effect of 10 and 30 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin® N insulin twice / day) administration in bodyweight gain (BW) (A) and blood glucose concentrations in adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats (B).....	108
<b>Figure 2</b>	Effect of 10 and 30 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin® N insulin twice / day) administration on	

	the activities of the complexes I, II and IV of the respiratory chain in skeletal muscle ( <i>AI-III</i> ), cardiac muscle ( <i>BI-III</i> ), liver ( <i>CI-III</i> ) and kidney ( <i>DI-III</i> ) from adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats.....	109
<b>Figure 3</b>	Effect of 30 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin <sup>®</sup> N insulin twice / day) administration on DNA oxidation in skeletal muscle from adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats.....	110
<b>Figure 4</b>	Characterization of bovine serum albumin (BSA) derivatives induced by methylglyoxal (MG) exposure (MG-BSA) ( <i>A</i> ), and <i>in vitro</i> effect of MG-BSA on respiratory chain complex activities in mitochondrial preparations from skeletal and liver tissues ( <i>B</i> and <i>C</i> ).....	111 112
<b>Figure 5</b>	Short and long-term <i>in vitro</i> effect of methylglyoxal (MG) and methylglyoxal-induced glycated albumin (MG-BSA) on mitochondrial oxidative stress in primary rat skin fibroblasts.....	113
<b>Figure 6</b>	Long-term <i>in vitro</i> effect of methylglyoxal (MG)-induced glycated albumin (MG-BSA) on mitochondrial respiration ( <i>A</i> ), and stepwise titration FCCP curve ( <i>B</i> ) in primary rat skin fibroblasts.....	114

## LISTA DE ESQUEMAS

### LISTA DE ESQUEMAS DA DISSERTAÇÃO

<b>Esquema 1</b>	Desenho experimental. Desenvolvimento de hiperglicemia pela administração de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar adultos.....	46
------------------	--	----

### LISTA DE ESQUEMAS DO MANUSCRITO 1

<b>Escheme 1</b>	Experimental design. Hyperglycemic conditions were induced by administrating streptozotocin (STZ; i.p.). The glyceimic control was achieved by treating with insulin (INS; 1.5 UI Novolin <sup>®</sup> N twice a day).....	75
------------------	--	----

### LISTA DE ESQUEMAS DO MANUSCRITO 2

<b>Escheme 1</b>	Experimental design. Hyperglycemic conditions were induced by administrating streptozotocin (STZ; i.p.). The glyceimic control was achieved by treating with insulin (INS; 1.5 UI Novolin <sup>®</sup> N twice a day).....	107
------------------	--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\Delta\psi$ : Potencial de membrana mitocondrial  
3-DG: 3-deoxiglicosona  
ADP: Adenosina difosfato  
AGE: Produto de glicação terminal  
Akt: Proteína quinase serina-treonina  
ATP: Adenosina trifosfato  
CK: Creatinaquinase  
CoQ: Ubiquinona; Coenzima Q  
CR: Cadeia respiratória  
Cu<sub>A</sub>: Cobre binuclear A  
Cu<sub>B</sub>: Cobre binuclear B  
DA: Doença de Alzheimer  
DAG: Diacilglicerol  
DHAP: Diidroxiacetona fosfato  
DM: Diabetes mellitus  
DME: Edema macular diabético  
DMEM: Meio Eagle's com modificação de Dubelcco  
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético  
EGTA: Ácido etilenoglicoltetracético  
ERO: Espécie reativa de oxigênio  
FAD: Flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)  
FADH<sub>2</sub>: Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)  
FMN: Flavina mononucleotídeo  
GFAP: Proteína glial fibrilar ácida  
GLUT: Transportador de glicose  
GO: Glioxal  
GSH: Glutationa reduzida  
HIF-1 $\alpha$ : Fator induzível por hipóxia  
HK: Hexoquinase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio  
IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$   
IRS: Substratos do receptor de insulina  
MG: Metilglioxal  
MG-BSA: AGE sintetizado a partir de albumina sérica bovina e metilglioxal  
Mn-SOD: Manganês superóxido dismutase  
MOPS: Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico  
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NAD(P)<sup>+</sup>: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)  
NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)  
NF-κB: Fator de transcrição nuclear κB  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
ON: Óxido nítrico, monóxido de nitrogênio  
PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio  
PCr: Fosfocreatina  
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas  
P<sub>i</sub>: Fosfato inorgânico  
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase  
PKC: Proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup>  
RAGE: Receptor de AGE  
SNC: Sistema nervoso central  
Sp1: Fator de transcrição específico 1  
SSAO: Amina oxidase sensível a ação de semicarbazida  
STZ: Estreptozotocina  
TGF β: Fator de crescimento transformante β  
UDP-GlcNAc: UDP-*N*-acetilglicosamina  
VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular  
VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade  
VSMCs: Células da musculatura lisa vascular



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1	DIABETES MELLITUS.....	19
1.2	HORMÔNIO INSULINA.....	20
<b>1.2.1</b>	<b>Síntese de insulina pelo pâncreas endócrino</b> .....	20
<b>1.2.2</b>	<b>Secreção de insulina</b> .....	22
<b>1.2.3</b>	<b>Efeitos celulares desencadeados pela insulina</b> .....	23
<b>1.2.4</b>	<b>Sinalização mediada por insulina</b> .....	24
<b>1.2.5</b>	<b>Síntese de insulina pelo tecido cerebral</b> .....	25
1.3	MECANISMOS MOLECULARES DE TOXICIDADE INDUZIDOS PELA HIPERGLICEMIA.....	27
<b>1.3.1</b>	<b>Aumento do fluxo da via do poliol</b> .....	27
<b>1.3.2</b>	<b>Aumento do fluxo da via das hexosaminas</b> .....	28
<b>1.3.3</b>	<b>Ativação da PKC</b> .....	29
<b>1.3.4</b>	<b>Aumento intra e extracelular de AGEs</b> .....	29
1.3.4.1	Formação de MG.....	29
1.3.4.2	Produção de AGEs.....	31
1.4	NEOVASCULARIZAÇÃO ASSOCIADA A HIPERGLICEMIA.....	33
1.5	MECANISMOS DE NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADOS A HIPERGLICEMIA.....	35
<b>1.5.1</b>	<b>Espécies reativas de oxigênio (EROs)</b> .....	36
<b>1.5.2</b>	<b>Mitocôndria</b> .....	37
<b>1.5.3</b>	<b>Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa</b> .....	39
<b>1.5.4</b>	<b>Creatinaquinase (CK)</b> .....	41
<b>1.5.5</b>	<b>Estágios da respiração mitocondrial</b> .....	41
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
2.1	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	44
<b>4</b>	<b>MATERIAL, DESENHO EXPERIMENTAL E MÉTODOS</b> .....	45
4.1	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....	45
<b>4.1.1</b>	<b>Reagentes</b> .....	45
<b>4.1.2</b>	<b>Animais</b> .....	45
<b>4.1.3</b>	<b>Modelo experimental <i>in vivo</i> de hiperglicemia</b> .....	45
<b>4.1.4</b>	<b>Preparação das amostras para análise de parâmetros bioquímicos</b> .....	46
<b>4.1.5</b>	<b>Preparação dos tecidos para análise de parâmetros histológicos</b> .....	47

4.1.5.1	Marcação para GSA-lectina.....	47
4.1.5.2	Marcação para GFAP.....	48
4.2	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....	48
<b>4.2.1</b>	<b>Síntese de AGEs.....</b>	<b>48</b>
4.2.1.1	Formação de AGEs a partir de MG (BSA-MG).....	49
<b>4.2.2</b>	<b>Preparação dos homogeneizados para determinação de parâmetros bioquímicos.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Preparação e manutenção de cultura de células.....</b>	<b>49</b>
4.2.3.1	Cultura primária de fibroblastos.....	49
4.2.3.2	Cultura de linhagem MIO-M1 humana.....	50
4.2.3.2.1	<i>Análise por Western Blotting.....</i>	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1	MANUSCRITO 1.....	52
5.2	MANUSCRITO 2.....	80
5.3	RESULTADOS PRELIMINARES.....	115
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>125</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>126</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>128</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....</b>	<b>129</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla caracterizada por um estado de hiperglicemia persistente decorrente da falta de insulina e/ou da resistência dos tecidos a ação do hormônio (Han et al., 2007; Malecki e Skupien, 2008).

Estimativas recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) projetam um aumento significativo do número de indivíduos com DM até o ano de 2030, esperando-se para essa data um universo de cerca de 366 milhões de indivíduos diabéticos em todo o mundo (Wild et al., 2004). No Brasil, há cerca de 12 milhões de portadores desta doença, sendo que aproximadamente dois terços destes indivíduos têm diagnóstico confirmado (Mello et al., 2003).

De acordo com o comitê executivo para diagnóstico e classificação do DM da “American Diabetes Association” (ADA, 2010) e o Consenso Brasileiro sobre Diabetes (2002), a síndrome pode surgir de forma secundária a alguma doença que provoque a destruição das ilhotas pancreáticas, como por exemplo, tumores, patologias endócrinas, defeitos genéticos e funcionais das células  $\beta$  ou na ação da insulina. No entanto, as formas mais comuns de DM resultam de alterações primárias no sistema sinalizador deste hormônio. Tais alterações podem ser classificadas em duas categorias: DM tipo I e DM tipo II.

O DM do tipo II é a forma mais frequente que afeta aproximadamente 90% da população diabética. Esta condição é caracterizada por ser um distúrbio multifatorial, incluindo fatores genéticos e ambientais, e que geralmente resulta de graus variáveis de resistência tecidual à insulina e de uma deficiência relativa na secreção do hormônio pelas células  $\beta$  (Malecki e Klupa, 2005). Esta forma é observada em adultos e os níveis de glicemia, na maioria dos casos, podem ser controlados através de dieta apropriada e agentes hipoglicemiantes orais (Kowluru e Odenbach, 2004; Morini et al., 2004).

O DM do tipo I manifesta-se geralmente durante a infância e caracteriza-se por uma severa ou total ausência de insulina, a que está comumente associada a processos autoimunes que afetam a funcionalidade das células  $\beta$  do pâncreas (Atkinson e Eisenbarth, 2001; Malecki e Klupa, 2005). Tem sido sugerido que o caráter hereditário do DM do tipo I está relacionado com a expressão de genes reguladores da

produção de anticorpos contra células  $\beta$  pancreáticas (Moore et al., 2009).

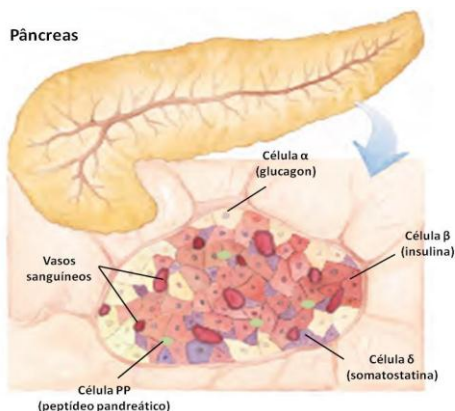
A morbidade e mortalidade associadas ao DM devem-se principalmente ao desenvolvimento de alterações patológicas na vasculatura (Winer e Sowers, 2004). A vasculopatia pode afetar micro e macrovasos. As complicações microvasculares incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia central e periférica; enquanto que as macrovasculares, doença coronária precipitada por aterosclerose, doença vascular periférica, infarto e amputações dos membros inferiores (Wei et al., 1998; Brownlee, 2001; Zimmet et al., 2001; Brem et al., 2006; Wirostko et al., 2008). Grandes estudos randômicos têm claramente demonstrado que o eficiente e imediato controle glicêmico em etapas precoces da doença podem promover a diminuição das complicações vasculares (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, 2008; The Advance Collaborative Group, 2008). Desta forma, se o controle glicêmico não for inicial e não tiver tempo de duração adequado (pelo menos cinco anos), as complicações macro e microvasculares não poderiam ser evitadas adequadamente. Este fenômeno é conhecido como “memória metabólica” (Nathan et al., 2005; Ihnat et al., 2006; Ceriello et al., 2009).

## 1.2 HORMÔNIO INSULINA

### 1.2.1 Síntese de insulina pelo pâncreas endócrino

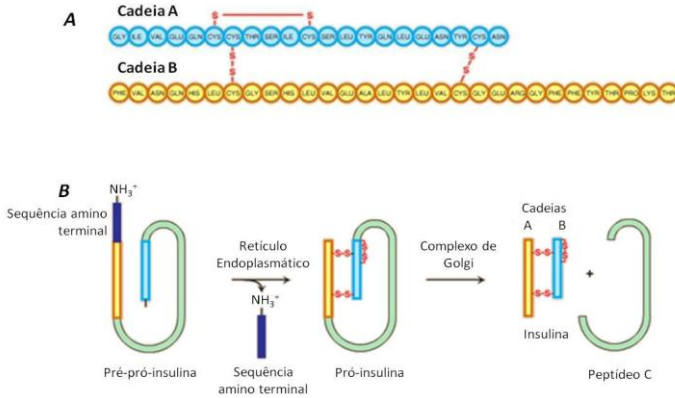
A síntese de insulina ocorre nas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas, o qual é um órgão que possui tanto função exócrina, por secretar o suco pancreático que contém enzimas digestivas, quanto endócrina por produzir além do hormônio insulina, o glucagon e a somatostatina. As ilhotas são compostas principalmente por quatro tipos celulares, as  $\beta$  que constituem cerca de 60% de todas as células, situam-se principalmente no núcleo das ilhotas e secretam insulina, as células  $\alpha$  que correspondem cerca de 25% do total das células pancreáticas e secretam glucagon, as  $\delta$  que constituem cerca de 10% do total e que secretam somatostatina, e em menor proporção as células PP produtoras de polipeptídeo pancreático (Figura 1). A relação entre estes diferentes tipos celulares permite o controle direto da secreção de alguns dos hormônios pelos demais hormônios. Por exemplo, a insulina inibe a secreção de glucagon, enquanto que a

somatostatina inibe a secreção de insulina e glucagon (Lehninger et al., 2004; Guyton, 2006).



**Figura 1. Esquema ilustrativo das células das ilhotas de Langerhans.** As ilhotas de Langerhans são compostas por quatro tipos celulares, as  $\beta$  que secretam insulina, as  $\alpha$  que secretam glucagon, as  $\delta$  que secretam somatostatina e as PP que são produtoras do polipeptídeo pancreático. Adaptado de (Lehninger et al., 2004)

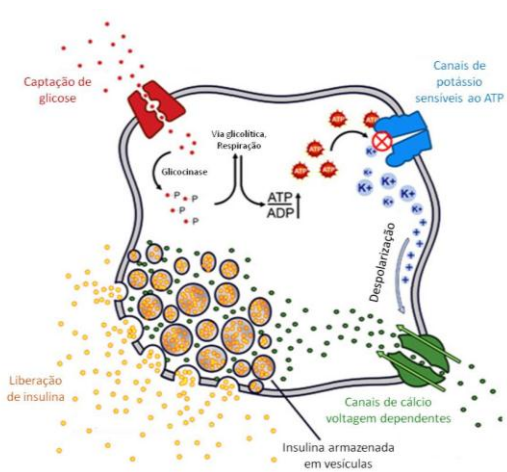
A insulina com atividade biológica é uma proteína pequena composta por duas cadeias polipeptídicas, A e B, unidas por duas pontes dissulfeto (Figura 2A). O hormônio é sintetizado no retículo endoplasmático como um precursor inativo de uma única cadeia polipeptídica denominado de pré-pró-insulina, o qual possui uma sequência específica na porção amino terminal que dirige sua passagem para as vesículas secretoras (Figura 2B). A remoção proteolítica desta sequência amino terminal e a formação de três pontes dissulfeto produzem a pró-insulina, a qual é estocada em grânulos no complexo de Golgi. A elevação de glicose provoca a secreção de insulina, e a pró-insulina é convertida por proteases específicas em insulina madura e peptídeo C, os quais são liberados na circulação. O peptídeo C é liberado em quantidades equimolares à insulina madura, sendo este, portanto, um excelente indicador da produção endógena de insulina, principalmente em indivíduos que se encontram sob terapia exógena com insulina (Lehninger et al., 2004).



**Figura 2. Estrutura da insulina biologicamente ativa (A). Processamento proteolítico da pré-pró-insulina em insulina madura e peptídeo C (B).** A insulina é sintetizada no retículo endoplasmático na forma de um precursor inativo denominado de pré-pró-insulina, e estocado em vesículas no complexo de Golgi na forma de pró-insulina. Com a elevação da glicose, a pró-insulina é convertida por proteases específicas em insulina madura e peptídeo C, os quais são liberados na circulação. Adaptado de (Lehninger et al., 2004)

### 1.2.2 Secreção de insulina

A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pela célula  $\beta$  pancreática, sendo a glicose o mais importante. A glicose é transportada para dentro da célula  $\beta$  através de uma proteína integral de membrana denominada GLUT2, a qual também está presente em outros tecidos como rins, fígado e intestino. Após sua entrada na célula, a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato dando início à via glicolítica para subsequente geração de ATP. O aumento nas concentrações intracelulares de ATP, tornando elevada a relação ATP/ADP, fecha os canais de potássio controlados por ATP provocando a despolarização da membrana celular. Este evento promove a abertura de canais dependentes de voltagem facilitando a entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  que ativam a migração dos grânulos de insulina para a membrana plasmática para posterior extrusão do seu conteúdo (Oosawa et al., 1992; Rorsman e Renstrom, 2003; Marchetti et al., 2008) (Figura 3).



**Figura 3. Secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas.** A glicose é transportada para o interior da célula  $\beta$  através do GLUT2. Posteriormente é fosforilada, dando início a via glicolítica com subsequente geração de ATP. O aumento nas concentrações intracelulares de ATP bloqueia os canais de potássio e provoca a despolarização da membrana, promovendo a entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Este processo estimula a migração dos grânulos que contêm insulina para a membrana plasmática para extrusão de seu conteúdo. Adaptado de [http://ciitn.missouri.edu/cgi-bin/pub\\_view\\_project\\_ind.cgi?g\\_n um=11&c\\_id=2007009](http://ciitn.missouri.edu/cgi-bin/pub_view_project_ind.cgi?g_n um=11&c_id=2007009). Consultado em 25 de novembro, 2010

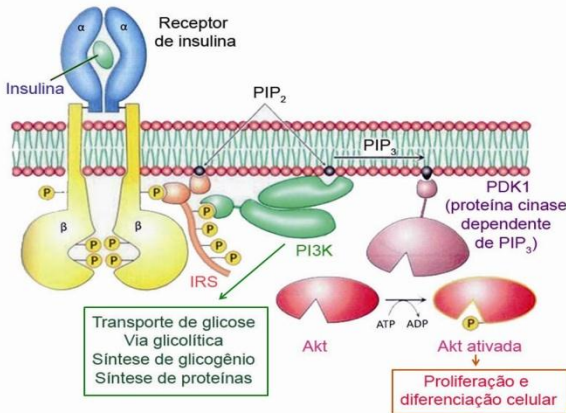
### 1.2.3 Efeitos celulares desencadeados pela insulina

A insulina promove um estado anabólico por conduzir o metabolismo em direção ao armazenamento de carboidratos, lipídeos e a síntese de proteínas. Seus três principais tecidos alvo são o hepático, muscular e adiposo. No fígado, a insulina estimula tanto a glicólise quanto a síntese de glicogênio. Ao mesmo tempo, ela suprime a lipólise e promove a síntese de ácidos graxos de cadeia longa (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 (Baynes e Dominiczak, 2007).

### 1.2.4. Sinalização mediada por insulina

Os efeitos celulares anabólicos acima descritos da insulina são desencadeados através da sua interação com receptores específicos localizados na superfície celular. Tais receptores estão presentes em tecidos sensíveis à ação do hormônio, incluindo músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. Mais recentemente, foi demonstrado que tecidos como o cérebro, eritrócitos e gônadas também apresentam receptores específicos para a insulina (White e Kahn, 1994).



**Figura 4. Processos induzidos pela sinalização intracelular da insulina.** A insulina liga na subunidade  $\alpha$  do receptor de insulina. Esta interação provoca a fosforilação da subunidade  $\beta$ , a qual possui atividade intrínseca de tirosina quinase. Desta forma, ocorre a fosforilação dos substratos do receptor de insulina, os quais ativam algumas vias de sinalização, incluindo a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína quinase serina-treonina (Akt). Adaptado de (Berg et al., 2007)

O receptor da insulina é uma proteína heterotetramétrica com atividade tirosina quinase, composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$  ligadas por pontes dissulfeto (Figura 4). A subunidade  $\alpha$

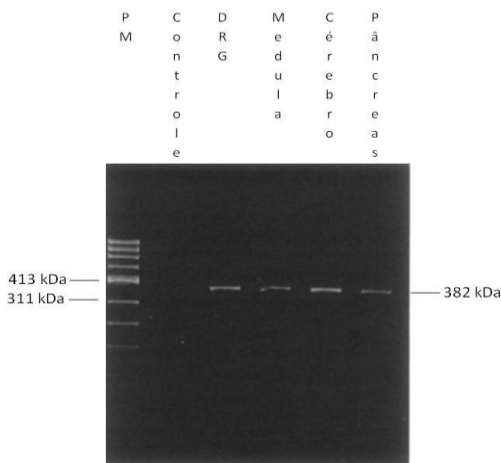


possui o domínio de ligação da insulina, enquanto que a subunidade  $\beta$  possui a atividade de tirosina quinase que é estimulada pela interação da insulina com o receptor (Lehninger et al., 2004).

A ativação da tirosina quinase provoca a fosforilação da subunidade  $\beta$  do receptor em pelo menos seis resíduos de tirosina, resultando na translocação de substratos do receptor de insulina (IRS) desde o citosol para a membrana plasmática. A fosforilação dos IRSs provoca a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína quinase 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).

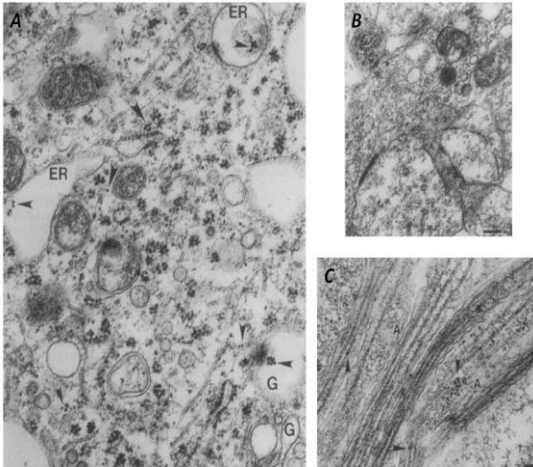
### 1.2.5 Síntese de insulina pelo tecido cerebral

Numerosas evidências na literatura mundial demonstram que a insulina pode ser sintetizada por células do sistema nervoso. A presença tanto do mRNA da pré-pró-insulina, quanto da insulina madura foi demonstrado em cérebro de roedores. Ainda foi evidenciado 100% de homologia entre o mRNA da insulina cerebral com o mRNA da insulina pancreática (Figura 5).



**Figura 5. Identificação do mRNA da pré-pró-insulina no sistema nervoso.** PM: padrão de peso molecular; DGR: gânglios da raiz dorsal. Adaptado de (Schechter et al., 1996)

A presença de insulina cerebral endógena foi observada no retículo endoplasmático, complexo de Golgi, axônios e sinapses de neurônios através de técnicas de microscopia eletrônica (Schechter et al., 1994; Schechter et al., 1996; Schechter et al., 1998; Schechter et al., 1999) (Figura 6).



**Figura 6. Identificação da presença de insulina em neurônios do hipocampo por técnicas de microscopia eletrônica.** As figuras ilustram a presença de insulina em retículo endoplasmático (ER), complexo de Golgi (G) e citoplasma (C) (A); sinapses (B) e axônios (C). Adaptado de (Schechter et al., 1996)

A insulina presente no cérebro deriva em parte da síntese *de novo* do hormônio (Devaskar et al., 1994; Schechter et al., 1996) e do transporte da insulina sintetizada no pâncreas através da barreira hematoencefálica (Baskin et al., 1987; Baura et al., 1993; Banks et al., 1997; Banks, 2004).

A presença de receptores de insulina em astrócitos e neurônios foi demonstrada na substância negra, hipocampo, gânglios basais, córtex frontal e córtex médio temporal de roedores (Unger et al., 1991; Singh et al., 1997; Lang e Lozano, 1998; Abbott et al., 1999), sendo que a insulina se apresenta em maiores concentrações no bulbo olfatório, córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo, amígdala e septo que no resto do encéfalo (Havrankova et al., 1978; Baskin et al., 1987; Unger et al.,

1991). Devido à localização da insulina no hipocampo e córtex médio temporal, Singh e colaboradores (1997) têm sugerido a participação deste hormônio nos processos de aprendizado e memória.

### 1.3 MECANISMOS MOLECULARES DE TOXICIDADE INDUZIDOS PELA HIPERGLICEMIA

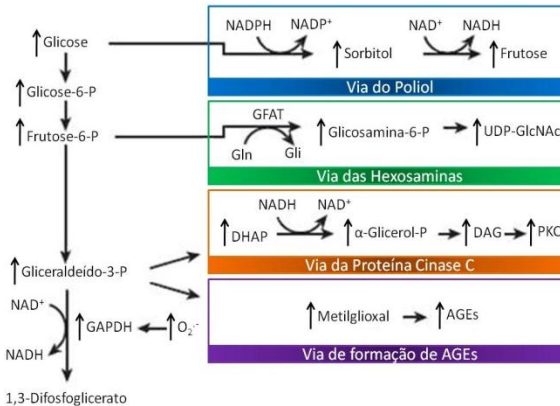
A homeostase da glicose no organismo é mantida pela interação de três processos fisiológicos: secreção de insulina, captação da glicose pelos tecidos e produção de glicose hepática. Mais especificamente, representa um balanço entre a ingesta (absorção de glicose), utilização pelos tecidos (glicólise, via das pentoses, ciclo dos ácidos tricarbóxílicos, síntese de glicogênio) e produção endógena (glicogenólise e gliconeogênese), processos regulados por hormônios, principalmente insulina e glucagon (Meyer et al., 2002).

A hiperglicemia persistente do DM, decorrente da falta de insulina e/ou da resistência dos tecidos a ação do hormônio, parece contribuir para o desenvolvimento das complicações vasculares através de quatro mecanismos principais, incluindo o aumento do fluxo da via do poliol, aumento do fluxo da via das hexosaminas, ativação da proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC) e aumento na concentração de proteínas glicadas de forma não enzimática (AGEs). Estes mecanismos parecem culminar com a produção de espécies reativas, oxidação de proteínas, inativação de enzimas, alterações no sistema de defesa antioxidante, disfunção mitocondrial, entre outros (Mukherjee et al., 1998; Rosen et al., 2001; Folmer et al., 2002; Brownlee, 2005).

#### 1.3.1 Aumento do fluxo da via do poliol

A aldose redutase é uma enzima citosólica que catalisa a redução de vários compostos carbonílicos, como por exemplo, a glicose é convertida em sorbitol utilizando NAD(P)H como cofator (Figura 7). Esta enzima possui baixa afinidade (alto  $K_m$ ) pela glicose em condições de normoglicemia e o metabolismo da glicose por esta via ocorre em quantidades muito pequenas. Em condições de hiperglicemia o sorbitol é formado em excesso com concomitante diminuição de NAD(P)H. O sorbitol formado é oxidado a frutose pela enzima sorbitol desidrogenase com consumo de NADH (Brownlee, 2001). A frutose formada é posteriormente fosforilada a frutose-6-fosfato, a qual pode ser

metabolizada em 3-deoiglicose (3-DG), metabólito que facilita a formação de AGEs (Gonzalez et al., 1988; Szwegold et al., 1990). As consequências do aumento do fluxo metabólico da via do polioli estão representadas principalmente pela formação de altas concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs), pelo efeito osmótico do sorbitol e pela queda da relação  $\text{NAD(P)H} / \text{NAD(P)}^+$  que comprometem o metabolismo energético celular (Brownlee, 2001) (Figura 7).



**Figura 7. Mecanismos de toxicidade induzidos pela hiperglicemia.**

As setas indicam aumento das concentrações dos diferentes metabólitos e/ou proteínas. Adaptado de (Brownlee, 2001)

### 1.3.2 Aumento do fluxo da via das hexosaminas

De 2 a 5% da frutose-6-fosfato formada na via glicolítica é desviada para formar glicosamina-6-fosfato através da enzima glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase (Figura 7). O produto final desta via é o intermediário UDP-*N*-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), o qual é utilizado por reações celulares como, por exemplo, a síntese de proteoglicanas e a formação de *O*-glicoproteínas (Brownlee, 2001; Wells et al., 2001). O aumento da taxa deste metabolismo parece resultar em mudanças a nível de expressão gênica e proteica que contribuem para o desenvolvimento das complicações vasculares que ocorrem no diabetes e/ou o desenvolvimento da resistência a insulina (Marshall e Monzon, 1989; Gabriely et al., 2002). Neste sentido, foi demonstrado que o aumento de UDP-GlcNAc provocaria modificações

covalentes no fator de transcrição Sp1, o qual regula a ativação do PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio) que é um potente vasodilatador, comprometendo desta forma a fisiologia vascular (Chen et al., 1998).

### 1.3.3 Ativação da PKC

A PKC é uma família de serina / treonina quinases composta por pelo menos doze isoformas, sendo que todas são expressas no cérebro e fígado (Clarke e Dodson, 2007). A hiperglicemia parece estimular a síntese *de novo* do segundo mensageiro lipídico diacilglicerol (DAG), o que resulta na ativação da PKC, principalmente das isoformas  $\beta$  e  $\delta$  (Nishizuka, 1992; Schrijvers et al., 2004) (Figura 7). Neste contexto, tem sido demonstrado que a ativação da isoforma  $\beta$  provoca anormalidades no fluxo sanguíneo em retina e vasos renais de ratos submetidos à diabetes experimental, provavelmente por inibir a produção de óxido nítrico (ON) e/ou por aumentar a atividade da endotelina-1, potente vasoconstritor (Craven et al., 1994; Ishii et al., 1996; Ganz e Seftel, 2000). A ativação excessiva de PKC provocada pela hiperglicemia, também induz o aumento da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), aumento na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o qual promove estresse oxidativo e na expressão do PAI-1, resultando numa permeabilidade vascular aumentada e, portanto, patológica (Feener et al., 1996; Hempel et al., 1997; Pieper e Riaz ul, 1997; Williams et al., 1997).

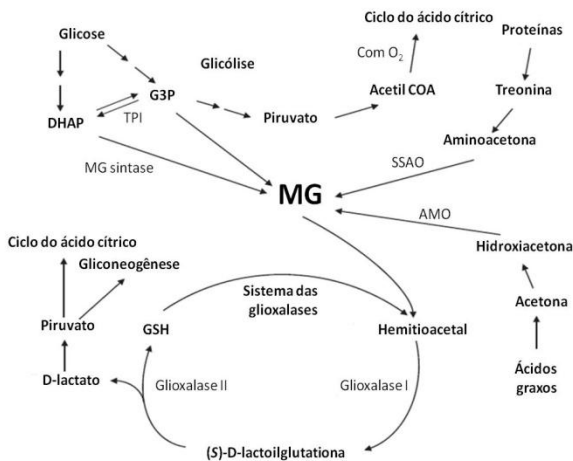
### 1.3.4 Aumento intra e extracelular de AGEs

Os AGEs são formados a partir da reação da glicose e outros açúcares redutores com grupamentos amino de proteínas, podendo ser formados tanto intra como extracelularmente (Ahmed et al., 2005). Além disso, compostos muito reativos como o metilglioxal (MG), glioxal (GO) e 3-DG, tendem a interagir reversível e irreversivelmente com proteínas, originando os AGEs (Shinohara et al., 1998) (Figura 7).

#### 1.3.4.1 Formação de MG

O Metilglioxal (MG) é um aldeído,  $\alpha,\beta$ -dicarbonila, eletrofílico e altamente reativo formado a partir de intermediários da glicólise

(Phillips e Thornalley, 1993; Thornalley, 1996; Desai e Wu, 2007; Kalapos, 2008). Este intermediário também pode ser formado a partir de aminoacetonas (Lyles e Chalmers, 1992) e corpos cetônicos (Casazza et al., 1984), derivados do catabolismo de proteínas e oxidação de ácidos graxos, respectivamente (Figura 8). Em condições patológicas crônicas como diabetes, hipertensão, aterosclerose, bem como, em doenças neurodegenerativas, onde o estresse oxidativo parece estar envolvido na fisiopatologia destas alterações, tem sido demonstrado aumento nas concentrações plasmáticas de MG, GO e 3-DG (McLellan et al., 1994; Beisswenger et al., 1999).



**Figura 8. Formação e desintoxicação de metilglioxal (MG).** O MG pode ser formado a partir de intermediários da via glicolítica, aminoacetonas e de corpos cetônicos. A desintoxicação deste composto é realizada através das glioxalases, as quais estão presentes no citosol de todas as células. SSAO: amina oxidase sensível à ação de semicarbazida; AMO: acetol mono-oxigenase, G3P: gliceraldeído-3-fosfato, DHAP: diidroxiacetona fosfato. Adaptado de (Chang e Wu, 2006)

A formação do MG ocorre com a participação de três enzimas: a metilglioxal sintase (Hopper e Cooper, 1971), citocromo P450 2E1 (CYP 2E1) (Gonzalez, 1988) e pela amina oxidase sensível a ação de semicarbazida (SSAO) (Yu et al., 2003). A metilglioxal sintase catalisa a conversão da triose fosfato diidroxiacetona fosfato (DHAP) em MG. As enzimas CYP 2E1 (acetona e acetol monooxigenase), são

responsáveis pela conversão de acetona em MG durante a oxidação de ácidos graxos com consumo de NAD(P)H (Koop e Casazza, 1985). Outras fontes de MG envolvem dois corpos cetônicos, acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato, os quais são espontaneamente convertidos em acetona (Beisswenger et al., 2005) (Figura 8).

O MG também pode ser produzido via desaminação de aminoacetonas catalisada pela SSAO, durante o catabolismo mitocondrial dos aminoácidos L-treonina e glicina (Deng e Yu, 1999) (Figura 8). A SSAO está localizada na superfície da membrana externa e no citoplasma do tecido adiposo, células da musculatura lisa vascular (VSMCs) e em células endoteliais (Yu et al., 2003). Além disso, a SSAO também tem um papel importante no transporte de glicose para dentro dos adipócitos através do transportador GLUT4 (Enrique-Tarancon et al., 1998) e para as células musculares lisas via GLUT1 (El Hadri et al., 2002). Esta função da SSAO similar à insulina parece contribuir muito na formação de MG.

O MG é degradado pelo sistema das glioxalases presentes no citosol de todas as células. Este sistema consiste em duas enzimas, a glioxalase I e II, as quais requerem como cofator a glutatona reduzida (GSH) (Chang e Wu, 2006). O MG é primeiramente convertido irreversivelmente pela glioxalase I a (S)-D-lactoilglutatona e posteriormente em D-lactato pela glioxalase II (Figura 8). Desta forma, é evidente que o normal funcionamento do catabolismo do MG é dependente de concentrações adequadas de GSH, bem como glutatona peroxidase e glutatona redutase, situações comprometidas pelo estresse oxidativo que caracteriza o estado hiperglicêmico (Wu e Juurlink, 2002; Wang et al., 2005; Desai e Wu, 2007).

#### 1.3.4.2 Produção de AGEs

Os AGEs são um grupo de moléculas heterogêneas produzidas através da glicação endógena e 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. Se alguma destas situações está presente, as proteínas tanto intra como extracelulares são passíveis de serem glicadas e oxidadas (Baynes e Thorpe, 1999).

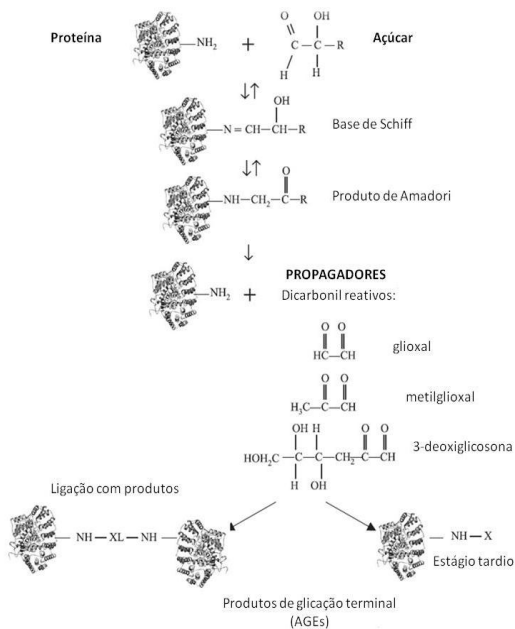
As reações de Maillard são uma complexa série de reações que envolvem açúcares redutores e proteínas, resultando em produtos oxidados conhecidos como AGEs, que ocorrem em todos os tecidos e fluídos biológicos (Thornalley, 2008) (Figura 9). Na reação não

enzimática inicial, a glicose e/ou outros açúcares redutores como a frutose, pentose, galactose, manose, xilulose, reagem com um grupamento amino livre de várias moléculas incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, formando compostos aldimina instáveis, chamados bases de Schiff. Esta base sofre um rearranjo molecular e origina uma cetoamina estável, chamada de produtos de Amadori (precursores de AGEs). Essa reação não requer a participação de enzimas e depende da concentração de glicose e proteínas e da meia vida das proteínas, 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).

Os produtos de Amadori são degradados através de reações de oxidação e desidratação em MG, GO, 3-DG, sendo estes mais reativos do que os açúcares que originaram o produto de Amadori, permitindo a propagação da glicação proteica não enzimática (Lapolla et al., 2005) (Figura 9). 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). Assim, os compostos dicarbonílicos (propagadores) reagem com grupamentos amino livres de proteínas através de reações de oxidação, desidratação e ciclização, denominadas de reações de Maillard, formando compostos amarelo-marrom, insolúveis e irreversíveis, chamados de produtos de glicação terminal (AGEs) (Lapolla et al., 2005; Ravelojaona et al., 2007; Zhang et al., 2009).

A formação de AGEs tem sido envolvida, além da fisiopatogenia do DM, na doença de Alzheimer (DA), aterosclerose, artrite inflamatória e catarata, entre outros (Zhang et al., 2009).





**Figura 9. Formação de produtos de glicação terminal (AGEs).** Açúcares redutores tendem a interagir com resíduos de aminoácidos livres de proteínas, formando bases de Schiff. Estas sofrem um rearranjo molecular e originam os produtos de Amadori, os quais podem ser degradados e dar origem a compostos dicarbonílicos como o metilgloixal (MG), gloixal (GO) e 3-deoxiglicosona (3-DG). Estes compostos, por sua vez, reagem com grupamentos amino livres de proteínas, formando compostos insolúveis e irreversíveis chamados de produtos de glicação terminal (AGEs). Adaptado de (Lapolla et al., 2005)

#### 1.4 NEOVASCULARIZAÇÃO ASSOCIADA A HIPERGLICEMIA

O VEGF é um componente crítico no crescimento tecidual e processos de reparo como angiogênese (crescimento de novos vasos a partir de vasos já existentes) e vasculogênese (formação de novos vasos). Além de desempenhar um papel central no desenvolvimento das complicações microvasculares, em particular da retinopatia diabética, este peptídeo é também um potente vasodilatador que favorece a sobrevivência de células endoteliais (Ferrara, 2001; Pandya et al., 2006;

Simo et al., 2006). O VEGF facilita a permeabilidade à água e proteínas de alto peso molecular, promovendo reparo tecidual e remodelamento extracelular (Bates e Harper, 2002; Akhavani et al., 2007). No entanto, o aumento da permeabilidade vascular associado à angiogênese contribui para complicações microvasculares que ocorrem no DM, tornando-se este um processo patológico (Bates e Harper, 2002; Simo et al., 2006).

Em um estado isquêmico durante o diabetes, o VEGF e seus receptores são regulados positivamente pelo fator induzível de hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) (Ferrara, 2001; Semenza, 2003), e estimulados direta e indiretamente por citocinas e mediadores moleculares como interleucina1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), PKC, AGEs, EROs, fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) e fatores de crescimento similares a insulina (IGFs) (Schrijvers et al., 2004; Pandya et al., 2006).

Pacientes diabéticos com retinopatia diabética proliferativa ou edema macular diabético (DME) possuem níveis elevados de VEGF intraocular tanto no vítreo como no fluido aquoso (Tanaka et al., 1997; Duh e Aiello, 1999), os quais estão relacionados com a presença e severidade da doença (Aiello et al., 1994; Burgos et al., 1997; Adamis et al., 2006). Este acúmulo de VEGF no vítreo contribui significativamente para neovascularização intraocular. Além disso, já foi demonstrado que o VEGF encontra-se duas vezes aumentado na retina de ratos hiperglicêmicos (Chou et al., 2002) e em plasma de pacientes com hipertensão (Tsai et al., 2005).

O VEGF e seu receptor do tipo tirosina quinase são essenciais para o adequado funcionamento dos túbulos renais. No entanto, elevados níveis de VEGF podem favorecer o desenvolvimento de proteinúria, característica bioquímica do DM por aumentar a permeabilidade glomerular (Lee et al., 2006).

O aumento na expressão de VEGF tem sido também sugerido como um componente da fisiopatologia das alterações do sistema nervoso central no DM. Neste sentido, o VEGF em condições normoglicêmicas e fisiológicas parece favorecer a neurogênese através de efeitos neurotróficos e angiogênicos (Le Bras et al., 2006). No entanto, em condições de hiperglicemia, a vasculogênese excessiva parece estar vinculada à formação de pequenos vasos e à indução de microinfartos cerebrais (Kalaria, 2002).

## 1.5 MECANISMOS DE NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADOS A HIPERGLICEMIA

A neurotoxicidade induzida pela hiperglicemia persistente parece estar relacionada com a interação entre os quatro processos deletérios para a célula mencionados anteriormente (item 1.3). Estes processos, aumento nas vias de formação de polióis, hexosaminas e AGEs, e ativação excessiva da PKC, estão intimamente vinculados com a produção de estresse oxidativo. Neste cenário, todos os tecidos são susceptíveis ao dano oxidativo. No entanto, o cérebro parece ser especialmente sensível a este tipo de lesão. Uma razão importante para isso seria o alto consumo de oxigênio apresentado por este tecido. Além disso, as membranas neuronais apresentam grande quantidade de lipídeos poli-insaturados, altamente susceptíveis a peroxidação lipídica. Ainda, a auto-oxidação de muitos neurotransmissores, como por exemplo, dopamina e noradrenalina, gera EROs, sendo que esta geração pode ser acelerada pela presença de ferro, metal amplamente distribuído no cérebro. Finalmente, o tecido cerebral apresenta um baixo nível de defesas antioxidantes quando comparado com outros tecidos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo que é definido como o desequilíbrio entre a produção de EROs e a habilidade das células em inativar estas espécies (Halliwell, 1991) tem sido envolvido na fisiopatogenia do DM, bem como, nas doenças neurodegenerativas. Estas doenças de início insidioso e de desenvolvimento crônico podem ser definidas como um grupo de alterações heterogêneas caracterizadas por achados neuropatológicos associados à degeneração em uma área específica do cérebro. A DA, por exemplo, é a desordem neurodegenerativa mais comum e é caracterizada pela perda de neurônios no córtex e hipocampo, combinada com duas lesões cerebrais: acúmulo de placas senis compostas de  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) e emaranhados neurofibrilares (Ott et al., 1995; Cotter, 2007; Kester e Scheltens, 2009). O peptídeo  $\beta$ -amilóide interage com os RAGEs, que são os receptores dos AGEs extracelulares, e parece contribuir na fisiopatologia da neuropatia diabética através da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, promovendo a transcrição patológica de vários genes relacionadas com estresse oxidativo (Yan et al., 1996). Desta forma, parece existir uma relação entre hiperglicemia, formação de AGEs e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas crônicas. A hiperglicemia, a qual é a maior característica bioquímica do diabetes possui efeitos tóxicos nos neurônios do cérebro através de insultos osmóticos e estresse oxidativo, devido a formação de AGEs. Além disso, o diabetes está associado com

o aumento da liberação de citocinas inflamatórias, e o excesso de processo inflamatório formado, torna-se neurotóxico (Umegaki, 2010).

Alguns mecanismos fisiopatológicos são descritos para explicar a associação entre o DM e demência. Indivíduos hiperglicêmicos apresentam alto risco de desenvolver demência através da doença cerebrovascular isquêmica (Biessels et al., 2006). Isto porque o DM do tipo II pode desencadear vários fatores de risco em pacientes idosos, como a resistência a insulina, obesidade e hipertensão, fatores estes que constituem a síndrome metabólica e predis põem a doença cerebrovascular (Kuusisto et al., 1997; Kalmijn et al., 2000; Yaffe et al., 2004; Whitmer et al., 2005). Como já foi mencionado, os AGEs produzidos intracelularmente causam diferentes danos celulares, *i*) proteínas intracelulares são modificadas covalentemente por propagadores de AGEs, tendo sua atividade alterada (Giardino et al., 1994); *ii*) proteínas que participam da endocitose de macromoléculas também são modificadas por AGEs (Shinohara et al., 1998); *iii*) a formação dos AGEs causa interação anormal de proteínas da matriz extracelular com outras proteínas de matriz e integrinas (Brownlee, 2001), resultando na diminuição da elasticidade dos vasos de animais hiperglicêmicos (Huijberts et al., 1993); *iv*) proteínas plasmáticas modificadas por AGEs produzem ligantes que podem interagir nos receptores RAGEs, em células endoteliais (Yan et al., 1994) com indução do NF- $\kappa$ B (Schmidt et al., 1995; Abordo et al., 1996).

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 (Williams et al., 1982; Cullum et al., 1991; Pekiner et al., 1993; Ryle et al., 1997).

### 1.5.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos, que contêm um elétron não pareado em sua órbita mais externa, sendo formados durante várias reações metabólicas. Dentre eles encontram-se o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e o radical peroxil ( $RO_2^{\cdot}$ ). Também há a formação de espécies não radicalares, como o peróxido de

hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso ( $HClO$ ), todos sendo denominados como EROs. Existem também as espécies reativas de nitrogênio, as quais são produzidas em rotas similares as dos EROs e incluem o radical ON e os não radicais peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), óxido nitroso ( $N_2O$ ) e o peroxinitrito alcalino ( $RONOO$ ) (Cadenas, 1989; McCord, 2000; Desai et al., 2010).

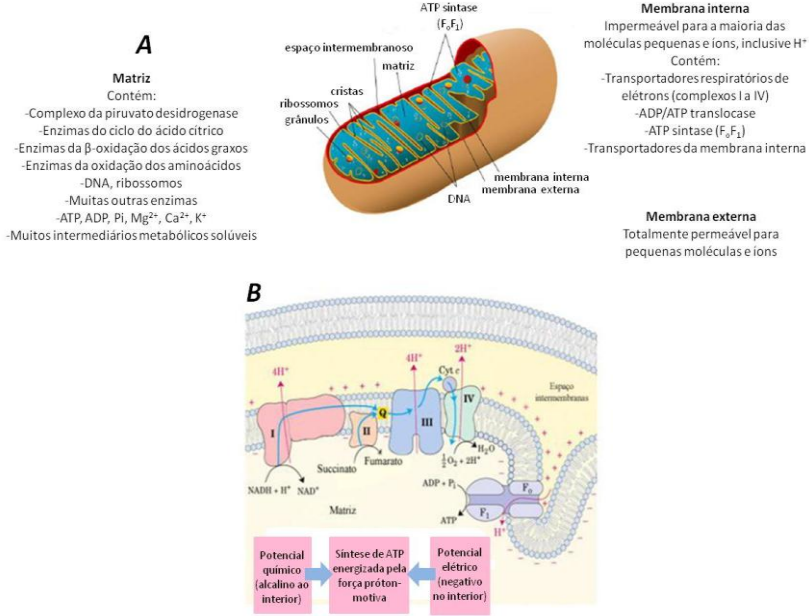
A geração de EROs nem sempre é prejudicial ao organismo, pelo contrário, é necessária em vários processos biológicos: sinalização celular, contração muscular e sistema imune (Kaneko et al., 2001). O problema é quando os níveis totais de EROs forem maiores que a capacidade de defesa, podendo ocorrer danos celulares significativos.

A mitocôndria é o principal local de produção de EROs em condições fisiológicas (Chance et al., 1979; Sipos et al., 2003). Os complexos I e III da cadeia respiratória são os principais geradores de EROs. No complexo I, o superóxido é liberado para a matriz mitocondrial, já no III a liberação pode ser tanto na matriz, no espaço intermembranas e no espaço extramitocondrial (Han et al., 2001; St-Pierre et al., 2002). Para contrabalancear a produção de EROs, a mitocôndria possui sistemas de defesa antioxidante, como as enzimas manganês superóxido dismutase (Mn-SOD), peroxiredoxinas, o sistema glutationa peroxidase/glutationa redutase, a coenzima  $Q_{10}$  (ubiquinona), creatina e nicotinamida (Okado-Matsumoto e Fridovich, 2001; Droge, 2002; Fernandez-Checa, 2003; James et al., 2004; Kojo, 2004). Mais recentemente, foi demonstrado que algumas quinases mitocondriais como a hexoquinase (HK) e a creatinaquinase (CK), possuem um papel essencial como antioxidantes mitocondriais (Dolder et al., 2003; Santiago et al., 2008). Esta atividade parece estar relacionada com a capacidade de modular o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ), pois quanto maior o valor do  $\Delta\psi$ , maior é a probabilidade de formar EROs. Sabe-se ainda, que a taxa de produção de EROs é inversamente proporcional à disponibilidade de ADP intramitocondrial (Korshunov et al., 1997; Cadenas e Davies, 2000). A excessiva produção de EROs pode também induzir a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados de membrana, muito concentrados no SNC, levando a múltiplos produtos tóxicos de peroxidação lipídica (Poli e Schaur, 2000).

### 1.5.2 Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela celular responsável pela maior produção líquida de energia, a qual contém proteínas envolvidas com a oxidação de nutrientes bem como com a respiração celular com

concomitante geração de energia (Lehninger e Smith, 1949; Kennedy e Lehninger, 1950, 1951). Esta organela possui uma estrutura basicamente membranosa, sendo envolvida por duas membranas, a membrana externa e a membrana interna, ambas com composição química e estrutural semelhante ao plasmalema.



**Figura 10. Anatomia bioquímica da mitocôndria (A) e proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (B)** (Adaptado de (Lehninger et al., 2004)

A membrana externa é mais permeável que a membrana interna. O espaço entre estas membranas é denominado espaço intermembranoso, onde ocorrem reações essenciais ao metabolismo celular. A membrana interna é formada por pregas que se expandem no espaço intramitocondrial (matriz mitocondrial) denominadas cristas mitocondriais (Lehninger et al., 2004) (Figura 10).

A maquinaria molecular desta organela compreende enzimas presentes na matriz mitocondrial (ciclo de Krebs) e proteínas organizadas na membrana mitocondrial interna (cadeia transportadora

de elétrons ou cadeia respiratória). Os genomas nuclear e mitocondrial são responsáveis por codificar os complexos protéicos envolvidos na formação de energia e respiração celular (Di Donato, 2000).

### 1.5.3 Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa

A cadeia respiratória (CR) é composta por uma orquestra de cinco complexos enzimáticos distribuídos de forma especial na membrana mitocondrial interna. Os elétrons oriundos do NADH e do  $\text{FADH}_2$  vindos do ciclo de Krebs e de outras reações catalisadas por desidrogenases são transferidos para a CR, tendo o oxigênio molecular comoceptor final. Junto a este processo, ocorre a translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna e a síntese endergônica de ATP, empregando como força motriz a energia armazenada como gradiente eletroquímico de prótons (Babcock e Wikstrom, 1992; Voet e Voet, 1995). A maior parte das proteínas que constituem cada complexo se encontram embebidas na membrana mitocondrial interna, possuindo vários grupamentos prostéticos com potencial de oxi-redução sucessivamente maiores (Voet e Voet, 1995; Di Donato, 2000).

Os elétrons que provém principalmente da glicólise e do ciclo de Krebs são doados através do NADH e entram pelo complexo I (NADH – Coenzima Q redutase), o qual transfere estes elétrons para a coenzima Q (CoQ), também chamada de ubiquinona. Este complexo é o maior componente proteico presente na membrana mitocondrial interna e é formado por sete unidades codificadas pelo DNA mitocondrial e pelo menos por 34 subunidades codificadas pelo DNA nuclear (Voet e Voet, 1995; Di Donato, 2000; Sivitz e Yorek, 2010). O Complexo I possui uma molécula de flavina mononucleotídeo (FMN) como grupamento prostético e de seis a sete centros ferro-enxofre, os quais participam da transferência de elétrons. O NADH é capaz de transferir dois elétrons, e a FMN e CoQ são capazes de aceitar um ou dois elétrons de cada vez, pois suas formas semiquinonas são estáveis.

O complexo II (Succinato – Coenzima Q redutase) é composto por quatro subunidades proteicas, dentre elas a enzima dimérica succinato desidrogenase, componente do ciclo de Krebs, todas codificadas pelo DNA nuclear. Neste complexo, os elétrons providos do  $\text{FADH}_2$  são doados para a CoQ. Estão presentes um FAD covalentemente ligado à succinato desidrogenase, dois centros ferro-enxofre e um citocromo  $b_{560}$  (Voet e Voet, 1995; Di Donato, 2000).

Os elétrons provindos da CoQ são transferidos para o carreador móvel de elétrons, o citocromo *c* através do Complexo III (Coenzima Q – Citocromo *c* redutase). Este complexo está arranjado assimetricamente na membrana mitocondrial interna contendo 11 subunidades, onde três delas contém centros redox utilizados na geração de energia. Estas três unidades chaves estão representadas pelo citocromo *b*, único codificado pelo genoma mitocondrial, um centro ferro-enxofre e o citocromo *c*<sub>1</sub> (Saraste, 1990).

O Complexo IV (Citocromo *c* oxidase) é o último complexo da cadeia transportadora de elétrons, onde estes são transferidos do ferrocitocromo *c* para o oxigênio molecular. Este complexo consiste de doze ou mais subunidades polipeptídicas (Barrientos et al., 2002). O centro catalítico da enzima é formado por três subunidades maiores e são codificadas pelo DNA mitocondrial. A subunidade I contém grupamentos heme e um dos íons Cu (Cu<sub>B</sub>), e a subunidade II contém um centro de Cu binuclear (Cu<sub>A</sub>) (Capaldi, 1990). A subunidade III não apresenta grupamento prostético e não parece estar envolvida na síntese de ATP, apenas favorece a estabilidade estrutural. As demais subunidades, codificadas pelo DNA nuclear, não parecem ser essenciais ao mecanismo catalítico básico de redução de oxigênio e à transferência vetorial de prótons (Saraste, 1990; Barrientos et al., 2002). A reação redox entre o citocromo *c* e o oxigênio molecular é irreversível, sendo a citocromo *c* oxidase uma enzima chave na produção de energia (Poyton e McEwen, 1996).

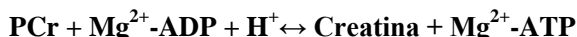
O complexo V ou ATP sintase é responsável pela síntese de ATP, sendo formado por duas subunidades codificadas pelo DNA mitocondrial (ATPase 6 e 8) e pelo menos por doze subunidades codificadas pelo DNA nuclear. É formado por um componente catalítico solúvel localizado na matriz mitocondrial (F<sub>1</sub>-ATPase) e um componente de membrana hidrofóbico (F<sub>0</sub>-ATPase) o qual contém um canal de prótons e é sensível ao antibiótico oligomicina (Saraste, 1990).

Os complexos transmembrana I, III e IV, além de participar da transferência de elétrons na CR, possuem a capacidade de bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, formando um gradiente eletroquímico. Este gradiente determina uma polarização da membrana mitocondrial interna, que pode ser revertida pelo fluxo desses prótons através do componente F<sub>0</sub> da ATP sintase. O fluxo de prótons leva à condensação do ADP e de fosfato inorgânico em ATP (Saraste, 1990; Wallace, 1999). A ATP sintase é uma enzima funcionalmente reversível que pode catalisar tanto a síntese quanto a hidrólise de ATP (Saraste, 1990).



### 1.5.4 Creatinaquinase (CK)

Em células que apresentam um elevado metabolismo energético, a CK cataliza a transferência reversível de um grupamento *N*-fosforibosil entre fosfocreatina (PCr) e ADP, fornecendo um sistema eficaz de tamponamento do ATP (Bessman e Carpenter, 1985; Bittl e Ingwall, 1985).



Esse fenômeno pode explicar a habilidade dos tecidos cardíaco, muscular e cerebral em alternar a velocidade de consumo de energia durante os períodos de maior atividade, pois a velocidade desta reação excede em magnitude a velocidade de síntese de ATP celular (Bittl e Ingwall, 1985; Saks et al., 1996b; Saks et al., 1996a).

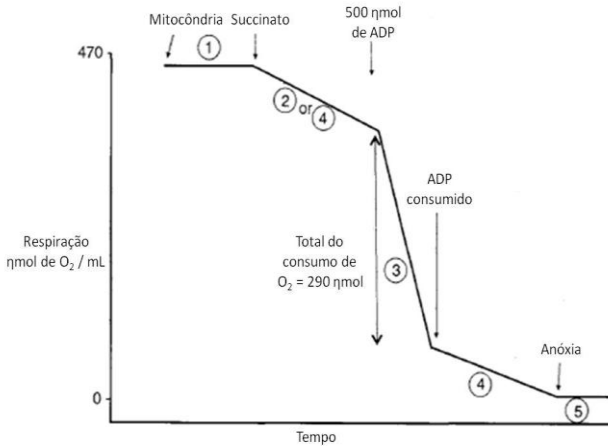
### 1.5.5 Estágios da respiração mitocondrial

A quantificação dos estágios da respiração mitocondrial foram inicialmente definidos por Chance e Williams como a base do controle respiratório celular (Chance et al., 1973). Estes índices fisiológicos poderiam ser explicados como o resultado do transporte de elétrons, oriundos principalmente, mas não exclusivamente do NADH e do FADH<sub>2</sub>, através de um sistema convergente, e não linear como usualmente caracterizado nos diferentes livros de texto sobre Bioquímica, acoplado à síntese de ATP (Gnaiger, 2007). O controle da respiração mitocondrial pode ser identificado experimentalmente através da identificação dos diferentes estágios respiratórios em suspensões mitocondriais empregando o tradicional eletrodo de Clark (Chance et al., 1973) (Figura 11). De acordo com Nicholls e Ferguson (2001), as diferentes fases da respiração mitocondrial são denominadas da seguinte forma:

- estágio I: consumo de oxigênio gerado pela presença de suspensões mitocondriais no eletrodo de Clark, e na presença de fosfato inorgânico (P<sub>i</sub>);
- estágio II: consumo de oxigênio *basal* na presença de mitocôndrias energizadas com substratos metabólicos, como

por exemplo, succinato, e na ausência de ADP; fase não fosforilante;

- estágio III: consumo de oxigênio *estimulado* pela adição de uma quantidade conhecida de ADP; fase fosforilante;
- estágio IV: consumo de oxigênio retorna ao estado *basal* após ter consumido todo o ADP acrescido no estágio III, dessa forma, esta fase é equivalente ao estágio II;
- estágio V: sistema onde não há oxigênio dissolvido.



**Figura 11. Estágios de respiração mitocondrial.** O estágio II de respiração mitocondrial foi estimulado pela adição de succinato. A alta taxa de consumo de oxigênio foi induzida pela adição de uma quantidade conhecida de ADP (500 nmol). Adaptado de (Nicholls e Ferguson, 2001)

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho visa o melhor entendimento do efeito do controle estrito da glicemia pela administração de insulina sobre o metabolismo oxidativo celular em animais que desenvolveram hiperglicemia pela administração de estreptozotocina. Ainda pretende-se investigar os efeitos induzidos pela exposição de sistemas *in vitro* a concentrações crescentes de proteínas oxidadas por derivados de glicose.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar o modelo animal de hiperglicemia induzido pela administração intraperitoneal de estreptozotocina em ratos Wistar;
- b) Identificar a dose de insulina mais adequada para normalizar as concentrações de glicemia destes animais hiperglicêmicos;
- c) Investigar o efeito *in vivo* da hiperglicemia crônica sobre parâmetros do metabolismo energético e estresse oxidativo em cérebro, olhos e tecidos periféricos de ratos hiperglicêmicos e de animais que tiveram a glicemia normalizada através da administração de insulina exógena;
- d) Sintetizar AGEs através da incubação de albumina sérica bovina e metilglioxal (MG-BSA) e caracterizar o grau de oxidação deste composto através da detecção de aminoácidos livres não oxidados, formação de compostos de Maillard (precursores de AGEs), formação de proteínas carboniladas e a quantidade de proteínas totais;
- e) Investigar o efeito *in vitro* de MG-BSA sobre a cadeia respiratória em preparações mitocondriais de músculo esquelético e fígado de ratos Wistar; sobre parâmetros de estresse celular em células da linhagem MIO-M1 humana de retina e sobre respiração celular em fibroblastos de pele de rato.

### 3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O DM é uma doença que representa um dos principais problemas de ordem mundial, tanto em número de pessoas afetadas quanto na incapacidade para o trabalho, sendo que para o ano de 2030 está previsto que 366 milhões de indivíduos estejam acometidos por esta síndrome.

Embora muitos estudos vêm sendo realizados para melhor entender a fisiopatologia do DM, ainda pouco se sabe sobre a relação entre a hiperglicemia crônica, o efeito do controle estrito da glicemia por administração de insulina e o impacto destes sobre o metabolismo oxidativo em nível molecular. Neste sentido, recentemente foi demonstrado que a hiperglicemia pode modular negativamente a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, e esse efeito persiste, ainda que as concentrações de glicose sanguínea sejam normalizadas. A partir deste e outros dados da literatura, principalmente baseados em *trials* clínicos, surge o conceito de memória metabólica, o qual suporta a idéia de que o controle hiperglicêmico nos estágios mais precoces seria crucial para prevenir as complicações desenvolvidas nos estágios mais avançados da doença.

Neste contexto, o presente estudo pretende contribuir para a identificação de marcadores do metabolismo oxidativo, tanto periféricos como do sistema nervoso central, em um modelo crônico de hiperglicemia induzido pela administração de estreptozotocina. Assim, o melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos durante a hiperglicemia crônica representará um avanço para a descoberta de estratégias terapêuticas eficazes que consigam prevenir ou atenuar as severas complicações decorrentes desta enfermidade.

Contudo, este estudo suporta a hipótese de que os altos níveis de glicose sanguínea possam modular alguns marcadores de neurodegeneração e/ou neovascularização em função do tempo de exposição à hiperglicemia e que a administração de insulina exógena talvez possa reverter, atenuar ou ainda prevenir estes processos, os quais possivelmente tornam-se mais evidentes ao longo do tempo, sendo responsáveis pelas complicações vasculares características desta doença.

## 4 MATERIAL, DESENHO EXPERIMENTAL E MÉTODOS

### 4.1 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

#### 4.1.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza PA.

#### 4.1.2 Animais

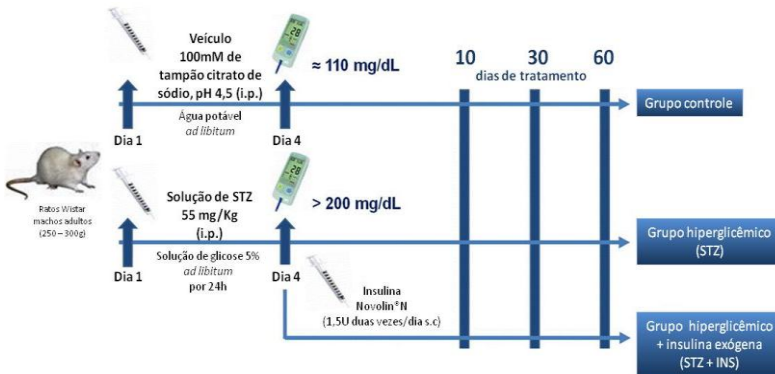
Foram utilizados ratos Wistar machos de 60 dias de vida pesando entre 250-350g provindos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram aclimatados no Biotério Setorial do Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo (Nº cadastro BIO040), com temperatura controlada  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , com ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram mantidos em gaiolas de plástico individuais com livre acesso à água e à ração comercial, exceto nos dias em que houve determinações de glicemia, onde permaneceram em jejum por 6 horas. Todos os procedimentos foram executados de acordo com o “Guia de Princípios para o uso de Animais em Toxicologia” adotado pela sociedade de toxicologia em Julho de 1989. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal de Santa Catarina (PP000350/CEUA).

#### 4.1.3 Modelo experimental *in vivo* de hiperglicemia

Para cada indução deste modelo foram empregados 30 animais, onde 20 animais receberam uma dose intraperitoneal de 55 mg/kg de STZ com jejum prévio de 14 horas. Os outros 10 animais receberam através da mesma via de administração, tampão citrato de sódio 0,1M pH 4,5 (animais controles; Grupo Controle). Após a indução, os animais receberam água contendo 5% de glicose durante 24 horas para evitar morte por hipoglicemia. Passado este período, receberam água da torneira e ração comercial *ad libitum*.

Quatro dias após a administração de STZ, com jejum prévio de 6 horas, a glicemia destes animais foi determinada pelo método da glicose oxidase, utilizando o auto-analisador Optium<sup>TM</sup> Xceed (Abbott) em amostras de sangue da cauda. Os animais com glicemia maior ou igual a 200 mg/dL foram considerados hiperglicêmicos e imediatamente divididos em dois grupos. Um deles permaneceu hiperglicêmico (Grupo STZ) e o outro, recebeu por via subcutânea, 1,5 UI de insulina Novolin<sup>®</sup>

N humana, duas vezes ao dia, com o objetivo de normalizar os níveis de glicose sanguínea (Grupo STZ+INS). Os animais ficaram submetidos a estas condições por 10, 30 e 60 dias como indicado no esquema 1.



**Esquema 1. Desenho experimental. Desenvolvimento de hiperglicemia pela administração de streptozotocina (STZ) em ratos Wistar adultos.** Para detalhes ver M&M.

#### 4.1.4 Preparação das amostras para análise de parâmetros bioquímicos

Para a mensuração da atividade dos complexos da cadeia respiratória, o cérebro e tecidos periféricos, fígado, músculo cardíaco, músculo esquelético e rim, foram homogeneizados em dez volumes de tampão fosfato de potássio 5mM, pH 7,4, contendo sacarose 300 mM, MOPS 5 mM, EGTA 1 mM e albumina sérica bovina 0,1%. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 3.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 17.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso no mesmo tampão utilizado no processo de homogeneização, constituindo uma suspensão rica em mitocôndrias com uma concentração proteica de aproximadamente 20 mg/mL (Latini et al., 2005). Para a mensuração da atividade da CK, esta fração mitocondrial foi lavada duas vezes com tampão Tris 10 mM, pH 7,5, contendo sacarose 0,25 M e posteriormente suspensa em tampão Tris 100 mM, pH 7,5, contendo MgSO<sub>4</sub> 9 mM (Hughes, 1962).

### 4.1.5 Preparação dos tecidos para análise de parâmetros histológicos

Após o término dos diferentes tratamentos *in vivo*, os animais foram perfundidos com solução de paraformaldeído 4%. Posteriormente, o cérebro e os tecidos periféricos foram removidos, imediatamente imersos nesta solução por 24 horas (processo de fixação), e desidratados em série alcoólica crescente (1 hora em cada solução alcoólica: 70%, 80%, 90% e 100%, este último por duas vezes). Posteriormente, as peças foram imersas em solução alcoólica contendo xilol durante vinte minutos, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina em moldes apropriados. Após solidificação, os blocos de parafina foram removidos dos moldes, aparados e acoplados ao micrótomo rotativo. Os cortes foram realizados na espessura de 6  $\mu\text{m}$ .

O olho foi retirado e imediatamente imerso em paraformaldeído 4% (diluído em PBS 10mM pH 7,4), e permaneceu overnight a 4°C. Após, foi colocado em soluções de concentração crescente de sacarose (10%, 20% e 30%), e mantido a 4°C, durante 5 horas. O órgão permaneceu em solução de 30% de sacarose, a 4°C, até o corte em criostato, o qual é realizado entre 8 e 12  $\mu\text{m}$ . Após a montagem das lâminas, estas permanecem a 4°C. A formação de neovasos foi verificada através de marcação com GSA-lectina, e o estresse celular através de imunohistoquímica para GFAP.

#### 4.1.5.1 Marcação para GSA-lectina

Anterior ao início da técnica, as lâminas foram colocados para aclimação a temperatura ambiente, por aproximadamente 10 minutos. Após este passo, as lâminas foram fixadas com paraformaldeído a 4%, por 30 minutos. As lâminas então foram lavadas com TBS pH 7,6 (tampão contendo Tris-HCl 0,05 M e cloreto de sódio 150 mM) por 10 minutos. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com uma solução de metanol frio e peróxido de hidrogênio (40:1), durante 10 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS para retirada desta solução. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com soro normal suíno a 10% (diluído em TBS), por 30 minutos. As lâminas foram incubadas com GSA-lectina (lectina biotinizada, utilizou-se esta diluída em 20 volumes de soro normal suíno), em câmara úmida, a 4°C, overnight. Após este período, as lâminas foram lavadas em TBS, por 10 minutos, duas vezes, para retirada da GSA-lectina. As lâminas foram então incubadas com HRP-Avidina D (amplificação da marcação), que foi diluída em 100 volumes de soro normal suíno a 1%, durante 30

minutos. As lâminas foram lavadas novamente por duas vezes em TBS por 10 minutos, para retirar a HRP-Avidina D. Utilizou-se DAB (diaminobenzidina) para revelação da marcação, por aproximadamente dois minutos, e a reação foi terminada com água. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina, esperou-se sua secagem, e cobriu-se os cortes utilizando-se entelan e lamínula (Werdich et al., 2004).

#### 4.1.5.2 Marcação para GFAP

As lâminas foram aclimatadas a temperatura ambiente, os cortes foram fixados em paraformaldeído a 4% e lavadas com PBS pH 7,6 (tampão fosfato-salina). O tecido foi permeabilizado utilizando-se metanol absoluto frio, por sete minutos. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio e, após, as lâminas foram lavadas com PBS por 10 minutos. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com albumina sérica caprina a 2%, diluída em PBS, por 20 minutos. O anticorpo anti-GFAP foi diluído em 100 volumes de albumina sérica caprina a 1%. A incubação com este foi realizada em câmara úmida, a 4°C, overnight. As lâminas foram lavadas por três vezes com PBS, para retirada do anticorpo primário. Os cortes foram então biotinilados (a biotina sofre interação com proteínas, portanto, liga-se ao anticorpo primário), utilizando-se o reagente “link” do kit Dako, durante 30 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS para retirada desta solução. Foi aplicado então o outro reagente do kit Dako, o “label”, que seria uma solução de estreptavidina (para amplificação), durante 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas três vezes com PBS, por 10 minutos. Após, incubadas com DAB, por dois minutos aproximadamente. A reação foi terminada com água, os cortes foram corados com hematoxilina, e para retirar o excesso desta, as lâminas foram postas novamente em água. Após a secagem, as lâminas foram montadas com lamínula e entelan (Brozzi et al., 2009).

## 4.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

### 4.2.1 Síntese de AGEs

Os AGEs foram sintetizados a partir da exposição de albumina sérica bovina (BSA) a MG.



#### 4.2.1.1 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 em duas concentrações, 100 mM e 1 mM (MG-BSA<sub>high</sub> e MG-BSA<sub>low</sub>, respectivamente) em tampão fosfato de sódio 100 mM, 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 -86°C (Westwood et al., 1994).

#### 4.2.2 Preparação dos homogeneizados para determinação de parâmetros bioquímicos

Para a mensuração da atividade dos complexos da cadeia respiratória *in vitro*, o músculo e o fígado foram homogeneizados em dez volumes de tampão fosfato de potássio 5mM, pH 7,4, contendo sacarose 300 mM, MOPS 5 mM, EGTA 1 mM e albumina sérica bovina 0,1%. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 3.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 17.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso no mesmo tampão utilizado no processo de homogeneização, constituindo uma suspensão rica em mitocôndrias com uma concentração protéica de aproximadamente 20 mg/mL (Latini et al., 2005). Estes homogeneizados foram utilizados para incubar as mitocôndrias isoladas com diferentes concentrações de MG-BSA.

#### 4.2.3 Preparação e manutenção de cultura de células

##### 4.2.3.1 Cultura primária de fibroblastos

Fibroblastos foram isolados de biópsia de pele da região dorsal de ratos Wistar fêmeas com um dia de vida, empregando a técnica de explantos (Keira et al., 2004). As células foram cultivadas em meio Eagle's com modificação de Dubelcco (DMEM) contendo 100 IU/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de streptomina, 0,25 µg/mL de anfotericina, 5,5 mM de D-Glicose, 2% de glutamina, 0,22% de NaHCO<sub>3</sub> e 0,47% de HEPES, suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SBF), 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 semeadas em placas de 24 poços ( $10 \times 10^3$  células / poço). Após a confluência, o meio foi trocado por DMEM contendo 0,5% de soro, com a presença de AGE-MG<sub>low</sub> e <sub>high</sub> nas concentrações (0,01 – 1 mg/mL).

#### 4.2.3.2 Cultura de linhagem MIO-M1 humana

As células de Müller são células gliais radiais similares aos astrócitos que se estendem através da retina. Possuem a capacidade de estabilizar a arquitetura retinal fornecendo suporte estrutural e metabólico para neurônios e vasos sanguíneos da retina (Newman e Reichenbach, 1996; Limb et al., 2002).

As células cresceram em meio DMEM contendo 100 IU/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de streptomomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina, 5 mM de D-glicose e suplementadas com 10% 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 / EDTA e semeadas em placas de 24 poços ( $10 \times 10^3$  células / poço). Após atingirem a confluência de 80%, o meio foi trocado por DMEM contendo 0,5% de SFB e as células foram incubadas com MG nas seguintes concentrações (0-1000µM) por 8 horas.

##### 4.2.3.2.1 Análise por Western Blotting

Após o período de incubação descrito acima, os extratos celulares foram preparados utilizando tampão de lise contendo 10 mM de tampão fosfato salina, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,5% de desoxicolato de sódio, 0,1% de Nonidet P-40 (octilfenoxi-polietoxietanol) e submetidos à eletroforese em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida (10%), sendo posteriormente transferidos para a membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond<sup>TM</sup>-C Extra). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado (5%) por 1 hora e posteriormente incubada com o anticorpo primário anti-GFAP (diluição 1:100) por 12 horas a 4°C. A visualização das proteínas foram realizadas utilizando o anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase (diluição 1:2.500) por 1 hora (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e as bandas com reatividade anti-GFAP foram visualizadas através do uso de kit de quimiluminescência (Amersham EDL Plus<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents) e filme radiográfico (Amersham Hyperfilm EDL), segundo recomendações do fabricante (Caceres et al., 2010).

## 5 RESULTADOS

O presente trabalho resultou na confecção de dois manuscritos, os quais estão em processo de submissão à periódicos científicos e listados abaixo:

Manuscrito 1: *“Increased mitochondrial creatine kinase activity as a compensatory effect for the severe tissue energy deficits elicited in streptozotocin-induced hyperglycemic rats”*, o qual será submetido à “Diabetes”.

Manuscrito 2: *“Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related mitochondrial bioenergetics alterations: involvement of advanced glycosylated end products”*, o qual foi submetido à BBA - Molecular Basis of Disease.

Além disso, resultados preliminares são demonstrados nesta seção.

## 5.1 MANUSCRITO 1

***“Increased mitochondrial creatine kinase activity as a compensatory effect for the severe tissue energy deficits elicited in streptozotocin-induced hyperglycemic rats”***, o qual será submetido à “Diabetes”.

**Increased mitochondrial creatine kinase activity as a compensatory effect for the severe tissue energy deficits elicited in streptozotocin-induced hyperglycemic rats**

Aline Pertile Remor<sup>1</sup>, Filipe José de Matos<sup>1</sup>, Viviane Glaser<sup>1</sup>, Karina Ghisoni<sup>1</sup>, Claudia Pinto Figueiredo<sup>2</sup>, Virgínia Cielo Rech<sup>3</sup>, Clóvis Milton Duval Wannmacher<sup>4</sup>, Andreza Fabro de Bem<sup>1</sup>, Alexandra Latini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis / SC, Brazil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis / SC, Brazil

<sup>3</sup>Centro Universitário Franciscano, UNIFRA, Santa Maria / RS, Brazil

<sup>4</sup>Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade de Rio Grande do Sul, Porto Alegre / RS, Brazil

\*Corresponding author: Alexandra Latini  
Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo  
Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Florianópolis / SC, Brazil  
Tel: + 55 48 37214743  
Fax: +55 48 37219672  
E-mail: alatini@ccb.ufsc.br

## Abstract

**Objective:** Hyperglycemia appears to be the triggering factor in inducing debilitating vascular pathologies, including neuropathies, in diabetic patients. This study aimed to investigate the effect of long-term insulin administration on tissue energetics in streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic rats.

**Research Design and Methods:** The activities of key energy metabolism enzymes, oxygen consumption, oxidative stress, and apoptotic parameters were measured in CSF, blood, brain and/or peripheral tissues from STZ-treated rats (single intraperitoneal injection of 55 mg / kg). In addition, in order to evaluate the effect of the tight glucose control, these parameters were also assessed in rats receiving insulin (1.5UI Novolin<sup>®</sup> N insulin, twice a day). The animals remained in this conditions during ten or 60 days.

**Results:** A marked energy deficiency was observed in brain of STZ-animals as shown by the significant reduction in the activities of the electron transfer chain complexes I-IV and increased succinate-stimulated respiring state IV in STZ-rats. This impaired energetics was associated with increased creatine kinase activity, which was also confirmed in peripheral STZ-tissues, where it was also found altered hexokinase activity (increment in skeletal muscle and reduction in the liver). Additionally, systemic oxidative stress was evidenced by increased blood lipid peroxidation and reduced levels of free thiols, and low concentration of CSF BH4.

**Conclusions:** This study demonstrated increased creatine kinase activity as a possible compensatory mechanism induced by severe energy deficit in STZ-rats. This could be related to the debilitating neuropathy observed in diabetic individuals, including hypersensitivity to stress, increased risk of stroke, dementia and cognitive impairment.

**Keywords:** streptozotocin, electron transfer chain, creatine kinase, brain energy deficiency

## 1 INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a common disease that features a state of chronic hyperglycemia and is one of the leading causes of morbidity and mortality in developed countries. DM affects more than 124 million individuals, and it is estimated that 300 million people worldwide will suffer the disease by 2025 (Wild et al. 2004).

Persistent hyperglycemia in uncontrolled diabetes is known to provoke specific microvasculature pathology in the retina, renal glomerulus and peripheral nerves. As a consequence of these microvascular complications, DM causes blindness, kidney failure and a variety of debilitating neuropathies (Vinik et al. 2003; Boulton et al. 2005; Gross et al. 2005; American Diabetes Association 2010). The microvascular dysfunctions predisposes to the development of DM macrovascular pathology (Camici and Crea 2007), which is characterized by DM-accelerated atherosclerosis, which in turn leads to increased risk of myocardial infarction, stroke and limb amputations affecting, therefore, nearly every organ in the body (Wei et al. 1998; Brem et al. 2006). Thus, these alterations lead to high mortality, especially in those people aged less than 40 years (Nathan et al. 2005; Orchard and Costacou 2010). In line with this, several large randomized controlled trials have been demonstrated that early intensive glycemic control may decrease the risk of these pathologies (Reichard et al. 1993; Nathan et al. 2005).

The persistent hyperglycemia of DM results in glucose toxicity apparently by four mechanisms, including augmented polyol and hexosamine pathways, increased activation of protein kinase C isoforms and formation of advanced glycated end products (AGEs). These mechanisms seem to culminate with increased reactive oxygen species (ROS) production, protein oxidation, enzyme inactivation, changes in the antioxidant defense system and mitochondrial dysfunction (Mukherjee et al. 1998; Rosen et al. 2001; Folmer et al. 2002; Brownlee 2005). Although, all DM tissues are exposed to high levels of glucose, and therefore, to the above mentioned toxic mechanisms, the brain seems to be more sensitive to these effects, mainly by the high calcium traffic across neuronal membranes, high concentrations of neurotransmitters that are autoxidizable molecules inducing ROS formation, high levels of polyunsaturated fatty acids side-chains that easily can peroxidized and release toxic end product, including malondialdehyde, and by the modest antioxidant defenses when comparing with other organs, *e.g.* the liver (Halliwell and Gutteridge

2007). On the other side, brain cells have a constantly high glucose demands, and unlike muscle cells cannot afford anaerobic and glycolytic bursts and have a physiology that cannot accommodate episode glucose uptake under the influence of insulin. Thus, neuronal glucose uptake relies on blood glucose concentrations, and it has been demonstrated that hyperglycemia in DM results in up to fourfold increases in neuronal glucose content, leading therefore, to the condition known as glucose toxicity (Tomlinson and Gardiner 2008). In this context, epidemiological data show that the DM leads to a higher risk of developing all forms of dementia, including vascular dementia and Alzheimer's disease (AD); the latter characterized by the accumulation of aggregated proteins in the form of plaques and tangles, extensive protein and lipid oxidation, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation (Arvanitakis et al. 2004; Biessels et al. 2006). In addition, the aggregated proteins in AD are known to interact with AGEs receptors stimulating the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B, and promoting therefore, pathological transcription of several genes related to oxidative stress (Yan et al. 1996).

Therefore, in order to better understand the effect of persistent hyperglycemia on cellular energy and oxidative metabolisms, the status of key energy metabolism enzymes, oxygen consumption, oxidative stress, and apoptotic parameters were investigated in CSF, blood, brain and/or peripheral tissues of streptozotocin (STZ)-treated rats. Additionally, in order to evaluate the protective effect of the tight glucose control, these parameters were also assessed in hyperglycemic rats receiving insulin.

## **2 MATERIAL AND METHODS**

**2.1 Animals and reagents.** Male Wistar rats of 60 days of life (250-300 g) obtained from the Central Animal House of the Centre for Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, Brazil, were used in the present investigation. The animals were maintained on a 12-h light/dark cycle in a constant temperature room ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), with free access to water and protein commercial chow (Nuvital-PR, Brazil), except in the fasting periods previous to blood glucose measurements (see below). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research (PP00350/CEUA) of the Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brazil, and was carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986



(86/609/EEC). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Novolin<sup>®</sup> N insulin, which was purchased from Novo Nordisk Laboratories (Princeton, NJ, USA), fetal bovine serum from Gibco<sup>®</sup> (Carlsbad, CA, USA), primary polyclonal antibody anti-cleaved caspase-3 (Asp175) from Cell Signaling<sup>®</sup> (Danvers, MA, USA), monoclonal antibody anti-methylglyoxal from JaICA<sup>®</sup> (Fukuroi, Shizuoka, Japan), 3,3'-diaminobenzidine from DakoCytomation<sup>®</sup> (Carpinteria, CA, USA) and the rest of the chemicals (analytical grade) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

### ***2.2 Induction of hyperglycemia streptozotocin (STZ) administration.***

Hyperglycemia was induced by a single intraperitoneal injection of 55mg/kg STZ, diluted in sodium-citrate buffer (pH 4.5), after a fasting period of 14 hours. Proper controls were run in parallel. STZ-treated rats received 5 % glucose solution instead of water during 24 h after STZ administration in order to avoid death due to hypoglycemic shock. Blood glucose concentrations were assessed four days after STZ injection. Glycemia was measured by using a commercial glucometer (Optium<sup>™</sup> Xceed, Abbott, USA). Animals with blood glucose levels higher than 200 mg/dL (11 mmol/L) were included in the experiments. Hyperglycemic animals were divided in two groups, the STZ group, which remains hyperglycemic for 10 and/or 60 days, and the STZ +INS group, which received 1.5 UI Novolin<sup>®</sup> N insulintwice a day in order to normalize blood glucose levels, for 10 and 60 days. In order to assure the insulin-induced tight control of glycemia, blood glucose levels were measured each week. Animal bodyweight was followed daily.

***2.3 Blood and CSF sample collection.*** Blood was collected by cardiac puncture in heparinized tubes (Ribeiro et al. 2009). Rat CSF samples were collected as previously described elsewhere (Earley et al. 2000).

***2.4 Tissue preparation for biochemical analysis.*** Animals were killed by decapitation without anesthesia. The brain, skeletal and cardiac muscle, kidney and liver were rapidly dissected, weighed and kept chilled until homogenization, which was performed using a ground glass type Potter-Elvehjem homogenizer. The maximum period between the tissue preparation and biochemical analysis was always less than a week. Samples were kept at -86°C until biochemical determinations.

### ***2.5 Tissue mitochondrial preparation for measuring the respiratory chain enzyme, creatine kinase (CK) and hexokinase (HK) activities.***

CK and HK activities were assessed in brain and/or periferic tissues homogenates and/or mitochondrial suspensions. Homogenates were prepared in 10 volumes of 4.4 mM potassium phosphate buffer pH 7.4, containing 0.3 M sucrose, 5mM MOPS, 1 mM EGTA and 0.1% bovine serum albumin. The homogenates were centrifuged at 3,000 x  $g$  for 10 min at 4°C. Mitochondria suspensions were prepared as previously described by our group (Glaser et al. 2010). The supernatant resulting from the first centrifugation was centrifuged at 17,000 x  $g$  for 10 min at 4°C. The obtained pellet was dissolved in the same buffer. For these tissues preparations an Eppendorf 5415 R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) was used.

***2.6 Measurement of the respiratory chain enzyme activities.*** Complex I activity was measured in brain mitochondrial preparations by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm ( $1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) as previously described (Cassina and Radi 1996). The activities of succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase (complex II) and succinate:cytochrome *c* oxidoreductase (complex II-CoQ-complex III) were determined according to the method of Fischer et al. (1985) and that for cytochrome *c* oxidase (complex IV) activity according to Rustin et al. (1994). The methods described to measure these activities were slightly modified, as detailed in a previous report (Latini et al. 2005). The activities of the respiratory chain complexes were calculated as  $\mu\text{mol}$  or  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ . The enzyme activities were measured using a Varian Cary 50 spectrophotometer with temperature control (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA).

***2.7 CK activity measurement.*** CK activity was assessed in brain and periferic tissues homogenates and mitochondrial preparations. The mitochondrial fraction obtained for measuring the respiratory chain complex activities was washed twice with 10 mM Tris buffer containing 0.25 M sucrose and finally suspended in 100 mM  $\text{MgSO}_4$ -Trizma buffer, pH7.5. CK activity measurement was based on the creatine formation according to the colorimetric method of Hughes (1962), with slight modifications as previously described (Glaser et al. 2010). Results were expressed as  $\mu\text{mol creatine formed} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ .

***2.8 Measurement of the HK activity.*** HK activity was determined in mitochondrial preparations using an enzymatic assay coupled to

Leuconostoc Mesenteroid's G6PDH activity, monitoring hexokinase activity indirectly by NADH formation at  $\lambda = 340$  nm. The reaction was started by adding known ATP concentrations (Galina et al. 1995). Results were expressed as  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ .

**2.9 Mitochondrial respiratory parameters.** The rate of oxygen consumption was measured in a high-resolution respirometry using the Oroboros® oxygraph with chamber volumes set at 2 mL (Hutter et al. 2004). DatLab software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) was used for data acquisition (1 or 2 s time intervals) and analysis. The assays were performed with 0.1 mg / mL of brain mitochondrial protein incubated in the same buffer used for mitochondrial isolation in the presence of the FAD-linked substrate succinate (5 mM). The rate of oxygen consumption in these conditions corresponded to state IV mitochondrial respiration. State III was initiated by adding 250  $\eta\text{mol}$  ADP. The respiratory control ratio (RCR; state III / state IV) was then calculated.

**2.10 Non-protein thiol groups (NPSH) measurement.** NPSH groups, whose levels are mainly represented by glutathione (around 90%; (Cooper and Kristal 1997)), were determined as described previously described (Ellman 1959) in a fraction of blood with the same volume of 20% trichloroacetic acid. After centrifugation, an aliquot of supernatant was diluted in 800 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 and 500  $\mu\text{M}$  DTNB (5,5'-dithio bis-2-nitrobenzoic acid) were added. Color development resulting from the reaction between DTNB and thiols reaches a maximum in 5 min and is stable for more than 30 min. Absorbance was determined at 412 nm after 10 min. Results were calculated as  $\mu\text{mol NPSH} / \text{mg protein}$ .

**2.11 Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) measurement.** Blood TBA-RS was determined in an acid-heating reaction containing thiobarbituric acid (Esterbauer and Cheeseman 1990). After incubation in boiling water, the resulting pink-stained TBA-RS was determined in a spectrophotometer at 532 nm. A calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane. TBA-RS levels were calculated as  $\eta\text{mol} / \text{mg protein}$ .

**2.12 Caspase-3 and protein immunohistochemistry.** Rats were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and transcardially perfuse with heparin (1,000 U/ml) in physiological saline (NaCl, 0.9%)

followed by 4% paraformaldehyde in physiological saline. The brains were rapidly removed and post-fixed overnight in 4% paraformaldehyde. Subsequently, the brains were sectioned, dehydrated in ethanol, embedded in paraffin, and sectioned in 7  $\mu\text{m}$  slices. The quenching of endogenous peroxidase was carried out using 1.5 % hydrogen peroxide in methanol (v/v) for 20 min. A high temperature antigen retrieval was performed by immersion of the slides in a water bath at 95-98°C in 10 mM trisodium citrate buffer pH 6.0, for 45 min. Immunohistochemistry was performed to identify cleaved caspase-3 and protein content in cerebral cortex, using primary polyclonal antibody anti-cleaved caspase-3 (Asp175) 1:400 (Cell Signaling<sup>®</sup>), incubated overnight and followed by washes with PBS. After incubation with appropriate biotinylated secondary antibodies and incubated with streptavidin-biotin-peroxidase, the sections were developed with DAB (3,3'-diaminobenzidine) (DakoCytomation<sup>®</sup>) in chromogen solution and counterstained with Harris's hematoxylin. Control and experimental tissues were placed on the same slide and processed under the same conditions. The immunostaining was assessed in five layers of cortex. Images of stained cortex (I, II, III, IV and V layer) were acquired using a Sight DS-5M-L1 digital camera (Nikon, Melville, NY, USA) connected to an Eclipse 50i light microscope (Nikon). A threshold for the optical density that better discriminated staining from the background was obtained using the NIH ImageJ 1.36b imaging software (NIH, Bethesda, MD, USA). We captured 5-8 images of per section. For relative quantification of immune expression, total pixels intensity was determined and data were expressed as average of optical density.

**2.13 CSF BH4 levels measuring.** BH4 levels were determined by using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (Howells et al. 1986).

**2.14 Protein determination.** Sample protein content was determined by the method of Lowry using bovine serum albumin as the standard (Lowry et al. 1951).

**2.15 Statistical analysis.** Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Percentages of rat weight gain (initial body weight was considered as 100%) data were analyzed by using two-way ANOVA for repeated measures. Data from biochemical determinations were analyzed using one-way ANOVA followed by the *post hoc* Duncan multiple range test when *F* was significant. Only significant *F* values

were given in the text. Differences between the groups were rated significant at  $P \leq 0.05$ . Statistics were performed using SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences software; version 16.0 for Windows). All graphs were performed by using Graph Pad Prism 5®.

### 3 RESULTS

#### **Bodyweight (BW) gain and blood glucose concentrations in adult (STZ)-administered Wistar rats receiving insulin (INS)**

Figure 1A shows the effect of INS administration on bodyweight (BW) gain in adult STZ-administered Wistar rats. STZ treatment caused a significant reduction in the BW gain (starting after six days with 9.5 % of reduction and reaching a maximal BW reduction of 44% at the end of the treatment), when comparing to controls. In addition, INS treatment ameliorated the loss of weight induced by STZ and after twenty-four days of treatment the gain in the BW was increased in these animals, comparing to controls (8.5 % of increment at day 24 and 64 % of increment at day 60). Furthermore, the STZ + INS group BW gain significantly differed from STZ after five days of STZ administration. Two-way ANOVA for repeated measures analysis showed significant effects between groups: Control, STZ and STZ + INS [ $F= 232.97$ ;  $P<0.001$ ] and days of treatment [ $F= 9.61$ ;  $P<0.001$ ]; interaction was observed between groups and days of treatment [ $F= 4.107$ ;  $P<0.001$ ];  $n= 4 - 5$  per group).

Figure 1B shows that INS treatment was adequate to control blood glucose levels after 60 days of STZ administration (glycemia at day ten = [ $F_{(2,9)}=60.59$ ;  $P<0.001$ ], at day thirty= [ $F_{(2,9)}= 122.90$ ;  $P<0.001$ ], and at day sixty= [ $F_{(2,9)}= 245.057$ ;  $P<0.001$ ]).

Insert Figure 1 about here.

#### ***Induction of oxidative stress in CSF and blood from STZ-administered Wistar rats***

Figures 1C to E show the effect of INS administration on hyperglycemia-induced oxidative stress in CSF and blood from STZ-long term treated rats. Figure 1C shows that 60 days of persistent hyperglycemia provoked a significant reduction in blood free thiol

content (up to 32 % of reduction) [ $F_{(2,15)}= 10.36; P<0.01$ ] and that the INS-induced tight control of glycemia was not able to protect from this oxidative effect. In agreement, STZ-induced hyperglycemia also provoked a marked increase in blood lipid oxidation (up to 78 % of increment) [ $F_{(2,13)}= 18.58; P<0.001$ ], effect that was partially prevented by INS therapy. Figure 1E shows that oxidative stress was also induced in the brain since the levels of the antioxidant molecule BH4 was reduced in CSF of STZ and STZ + INS animals (36 % and 29 % of reduction, respectively) [ $F_{(2,3)}= 9.29; P= 0.05$ ].

***Early and late effects of INS administration on key energy metabolism enzyme activities and on mitochondrial respiration in brain from adult STZ-administered Wistar rats***

Figure 2 shows the activities of complexes I-V of the respiratory chain in mitochondrial brain preparations from STZ-administered Wistar rats receiving INS. Figures 2A and B show that activities of complexes I and II were significantly reduced after 60 days of hyperglycemia (up to 35.5 % and 35 % of reduction for complex I and II, respectively), and that INS treatment was able to completely block this inhibitory action (complex I: [ $F_{(2,12)}= 5.69; P<0.01$ ]; complex II: [ $F_{(2,12)}= 5.69; P<0.01$ ]). The activity of complex IV was significantly inhibited after 60 days of treatment (up to 43 % of reduction), but this effect was not prevented by exogenous INS [ $F_{(2,12)}= 4.47; P<0.05$ ]. A differential effect caused by the hyperglycemic state was observed on complex IV activity after ten days of treatment. Although, no inhibition was observed on this mitochondrial enzyme activity after 10 days of treatment in brain from STZ animals, the co-treatment provoked a significant increase of complex IV (up to 17 % of increment) [ $F_{(2,6)}= 5.69; P<0.05$ ] (Figure 2C). Ten days of hyperglycemia provoked a slight, but not significant, reduction of complex V activity in brain from STZ rats (up to 30 % of reduction) (Figure 2D).

Insert Figure 2 about here.

The total and mitochondrial CK and mitochondrial HK were also assessed in brain from STZ-treated animals. As shown in Figure 2E the activities of mitochondrial and total CK was markedly increased in STZ group after 10 and 60 days of exposure to high blood glucose concentrations (up to 61 % and 136 % of increment, respectively), and this effect was prevented by INS administration only after 10 days of the

anti-glycemic therapy (10 days: [ $F_{(2,15)}= 7.69; P<0.01$ ]; 60 days: [ $F_{(2,16)}= 38.93; P<0.001$ ]). This STZ stimulatory effect was not observed for mitochondrial HK activity which was not significantly altered after 10 days of hyperglycemic condition (Figure 2F).

The respiring NAD-linked state IV was significantly increased in brain mitochondrial preparations from hyperglycemic animals (up to 75 % of increment) [ $F_{(2,5)}= 125.85; P<0.001$ ]; however, state III (ADP-stimulated respiration) was not significantly altered (maximum increment of 41 %) [ $F_{(2,5)}= 5.23; P= 0.059$ ]; neither the RCR mitochondrial index (Figure 2G).

### ***Early and late effects of INS administration on kinase activities in peripheral tissues from adult STZ-administered Wistar rats***

Figure 3A shows that 60 days-hyperglycemic treatment significantly increased the activity of total CK in skeletal and cardiac muscles and in kidney tissue (up to 130 %, 724 % and 128 %, respectively). INS administration was able to partially prevent this hyperglycemia-induced effect only in kidney (skeletal muscle: [ $F_{(2,16)}= 26.74; P<0.001$ ]; cardiac tissue: [ $F_{(2,15)}= 26.28; P<0.001$ ] and kidney: [ $F_{(2,8)}= 28.54; P<0.001$ ]). Furthermore, Figure 3B shows that mitochondrial CK activity was significantly increased (up to 66 % of increase) in liver from STZ-exposed animals after of 10 days of hyperglycemia and that the INS treatment prevented this effect (10 days: [ $F_{(2,7)}= 20.13; P<0.001$ ]; 60 days: [ $F_{(2,6)}= 5.07; P= 0.051$ ]). In addition, it is shown on Figure 3C that hyperglycemia also induced a significant inhibition of mitochondrial HK activity (up to 22 % of inhibition) [ $F_{(2,3)}= 25.46; P<0.01$ ], which was not prevented by INS treatment.

Insert Figure 3 about here.

### ***Long-term hyperglycemic effect on caspase-3 cleavage in brain preparations from adult STZ-administered Wistar rats receiving INS***

Figures 4A to E shows that long-term high and constant glucose levels elicited apoptosis as shown by the significant increase in caspase-3 cleavage in brain from STZ-treated animals (up to 598 % of increment) [ $F_{(2,52)}= 32.45; P<0.001$ ], and INS was not able to prevent this effect.

Insert Figure 4 about here.

## 4 DISCUSSION

Diabetes is known to be a major metabolic disorder in which oxidative stress and free radical production have been implicated through several lines of evidence, and much of the DM long-term pathology appears to occur as a consequence of the persistent hyperglycemia condition. Although, all DM tissues are exposed to high levels of glucose, the brain appears to be more sensitive to this effect (Halliwell and Gutteridge 2007). In this scenario, it has been demonstrated that hyperglycemia in DM results in up to fourfold increases in neuronal glucose content, leading therefore, to the condition known as glucose toxicity (Tomlinson and Gardiner 2008).

Here, it was demonstrated that STZ-induced persistent hyperglycemia elicits systemic oxidative stress, severe brain energy deficiency and apoptosis, and that the insulin-induced tight glycemic control was not always effective in preventing these alterations. Furthermore, a compensatory mechanism as shown by increased CK activity was observed in brain as well as in peripheral tissues from STZ animals.

Blood oxidative stress was evidenced by increased lipid peroxidation and reduced thiol content in STZ-animals. These results are in agreement with a large body of reports demonstrating that the hyperglycemic conditions stimulate the flux of the polyol pathway rendering the tissues more sensitive to oxidative stress, mainly because of the reduction in the NADPH content, essential cofactor for supporting the activity of glutathione-related enzymes for a review see (Brownlee 2001). In addition, the accumulating AGEs would also contribute for increasing the oxidative status, mainly by inducing, in a pathological way, the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B, which will elicit the up regulation of several proteins including, for example, the nitric oxide synthase type II (iNOS) or cyclo-oxygenase type II, among others (Dukic-Stefanovic et al., 2003; Huang and Siragy, 2009). Furthermore, the levels of the antioxidant molecule BH<sub>4</sub> were also diminished in CSF from hyperglycemic animals. BH<sub>4</sub> is an obligatory cofactor of enzymes participating in neurotransmitter and nitric oxide (NO) synthesis (Cosentino and Luscher, 1999). Therefore, the hyperglycemic-induced oxidative stress would also alter the neurotransmission, as well as, the vessel physiology contributing for the developing of stroke, vascular dementias or AD, as previously indicated by experimental and epidemiological studies (Arvanitakis et al. 2004; Biessels et al. 2006). In agreement, it has been demonstrated reduced BH<sub>4</sub> concentrations in



blood and CSF from patients where neuroinflammation or excessive NO production has been linked to the pathogenesis of the disease, including *e.g.* AD (Cosentino and Luscher, 1999), suggesting a pathogenic role for this molecule in neurodegenerative disorders. Since iNOS can be activated by high levels of glucose (Sobrevia et al. 1996), a rapid consumption of the enzyme cofactor could occur in a rate that exceed the BH<sub>4</sub> synthesis *de novo*, leading to increased NO production and reduced BH<sub>4</sub> levels. In addition, it is likely that BH<sub>4</sub> acts as a NO scavenger, and this situation will potentiate the toxicity induced by high levels of brain glucose in inducing neurodegeneration.

On the other side, mitochondria are the key players in ATP production, which is essential for the excitability and survival of neurons, and the protein phosphorylation reactions that mediate synaptic signaling and related long-term changes in neuronal structure and function. If partial reduction of O<sub>2</sub> occurred in these organelles, this situation will certainly induce ROS formation. In line with this, complexes I and III have been reported as the major sites of ROS generation in mitochondria under physiological conditions (up to 2-5% of the total O<sub>2</sub> reduced in mitochondria) (Boveris et al. 1976; Chen et al. 2003), and an overt ROS production is observed when these redox centers are blocked (Turrens and Boveris 1980; Turrens 1997). Moreover, ROS formed at NADH dehydrogenase site of complex I are released into the mitochondrial matrix (Chen et al. 2003), eliciting oxidative damage of mitochondrial enzymes, including the complexes of the respiratory chain, enzymes of the Krebs cycle, kinases and several other sensitive proteins, as well as the mitochondrial DNA (Bandy and Davison 1990; Zhang et al. 1990; Hausladen and Fridovich 1994). Furthermore, complex I is the rate-limiting enzyme in oxidative phosphorylation (Chinopoulos and Adam-Vizi 2001). Therefore, any modification on this complex may have a direct impact on the overall energy state. Thus, the severe reduction in electron transport activity observed in STZ animals (Figure 2A - D) would finally compromise the brain cell viability leading to apoptosis-mediated pathological conditions (Figure 4), including dementia or AD, since mitochondria are fragile structures whose dysfunction appears to underlie a host of degenerative diseases.

This study also shows for the first time that a compensatory mechanism, represented by increased total and mitochondrial CK activities, is elicited in the brain from STZ animals. CK catalyzes the reversible transfer of a phosphoryl group between ATP and creatine (Bessman and Carpenter 1985) and plays a key role in the energy

metabolism of tissues that have intermittently high and fluctuating energy requirements, such as skeletal and cardiac muscle, and nervous tissue (Wallimann and Hemmer 1994). In addition, it is known that mitochondrial CK is able to inhibit the mitochondrial permeability transition, a process that is involved in inducing apoptosis, by modulating the mitochondrial membrane potential and therefore, the releasing of cytochrome *c* into the cytoplasm (Dolder et al., 2003). Since severe energy deficits and cleavage of capase-3 were observed in the treatments it is feasible that increased CK activity is a compensatory mechanism in order to maintain the cell energy status, and probably triggered by the systemic oxidative stress condition. Furthermore, this stimulatory effect was also evidenced in peripheral tissues, where an increment in the mitochondrial isoform of this enzyme was also confirmed. Interestingly, increased mitochondrial CK activity was also observed in the liver tissue after 10 days of persistent high blood glucose levels, where a minimal activity of this enzyme is expected (low expression of this protein in hepatocytes (Meyer et al., 2006). This could be due to a pathological cellular signaling, or being related to the endothelial CK activity. In agreement, it is widely described increased angiogenesis in diabetic tissues with increased expression of VEGF (vascular endothelial growth factor). It has been described that many genes rapidly respond differently to hyperglycemic states, including e.g. increased expression of VEGF (Ishizuka, et al., 2011) and NF- $\kappa$ B p65 subunit promoter (El-Osta et al. 2008) or reduced mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) (Mootha et al. 2003); therefore the deficiency in PGC-1 $\alpha$  in hyperglycemic conditions could result in a different pattern of energy metabolism alterations; as shown here, reduced activities of the electron transfer chain and increased CK activity.

Considering the electron transfer impairment observed in central and peripheral tissues of hyperglycemic rats, an increased anaerobic glycolysis should be expected. However, a reduced activity of mitochondrial HK was also observed in 10 days-hyperglycemic hepatic tissue. Mitochondrial HK deficiency (enzyme release from the mitochondrial membrane) has previously been described in AD experimental models, favoring the toxicity induced by the aggregate AD proteins (Saraiva et al. 2010). On the other side, deficient HK activity will stimulate even more the ADP recycling catalyzed by CK in order to maintain energy homeostasis (da-Silva et. al., 2001).

Insulin administration lead to an effective control in blood glucose levels in STZ-treated animals. After ten, 30 or 60 days of

treatment, animals from the group STZ + INS remained in normoglycemia conditions. This, allowed to prevent many alterations in brain energetics, which is possibly due to the demonstrated capacity of insulin in modulate the levels of mRNA of genes coding for the respiratory chain complexes. It has been described that insulin exerts part of its protective effect through the activation of phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-Akt pathway, which is known as the pro-survival pathway (Duronio 2008). Furthermore, Teshima and co-workers (2010) demonstrated that insulin treatment is capable to down-regulate PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) and phospho-PTEN content (Teshima et al. 2010), a phosphatase that dephosphorylates the secondary messenger produced by PI3K, interrupting therefore, the downstream activation of Akt (Duronio 2008).

On the other side, insulin therapy failed to prevent the altered oxidative stress parameters observed in blood, CSF and brain tissue and this could also be related to the capacity of increased ROS formation, mitochondrial dysfunction and/or persistent hyperglycemia in inducing PTEN up regulation (Duronio 2008; Teshima et al. 2010).

Finally, in our experimental model of hyperglycemia, STZ + INS-treated rats were exposed to a transient hyperglycemic state, *i.e.* two days and then animals returned to euglycemic levels. This early metabolic control promoted beneficial effects on oxidative metabolism, as seen here, mainly in mitochondrial enzyme activities, thus insulin replacement appears to have an essential role in the maintenance of mitochondrial homeostasis under diabetic conditions. However, the short period lacking of cellular insulin signaling, would induce in addition to this protective effect epigenetic changes that will contribute to the persistent oxidative stress.

## REFERENCES

- American Diabetes Association (2010), Standards of medical care in diabetes--2010. *Diabetes Care* 33 Suppl 1:S11-61.
- Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA (2004), Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol* 61:661-666.
- Bandy B, Davison AJ (1990), Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med* 8:523-539.
- Bessman SP, Carpenter CL (1985), The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* 54:831-862.
- Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P (2006), Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5:64-74.
- Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D (2005), Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 28:956-962.
- Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO (1976), Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 156:435-444.
- Brem H, Sheehan P, Rosenberg HJ, Schneider JS, Boulton AJ (2006), Evidence-based protocol for diabetic foot ulcers. *Plast Reconstr Surg* 117:193S-209S; discussion 210S-211S.
- 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.
- Camici PG, Crea F (2007), Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med* 356:830-840.
- Cassina A, Radi R (1996), Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328:309-316.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003), Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278:36027-36031.
- Chinopoulos C, Adam-Vizi V (2001), Mitochondria deficient in complex I activity are depolarized by hydrogen peroxide in nerve terminals: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 76:302-306.

- Cooper AJ, Kristal BS (1997), Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol Chem* 378:793-802.
- Cosentino F, Luscher TF (1999), Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 43:274-278.
- da-Silva WS, Rezende GL, Galina A (2001), Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *J Exp Bot* 52:1191-1201.
- Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Deuther-Conrad W, Munch G (2003), Signal transduction pathways in mouse microglia N-11 cells activated by advanced glycation endproducts (AGEs). *J Neurochem* 87:44-55.
- Duronio V (2008), The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 415:333-344.
- Earley CJ, Connor JR, Beard JL, Malecki EA, Epstein DK, Allen RP (2000), Abnormalities in CSF concentrations of ferritin and transferrin in restless legs syndrome. *Neurology* 54:1698-1700.
- El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, Cooper ME, Brownlee M (2008), Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med* 205:2409-2417.
- Ellman GL (1959), Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77.
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990), Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-421.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ (1985), Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23-36.
- Folmer V, Soares JC, Rocha JB (2002), Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1279-1285.
- Galina A, Reis M, Albuquerque MC, Puyou AG, Puyou MT, de Meis L (1995), Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *Biochem J* 309 ( Pt 1):105-112.
- Glaser V, Leipnitz G, Straliozzo MR, Oliveira J, dos Santos VV, Wannmacher CM, de Bem AF, Rocha JB, Farina M, Latini A (2010), Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. *Neurotoxicology* 31:454-460.

- Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T (2005), Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care* 28:164-176.
- Halliwel B, Gutteridge JM (2007) *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press.
- Hausladen A, Fridovich I (1994), Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 269:29405-29408.
- Howells DW, Smith I, Hyland K (1986), Estimation of tetrahydrobiopterin and other pterins in cerebrospinal fluid using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *J Chromatogr* 381:285-294.
- Huang J, Siragy HM (2009), Glucose promotes the production of interleukine-1beta and cyclooxygenase-2 in mesangial cells via enhanced (Pro)renin receptor expression. *Endocrinology* 150:5557-5565.
- Hughes BP (1962), A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 7:597-603.
- Hutter E, Renner K, Pfister G, Stockl P, Jansen-Durr P, Gnaiger E (2004), Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J* 380:919-928.
- Ishizuka T, Hinata T, Watanabe Y (2011), Superoxide induced by a high-glucose concentration attenuates production of angiogenic growth factors in hypoxic mouse mesenchymal stem cells. *J Endocrinol* 208:147-159.
- Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M (2005), Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86:188-199.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Meyer LE, Machado LB, Santiago AP, da-Silva WS, De Felice FG, Holub O, Oliveira MF, Galina A (2006), Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation:

- antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP recycling activity. *J Biol Chem* 281:37361-37371.
- Mootha VK et al. (2003), PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273.
- Mukherjee B, Anbazhagan S, Roy A, Ghosh R, Chatterjee M (1998), Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother* 52:89-95.
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B (2005), Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 353:2643-2653.
- Orchard TJ, Costacou T (2010), When are type 1 diabetic patients at risk for cardiovascular disease? *Curr Diab Rep* 10:48-54.
- Reichard P, Nilsson BY, Rosenqvist U (1993), The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:304-309.
- Ribeiro MC, Barbosa NB, de Almeida TM, Parcianello LM, Perottoni J, de Avila DS, Rocha JB (2009), High-fat diet and hydrochlorothiazide increase oxidative stress in brain of rats. *Cell Biochem Funct* 27:473-478.
- Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, 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.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A (1994), Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35-51.
- Saraiva LM, Seixas da Silva GS, Galina A, da-Silva WS, Klein WL, Ferreira ST, De Felice FG (2010), Amyloid-beta triggers the release of neuronal hexokinase 1 from mitochondria. *PLoS One* 5:e15230.
- Sobrevia L, Nadal A, Yudilevich DL, Mann GE (1996), Activation of L-arginine transport (system y<sup>+</sup>) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *J Physiol* 490 ( Pt 3):775-781.

- Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Nishio S, Nagano-Torigoe Y, Miyazaki H, Ezaki K, Yufu K, Hara M, Nakagawa M, Saikawa T (2010), High-glucose condition reduces cardioprotective effects of insulin against mechanical stress-induced cell injury. *Life Sci* 87:154-161.
- 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.
- Tomlinson DR, Gardiner NJ (2008), Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 9:36-45.
- Turrens JF (1997), Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17:3-8.
- Turrens JF, Boveris A (1980), Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191:421-427.
- Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R (2003), Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 26:1553-1579.
- Wallimann T, Hemmer W (1994), Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 133-134:193-220.
- Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP (1998), Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 21:1167-1172.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004), Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM (1996), RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382:685-691.
- Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ (1990), The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 265:16330-16336.



## LEGENDS TO FIGURES AND SCHEME

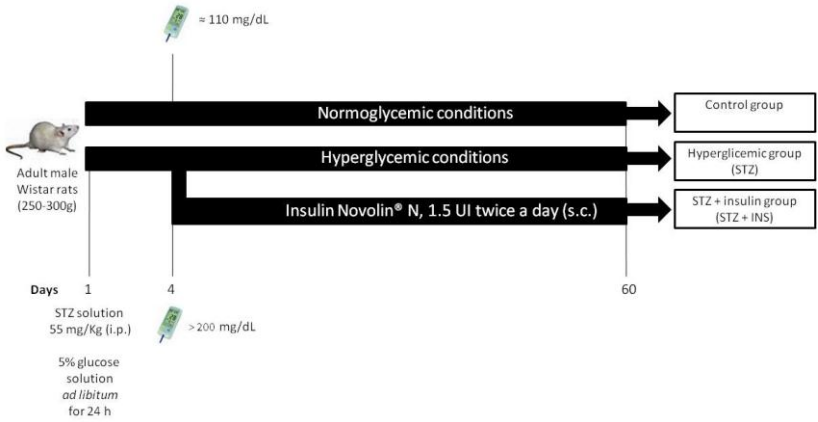
**Scheme 1.** Experimental design. Hyperglycemic conditions were induced by administering streptozotocin (STZ; i.p.). The glycemic control was achieved by treating with insulin (INS; 1.5 UI Novolin® N) twice a day.

**Figure 1.** Effect of 60 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin® N insulin twice / day) administration in bodyweight gain (BW) (A), blood glucose concentrations (B), blood free thiol (NPSH) content (C), blood TBA-RS levels (D), and cerebrospinal fluid (CSF) tetrahydrobiopterin (BH4) concentration (E). Data represent mean  $\pm$  standard deviation. BW significant differences between controls and STZ animals started on day 6 (\*), between controls and STZ+INS animals on day 5 (#) and between controls and STZ + INS rats on day 24 (\$) (Two-way ANOVA for repeated measures). Glycemia was controlled with 1.5 UI Novolin® N insulin twice a day and measured at days 10, 30 and 60 during the treatment. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , compared to the control group. # $P < 0.05$ ; ### $P < 0.001$ , compared to the STZ group (One-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test).

**Figure 2.** Effect of 10 and/or 60 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin® N insulin twice / day) administration on the activities of the complexes I, II, IV, V of the respiratory chain (A – D), mitochondrial and total creatine kinase (E), mitochondrial hexokinase (F), and mitochondrial oxygen consumption in brain from adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats. Data represent mean  $\pm$  standard deviation (3 to 9 animals / group). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , compared to the control group. ### $P < 0.001$ , compared to the STZ group (One-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test).

**Figure 3.** Effect of 10 and/or 60 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin® N insulin twice / day) administration on the activities of total (A) and mitochondrial (B) creatine kinase, and mitochondrial hexokinase (C) in peripheral tissues from adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats. Data represent mean  $\pm$  standard deviation (3 to 9 animals / group). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , compared to the control group. ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , compared to the STZ group (One-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test).

**Figure 4.** Effect of 60 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin<sup>®</sup> N insulin twice / day) administration on caspase-3 cleaving in brain from adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats. For relative immune expression quantification of cortical layer II (A), total pixels intensity was determined and data were expressed as mean of optical density  $\pm$  standard deviation (E). B: Controls; C: STZ group; D: STZ + INS group. Bar represent 200  $\mu$ m for figure A and 50  $\mu$ m for figure E. \*\*\* $P < 0.001$ , compared to the control group (One-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test).

**Scheme 1**

**Figure 1**

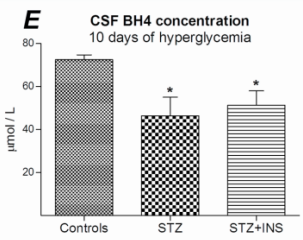
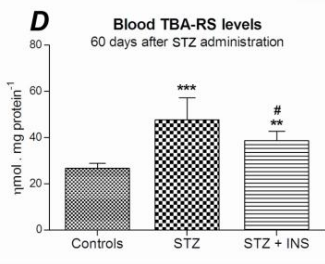
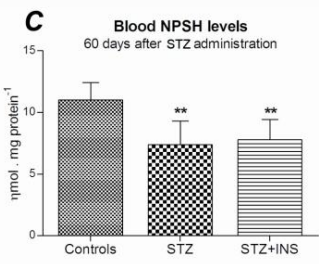
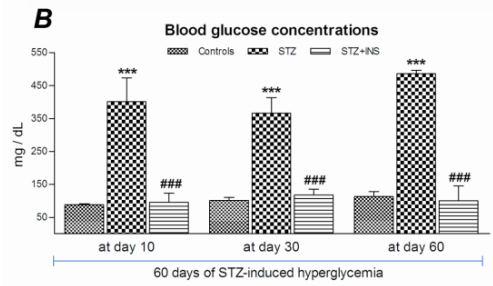
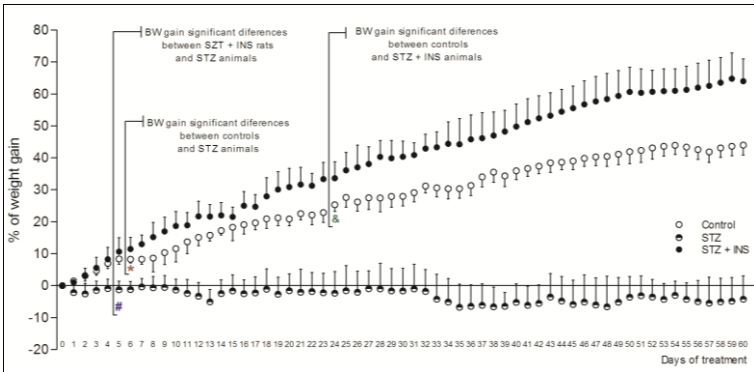


Figure 2

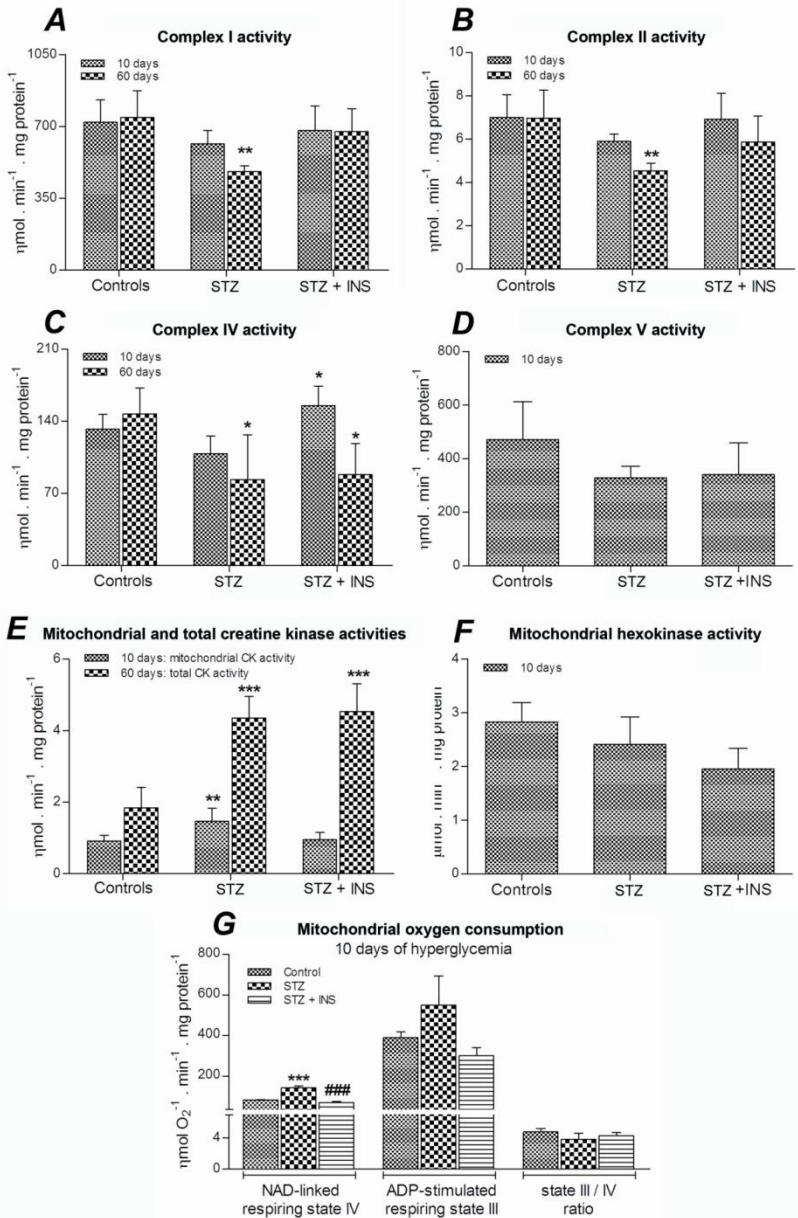


Figure 3

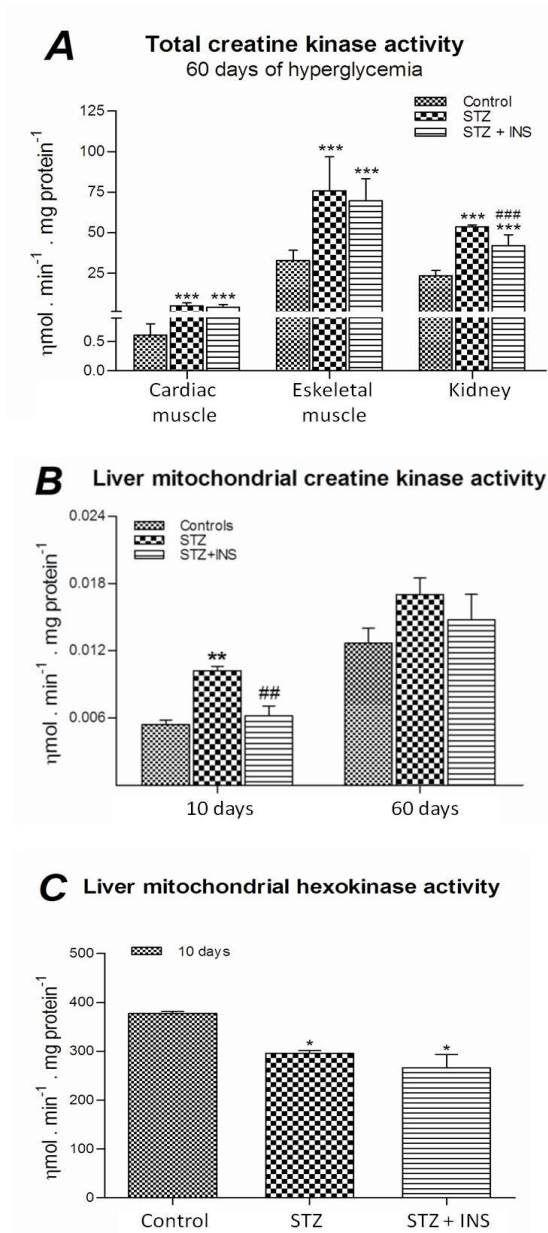
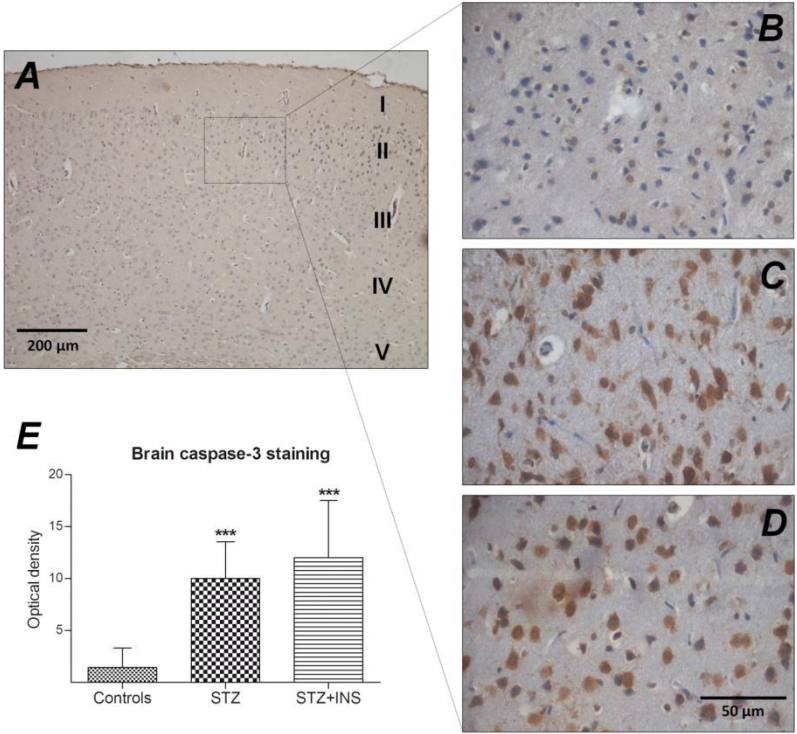


Figure 4



## 5.2 Manuscrito 2

*“Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related mitochondrial bioenergetics alterations: involvement of advanced glycosylated end products”*, submetido à BBA - Molecular Basis of Disease.



Manuscript for **BBA - MOLECULAR BASIS OF DISEASE**  
Handling editor: **Rafael de Cabo**

**Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: involvement of advanced glycosylated end products**

Aline Pertile Remor<sup>1&</sup>, Filipe José de Matos<sup>1&</sup>, Karina Ghisoni<sup>1</sup>, Thiago Lenoir da Silva<sup>1</sup>, Greici Eidt<sup>1</sup>, Marília Búrigo<sup>1</sup>, Andreza Fabro de Bem<sup>1</sup>, Paulo César Lock Silveira<sup>1</sup>, Andrés de León<sup>2</sup>, Maria Cecilia Sanchez<sup>3</sup>, Carlos Alberto Saraiva-Gonçalves<sup>4</sup>, André Quincozes-Santos<sup>4</sup>, Rafael Borba Rosa<sup>5</sup>, Alexandra Latini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis / SC, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratorio de Neurodegeneración, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas, CIBICI, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre / RS, Brazil.

<sup>5</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo / RS, Brazil.

<sup>&</sup>Remor AP and Matos FJ should be considered as first authors

**Running title:** Effect of insulin on AGE-induced energy deficits in tissues from STZ animals

\*Corresponding author: Alexandra Latini  
Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo  
Centro de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis Brazil  
tel: + 55 48 37214743  
fax: +55 48 37219672  
e-mail: alatini@ccb.ufsc.br

## Abstract

Large scale clinical trials have demonstrated that an intensive antihyperglycemic treatment in *diabetes mellitus* (DM) individuals reduces the incidence of micro- and macrovascular complications, *e.g.* nephropathy, retinopathy, DM-accelerated atherosclerosis, myocardial infarction, or limb amputations. Thus, we investigated the effect of short- and long-term insulin administration on mitochondrial function in peripheral tissues in streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic rats. In addition, the *in vitro* effect of methylglyoxal (MG) and advanced glycation end products (AGEs) on mitochondrial activity was investigated in skeletal muscle and liver mitochondria and in skin primary fibroblasts. Hyperglycemic STZ rats showed tissue-specific patterns of energy deficiency, as evidenced by reduced activities of complexes I, II and/or IV after 30 days of hyperglycemia in heart, skeletal muscle and liver; moreover, cardiac tissue was found to be the most sensitive to the diabetic condition, since energy metabolism was impaired after 10 days of the hyperglycemic condition. Insulin-induced tight glycemic control was effective in protecting against the hyperglycemia-induced inhibition of mitochondrial enzyme activities. Furthermore, the long-term hormone replacement (30 days) also increased these activities in kidney from STZ-treated animals, where the hyperglycemic state did not modify electron transport activity. Results from *in vitro* experiments demonstrated that mitochondrial impairment could result from oxidative stress-induced accumulation of MG and AGEs. These data indicate that persistent hyperglycemia results in tissue-specific patterns of energy deficiency and that early and continuous insulin therapy is necessary to maintain proper mitochondrial oxidative metabolism via mechanisms that may determine the rate of mitochondrial oxygen consumption and, therefore, ATP synthesis.

**Keywords:** hyperglycemia, insulin, mitochondrial oxidative stress, cardioprotection, streptozotocin

**BULLETS**

- Persistent hyperglycemia results in tissue-specific patterns of energy deficiency
- Insulin administration had protective effects in peripheral tissues in STZ rats
- Tight glucose control is essential to avoid mitochondrial impairment in STZ rats
- Energy deficit was possibly caused by AGE inducing mitochondrial oxidative stress

## 1. INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM), a state of chronic hyperglycemia, is a common disease and one of the leading causes of morbidity and mortality in developed countries. DM currently affects more than 124 million individuals, and it is estimated that 300 million people worldwide will suffer from the disease by 2025 [1].

Chronic DM is characterized by the development of specific microvasculature pathology in the retina, renal glomerulus and peripheral nerves. As a consequence of these microvascular complications, DM is the leading cause of blindness, kidney failure and a variety of debilitating neuropathies [2-5]. The microvascular dysfunctions are also known to induce the development of DM macrovascular pathology [6], which is characterized by DM-accelerated atherosclerosis, which in turn leads to increased risk of myocardial infarction, stroke and limb amputations [7, 8]. Although microvascular complications are responsible for significant morbidity and premature mortality, by far the greatest cause of death in people with diabetes is cardiovascular disease [9, 10]. Such macrovascular changes occur much earlier in life than in the general population, and also present a more diffuse, accelerated course and higher mortality, especially among those aged less than 40 years [11, 12].

Several large randomized controlled trials have conclusively demonstrated that early intensive glycemic control decreases the risk of diabetic microvascular complications [12-14]. Although the *Diabetes Control and Complications trial Research group* (DCCT) showed only a trend towards a lower risk for cardiovascular events (macrovascular pathology), the almost 10 years post-DCCT follow-up of the cohort showed a significant reduction in the risk of nonfatal myocardial infarction, stroke, or death from cardiovascular disease [12, 13]. Thus, these findings suggest that early metabolic control would have beneficial effects on the vasculature. This phenomenon has been defined as *metabolic memory*, an early imprinting in cells arising from hyperglycemia, favoring the future development of vascular complications. This hypothesis describes the observation that prolonged, tight glycemic control during early (newly diagnosed to five years post-diagnosis) but not later stages of DM would bring about a sustained benefit regarding micro- and macrovascular endpoints [2, 12, 13].

On the other hand, persistent hyperglycemia appears to activate four major pathways implicated in the pathogenesis of diabetes complications, namely the hexosamine and polyol pathways, protein

kinase C isoforms, and formation of the reactive carbonyl compounds methylglyoxal (MG) and glyoxal [15]. These carbonyl compounds form covalent adducts with specific lysine and arginine residues in proteins, leading to the formation of intracellular advanced glycation end products (AGEs), which consequently will alter protein function. MG is the major source of AGEs in hyperglycemia [16]. MG-derived AGEs (MG-AGE), which are particularly abundant in vascular tissue, are thought to contribute to the observed micro- and macrovasculopathies in late complications of DM [17-22].

The observation that reduced rates of ATP synthesis in subjects with a family history of type 2 DM occur before the onset of impaired glucose tolerance indicates the significance of mitochondrial dysfunction in the progression of the disease [23]. In this context, experimental data have demonstrated that AGEs may initiate pathologic processes by impairing mitochondrial function [24], by inducing apoptosis [25-27] and by stimulating overproduction of cytokines and reactive oxygen species (ROS) [28, 29]. Therefore, in order to better understand the effect of glycemic control on cellular energy and oxidative metabolisms, here we investigated the effect of short- and long-term insulin administration in skeletal and cardiac muscles, kidneys and liver from streptozotocin-induced hyperglycemic rats. In addition, the effect of MG and MG-AGE on mitochondrial function was investigated in skeletal muscle and liver mitochondrial preparations and in skin primary fibroblasts.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

**2.1 *Animals and reagents.*** Male Wistar rats of 60 days of life (250-300 g) obtained from the Central Animal House of the Centre for Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, Brazil, were used in the present investigation. The animals were maintained on a 12-h light/dark cycle in a constant temperature room ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), with free access to water and protein commercial chow (Nuvital-PR, Brazil), except in the fasting periods previous to blood glucose measurements (see below). In addition, neonatal rats were used for preparing skin fibroblast cultures. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research (PP00350/CEUA) of the Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brazil, and was carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986

(86/609/EEC). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

All chemicals were of analytical grade and purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except Novolin<sup>®</sup>N insulin, which was purchased from Novo Nordisk Laboratories (Princeton, NJ, USA) and fetal bovine serum from Gibco<sup>®</sup> (Carlsbad, CA, USA).

**2.2 Induction of hyperglycemia by streptozotocin (STZ) administration (Scheme 1).** Hyperglycemia was induced by a single intraperitoneal injection of 55mg / kg STZ, diluted in sodium-citrate buffer (pH 4.5), after a fasting period of 14 hours. Proper controls were run in parallel. STZ-treated rats received 5 % glucose solution instead of water during 24 h after STZ administration in order to avoid death due to hypoglycemic shock. Blood glucose concentrations were assessed four days after STZ injection. Glycemia was measured by using a commercial glucometer (Optium<sup>™</sup>Xceed, Abbott, USA). Animals with blood glucose levels higher than 200 mg / dL (11 mmol / L) were included in the experiments. Hyperglycemic animals were divided in two groups, the STZ group, which remains hyperglycemic for 10 and 30 days, and the STZ+INS group, which received 1.5 UI Novolin<sup>®</sup>N insulin twice a day in order to normalize blood glucose levels, for 10 and 30 days. In order to assure the insulin-induced tight control of glycemia, blood glucose levels were measured each week. Animal bodyweight was followed daily.

Insert Scheme 1 about here (Portrait layout).

**2.3 Tissue preparation for biochemical analysis.** Animals were killed by decapitation without anesthesia. The skeletal and cardiac muscles, kidney and liver were rapidly dissected, weighed and kept chilled until homogenization, which was performed using a ground glass type Potter-Elvehjem homogenizer. The maximum period between the tissue preparation and biochemical analysis was always less than a week. Samples were kept at -86°C until biochemical determinations.

**2.4 Tissue mitochondrial preparation for measuring the respiratory chain complex activities.** Mitochondria suspensions were prepared as previously described by our group [30]. Briefly, tissues were homogenized in 10 volumes of 4.4 mM potassium phosphate buffer pH 7.4, containing 0.3 M sucrose, 5 mM MOPS, 1 mM EGTA and 0.1% bovine serum albumin. The homogenates were centrifuged at 3,000 x g

for 10 min at 4°C. The pellet was discarded and the supernatants were centrifuged at 17,000 x g for 10 min at 4°C. The obtained pellet was dissolved in the same buffer. For these tissues preparations an Eppendorf 5415 R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) was used.

*In vitro* experiments were also performed in mitochondrial suspensions obtained from non-treated adult rat skeletal muscle and liver. For this purpose, mitochondrial fractions were prepared as described above and treated with crescent concentrations of methylglyoxal oxidized bovine serum albumin (MG-BSA) for 3 h. Proper controls were run in parallel.

**2.5 Tissue preparation for immunohistochemical analysis.** Rats were anesthetized intraperitoneally with chloral hydrate (400 mg / kg) and transcardially perfuse with heparin (1000 U / mL) in physiological saline (0.9% NaCl) followed by 4% paraformaldehyde in physiological saline. Skeletal muscle was removed and post-fixed overnight in 4% paraformaldehyde. Afterwards, the muscle were transversally sectioned, dehydrated in ethanol, embedded in paraffin, and sectioned in 10 µm slices. The quenching of endogenous peroxidase was carried out using 1.5 % hydrogen peroxide in methanol (v/v) for 20 min. A high temperature antigen retrieval was performed by immersion of the slides in a water bath at 95-98 °C in 10 mM trisodium citrate buffer pH 6.0, for 45 min. Immunohistochemistry was performed to identify DNA oxidative damage in cerebral cortex, using primary monoclonal antibody anti-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 1:50 (JaICA®, Shizuoka, Japan) incubated overnight at 4 °C in a humid chamber. After incubation, the slices were washed twice in PBS and then incubated in a secondary antibody Alexa Fluor 633 (Invitrogen®, USA) diluted at 1:100 during 3 hours. Finally, the slices were mounted in GelMount (Sigma®, St. Louis, MO, USA) and were observed under a conventional fluorescence microscope (Zeiss standard fluorescence microscope). A threshold for the optical density that better discriminated staining from the background was obtained using the NIH ImageJ 1.36b imaging software (NIH, Bethesda, MD, USA). For relative quantification of immunoexpression, total pixels intensity was determined and data were expressed as average of optical density (O.D.).

**2.6 Primary skin fibroblast cell culture.** Rat dermal fibroblasts were obtained from skin biopsy sampled from the dorsal region of normal neonatal female rats (1 day of life) by employing explant techniques

[31]. The cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, sterile antimycotic solution 100X: penicillin 100 IU/mL, streptomycin 0.1 mg/mL and amphotericin 0.25 µg/mL, D-glucose 5.5 mM, 2% glutamine, 0.22% NaHCO<sub>3</sub>, and 0.47% HEPES in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere, at 37°C.

**2.7 Cell treatment.** Confluent fibroblasts cultures (70 % of confluence; passage 6-8) were maintained 24 hours in the growth medium containing 0.5% fetal bovine serum for synchronization of cells cycle. Afterwards, cells were treated methylglyoxal (MG) (30 and 300 µM) and MG-BSA (0.01, 0.1 and 1 mg / mL) for 3 and 24 h at 37 °C.

**2.8 Preparations of MG-BSA.** BSA highly modified by MG (MG-BSA<sub>high</sub>) was obtained after incubating 7.2 mg / mL BSA with 100 mM MG in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 at 37°C for 50 h, in sterile conditions (solutions were filtered by using 0.22 µm filters). The solution was then dialyzed against 30 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 7.9 at 4°C. MG-BSA derivatives under less severe conditions were also prepared by exposing BSA solution to 1 mM MG (MG-BSA<sub>low</sub>) [32].

**2.9 Characterization of BSA derivatives after MG exposure: measurement of protein non-oxidized amino acids, Maillard compounds, protein carbonylation and total protein quantification by the Lowry method.** The modification of amino acid residues induced by MG exposure was investigated by analyzing the reaction of TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid) with the non-oxidized amino acid present in MG-BSA<sub>low</sub> and MG-BSA<sub>high</sub> preparations [33].

In addition, the formation of Maillard compounds (measurement of AGE formation) was identified as previously described [34]. The fluorescence detection was performed at  $\lambda_{\text{ex}}=370$  nm and  $\lambda_{\text{em}}=385$  nm by using a Tecan GmbH M200 fluorescence spectrophotometer (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria).

Protein carbonyl content determination (marker of protein oxidative damage) was measured spectrophotometrically [35]. The results were calculated as nmol of carbonyls groups / mg protein using the extinction coefficient of 22,000 10<sup>6</sup>nmol / mL for aliphatic hydrazones.

Protein content in BSA preparations, as well as, in the animal samples, was determined by the method of Lowry using BSA as the



standard [36]. This characterization is presented in Figure 4A in the Results section of this paper.

**2.10 Measurement of mitochondrial function.** Mitochondrial function of skin fibroblasts was assessed by following the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) reduction. Active mitochondrial dehydrogenases cleavage and reduce the soluble yellow MTT dye into the insoluble purple formazan [37]. Cells were incubated with MG (30 and 300  $\mu\text{M}$ ) and MG-BSA<sub>low</sub> and MG-BSA<sub>high</sub> (0.01, 0.1 and 1 mg / mL) for 3 and 24 h at 37 °C. At the end of the incubation period, MTT test were performed. The formazan formation was spectrophotometrically assayed at 570 nm and 630 nm, and the net  $\Delta A_{(570-630)}$  was taken as an index of mitochondrial function. Results are indicated as percentage of controls, to which 100% activity was attributed.

**2.11 ROS production determination.** Intracellular ROS production was detected using the non-fluorescent cell permeating compound, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) in treated skin fibroblasts (see above). DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to the fluorescent dichloro-fluorescein (DCF) by cellular oxidants. MG and MG-BSA-exposed fibroblasts were treated with 10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA for 30 min at 37°C. Afterwards, the cells were scraped into PBS with 0.2% TritonX-100. The fluorescence was measured with excitation at 485 nm and emission at 520 nm. Calibration curve was performed with standard DCF (0- 500  $\mu\text{M}$ ) and the level of ROS production was calculated as nmol DCF formed/ mg protein and expressed as percentage of controls.

**2.12 Measurement of the respiratory chain enzyme activities.** Complex I activity was measured by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm ( $1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) as previously described [38]. The activity of succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase (complex II) was determined according to the method of Fischer et al. [39], and complex I-CoQ-III activity (NADH:cytochrome c oxidoreductase) was assayed according to the method described by Schapira et al. [40]. The activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was assessed according to Rustin et al. [41]. The methods described to measure these activities were slightly modified, as detailed in a previous report [30]. The activities of the respiratory chain complexes were

calculated as  $\mu\text{mol or nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ . The enzyme activities were measured using a Varian Cary 50 spectrophotometer with temperature control (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA).

**2.13 Mitochondrial oxygen consumption.** Oxygen consumption was determined in 24 h MG-BSA-treated skin fibroblast at 37°C. Non-permeabilized skin fibroblasts were suspended in 4.4mM potassium phosphate buffer pH 7.4, containing 0.3 M sucrose, 5 mM MOPS, 1 mM EGTA and 0.1% bovine serum albumin at a cell concentration of 500,000 cells / mL. Respiration was measured at 37 °C by high-resolution respirometry using the Oroboros® oxygraph with chamber volumes set at 2 mL [42]. DatLab software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) was used for data acquisition (1 or 2 s time intervals) and analysis. The experimental regime was started with routine respiration, which is defined as respiration without additional substrates or effectors. After observing steady-state respiratory flux in the time interval between 15 and 30 min, the ATP synthase activity was inhibited with oligomycin (1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ), followed by uncoupling of oxidative phosphorylation by stepwise titration of FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) up to optimum FCCP concentrations of 5.6  $\mu\text{M}$  (80 % of maximal mitochondrial electron transfer activity). A typical titration curve is shown in Figure 6B. Finally, respiration was inhibited by sequential addition of rotenone (0.5  $\mu\text{M}$ ; to test for the effect of inhibiting complex I activity) and antimycin A (2.5  $\mu\text{M}$ ; inhibiting complex III).

**2.14 Protein determination.** Sample protein content was determined by the method of Lowry using bovine serum albumin as the standard [36].

**2.15 Statistical analysis.** Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Percentages of rat weight gain (initial body weight was considered as 100%) data were analyzed by using two-way ANOVA for repeated measures. Data from biochemical determinations were analyzed using one-way ANOVA followed by the *post hoc* Duncan multiple range test when *F* was significant. Only significant *F* values were given in the text. For analysis of dose-dependent effects, linear regression was used. Differences between the groups were rated significant at  $P \leq 0.05$ . Statistics were performed using SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences software; version 16.0 for Windows). All graphs were performed by using GraphPad Prism 5®.

### 3. RESULTS

#### ***3.1. Effect of 10 and 30 days of INS administration in bodyweight (BW) gain and blood glucose concentrations in adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats***

Figure 1A shows the effect of INS administration in bodyweight (BW) gain in adult STZ-administered Wistar rats. STZ treatment caused a significant reduction in the BW gain (starting after six days with 9.5 % of reduction and reaching 30 % of reduction at the end of the treatment), when comparing to controls. On the other side, INS treatment avoided the loss of weight induced by STZ and after twenty-four days of treatment the gain in the BW was increased in these animals respect to controls (8.5 % of increment at day 24 and 12.5 % of increment at day 30) (Two-way ANOVA for repeated measures analysis showed significant effects between groups: Control, STZ and STZ + INS) [ $F=414.27$ ;  $P<0.001$ ] and days of treatment - 30 days - [ $F=8.91$ ;  $P<0.001$ ]; interaction was observed between groups and days of treatment [ $F=4.11$ ;  $P<0.001$ ];  $n= 4 - 5$  per group). Figure 1B shows that INS treatment was adequate to control blood glucose levels both, after 10 and 30 days of STZ administration (protocol for 10 days: at day 7= [ $F_{(2,12)}=70.16$ ;  $P<0.001$ ], at day 10= [ $F_{(2,9)}=398.82$ ;  $P<0.001$ ], protocol for 30 days: at day 7= [ $F_{(2,26)}=37.72$ ;  $P<0.001$ ], at day 15= [ $F_{(2,16)}=153.20$ ;  $P<0.001$ ], at day 30= [ $F_{(2,19)}=786.49$ ;  $P<0.001$ ]).

Insert Figure 1 about here (Portrait layout).

#### ***3.2 Early and late effects of INS administration in mitochondrial complex activities in peripheral tissues from adult STZ-administered Wistar rats***

Figures 2A, B and C show the effect of INS administration on the enzymatic activities of the respiratory complexes in mitochondrial suspensions obtained from skeletal and cardiac muscles, kidney and liver from STZ-induced hyperglycemic rats. As shown in figure 2A, the long-term hyperglycemic condition (30 days) provoked a significant inhibition of the activities of the mitochondrial complexes I, II and IV, (up to 22 %, 43 % and 36 %, respectively) in skeletal muscle, effect that was prevented by the daily administration of INS (complex I: [ $F_{(2,20)}=13.96$ ;  $P<0.001$ ]; complex II: [ $F_{(2,20)}=6.01$ ;  $P<0.01$ ]; complex IV: [ $F_{(2,6)}=5.61$ ;  $P<0.05$ ]). Similarly, cardiac muscle showed a reduction in these complex activities after 30 days of treatment (up to 35 %, 45 % and 34 %, respectively) (complex I: [ $F_{(2,16)}=40.77$ ;  $P<0.001$ ]; complex

II: [ $F_{(2,19)}=9.77$ ;  $P<0.001$ ]; complex IV: [ $F_{(2,6)}=7.26$ ;  $P<0.05$ ]); however, this tissue was more sensitive to the hyperglycemic state, showing a significant complex IV inhibition (up to 17 %) as early as 10 days of treatment [ $F_{(2,6)}=5.99$ ;  $P<0.05$ ] (Figure 2B). A different mitochondrial metabolic profile was observed for liver and kidney tissues. The liver showed a significant reduction in the activities of complexes I and II of the respiratory chain after 30 days of hyperglycemia (up to 45 % and 34 % of inhibition, respectively); however, INS treatment only rescue from complex II inhibition and provoked a marked increase in complex IV activity (73 % of increment compared to controls) (complex I: [ $F_{(2,20)}=5.22$ ;  $P<0.05$ ]; complex II: [ $F_{(2,19)}=88.24$ ;  $P<0.001$ ]; complex IV: [ $F_{(2,6)}=25.83$ ;  $P<0.001$ ]) (Figure 2C). In addition, ten days of hyperglycemia elicited increased liver complex II activity that was prevented by the hormone replacement (59 % of increment compared to controls) [ $F_{(2,9)}=6.90$ ;  $P<0.05$ ] (Figure 2C). Neither the short- nor the long-term hyperglycemic state modified the activities of the mitochondrial complexes in the kidney. However, the INS treatment provoked marked increased mitochondrial activities (up to 36 %, 346 % and 35 % of increment, respectively) (complex I: [ $F_{(2,17)}=6.62$ ;  $P<0.01$ ]; complex II: [ $F_{(2,20)}=131.14$ ;  $P<0.001$ ]; complex IV: [ $F_{(2,6)}=19.13$ ;  $P<0.01$ ]) (Figure 2D).

Insert Figures 2A, B and C about here (Landscape layout).

### ***3.3 Effect of INS administration on DNA oxidation in skeletal muscle from adult STZ-administered Wistar rats***

Figures 3 show the effect of INS administration on DNA oxidation in skeletal muscle from adult STZ-administered Wistar rats. The chronic hyperglycemia (30 days) induced by STZ administration provoked marked DNA oxidation (up to 1650 % of increment), effect that was abolished by INS therapy [ $F_{(2,38)}= 16.84$ ;  $P<0.001$ ].

Insert Figures 3 about here (Portrait layout).

### ***3.4 In vitro effect of methylglyoxal (MG)-induced glycated albumin (MG-BSA<sub>low</sub> and MG-BSA<sub>high</sub>) on respiratory chain complex activities in mitochondrial preparations from skeletal muscle and hepatic tissues***

Figure 4A shows the characterization of BSA derivatives after MG exposure. It can be observed that MG treatment reduced the content of free BSA amino acid residues (up to 71 % of reduction; Figure 4A); induced the formation of Maillard compounds (up to 2,046 % of

increment; Figure AII); increased the content of BSA carbonyl groups (up to 4,339 % of increment; Figure AIII), and increased the oxidation of amino acid residues that reacts with the Folin reagent in the protein determination by the Lowry method (up to 19 % of reduction; Figure AIV). This MG-oxidized BSA was used for the following *in vitro* experiments. Figure 4B shows that 3 h exposure to MG-BSA (oxidized by high MG concentrations; 100mM; MG-BSA<sub>high</sub>) elicited a significant inhibition on complex I-III and II activities (up to 76 % and 85 % of inhibition, respectively) in adult rat skeletal muscle mitochondrial suspensions (complex I-III [ $F_{(6,14)}=23.91$ ;  $P<0.001$ ]; complex II [ $F_{(6,14)}=18.66$ ;  $P<0.001$ ]). The inhibition elicited by 1 mg / mL MG-BSA<sub>high</sub> was similar to the effect induced by the classic complex I inhibitor, rotenone (10  $\mu$ M); however, the effect on complex II activity was 2-fold more severe than the inhibitor nitropropionic acid (1 mM). A similar inhibition rate was observed for these mitochondrial complexes after exposing (3 h) hepatic mitochondrial preparations to MG-BSA<sub>high</sub> (Figure 4C); however, this tissue was more resistant to the AGE inhibitory effect comparing to skeletal muscle (complex I up to 36 % and complex II up to 76.5 % of inhibition) (complex I-III [ $F_{(6,14)}=18.82$ ;  $P<0.001$ ]; complex II [ $F_{(6,14)}=13.56$ ;  $P<0.001$ ]).

Insert Figure 4A about here (Portrait layout).

Insert Figures 4B and C about here (Portrait layout).

### ***3.5 Short and long-term in vitro effect of methylglyoxal (MG) and MG-induced glycated albumin (MG-BSA<sub>low</sub> and MG-BSA<sub>high</sub>) on mitochondrial oxidative stress in primary rat skin fibroblasts***

Figure 5A shows that 3 h exposure to 0.1 and 1 mg / mL MG-BSA<sub>high</sub> elicited a significant reduction in mitochondrial function as indicated by the ratio between MTT reduction (activities of dehydrogenases) and DCF oxidation (content of reactive species) [ $F_{(3,8)}=20.25$ ;  $P<0.001$ ]. In addition, it can be observed that a longer MG-BSA exposure (24 h; Figure 5B) provoked mitochondrial oxidative stress at concentrations, as low as, 0.1 mg / mL of MG-BSA<sub>low</sub>, with the higher effect at 1 mg / mL MG-BSA<sub>high</sub> (up to 36.5 % of oxidative stress-induced reduction in mitochondrial function) (MG-BSA<sub>low</sub>: [ $F_{(3,8)}=12.40$ ;  $P<.01$ ]; MG-BSA<sub>high</sub>: [ $F_{(3,8)}=10.32$ ;  $P<0.01$ ]). Furthermore, MG exposure also provoked a significant reduction in mitochondrial function as seen by the marked reduction in the MTT reduction / DCF oxidation

ratio (up to 36.5 % for 3 h and 24 h treatments) (3 h [ $F_{(2,6)}= 199.80$ ;  $P<0.001$ ]; 24 h [ $F_{(2,6)}= 101.21$ ;  $P<0.001$ ]).

Insert Figures 5A and B about here (Portrait layout).

### ***3.6 Long-term in vitro effect of MG-induced glycated albumin (MG-BSA<sub>low</sub> and MG-BSA<sub>high</sub>) on mitochondrial respiration in primary rat skin fibroblasts***

Figure 6A shows that exposing skin fibroblasts to 1 mg / mL MG-BSA<sub>low</sub> or 1 mg / mL MG-BSA<sub>high</sub> during 24 h provoked a significant inhibition of the electron transfer activity stimulated by FCCP (5.6  $\mu$ M) (up to 43 % and 49 % of inhibition for MG-BSA<sub>low</sub> and MG-BSA<sub>high</sub>, comparing to BSA) [ $F_{(3,8)}= 22.63$ ;  $P<0.001$ ] (Figure 6A). Respiration without the addition of substrates (routine respiration) showed a slight and non-significant inhibition, which was clearly amplified by using the FCCP strategy (Figure 6B). The treatment with inhibitors did not alter the oxygen consumption when skin fibroblasts were treated with MG-BSA. One-day treatment of skin fibroblasts with lower (0.01 and 0.1 mg / mL) concentrations of MG-BSA<sub>low</sub> and MG-BSA<sub>high</sub> did not modify any respiratory parameters (data not shown).

Insert Figures 6A and B about here (Portrait layout).

## **4. DISCUSSION**

Diabetes mellitus is a major metabolic disorder in which oxidative stress and free radical production have been implicated through several lines of evidence, and much of the long-term pathology of DM appears to occur as a consequence of the persistent hyperglycemic condition. Four major processes are thought to interplay and promote the micro- and macrovascular changes characteristic of the DM condition, namely the formation, auto-oxidation, and interaction with cell receptors of AGEs; activation of various isoforms of protein kinase C; induction of the polyol pathway; and increasing hexosamine pathway flux (for a review see [15]). The association of these processes with oxidative stress has been linked for some time with various sources proposed for the underlying production of reactive oxygen species (ROS) [30, 31]; moreover, it has been suggested that increased mitochondrial superoxide overproduction during hyperglycemia might

contribute to the onset, progression and pathological consequences of DM [32, 33].

***Persistent hyperglycemia results in peripheral tissue-specific patterns of energy metabolism deficit possibly due to protein oxidation***

It is known that mitochondrial complexes I and III are the major sites of ROS generation under physiological conditions [34, 35], and an overt ROS production is observed when these redox centers are blocked or their content is reduced [36, 37]. Moreover, complex I is the rate-limiting enzyme in oxidative phosphorylation (OXPHOS) [38]. Therefore, any modification of the function of this complex could have a direct impact on the overall energy state of the cell. In line with this, our study showed a severe impairment of energy metabolism in peripheral tissues of hyperglycemic rats. Complex I, II and IV activities in skeletal and cardiac muscles were significantly reduced after 30 days of hyperglycemia. Furthermore, cardiac tissue was found to be the most sensitive to the diabetic condition, since energy metabolism in this tissue was impaired after 10 days of the hyperglycemic condition. Different mitochondrial metabolic oxidative profiles were observed in liver and kidney tissues from STZ-exposed animals. In the liver there was a significant reduction in the activities of complexes I and II of the respiratory chain after 30 days of hyperglycemia, and a marked increase in complex II activity after 10 days of hyperglycemia, while in the kidneys there was no change in the OXPHOS system in STZ animals.

This differential tissue vulnerability to hyperglycemia could be related to early and persistent high levels of glucose or MG inducing epigenetic changes as previously reported, *e.g.* increased expression of NF- $\kappa$ B p65 subunit promoter [39] or reduced levels of mRNA for the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) [40]. In line with this, PGC-1 $\alpha$  is able to up-regulate nuclear genes that are required for mitochondrial biogenesis, including the OXPHOS genes [41], and it has been proposed that this factor sets the specific aerobic oxidative capacity for cardiac tissue [42]. On the other hand, PGC-1 $\alpha$  expression has been reported to be reduced in human diabetes [40]; therefore, the deficiency in PGC-1 $\alpha$  in hyperglycemic conditions could result in a different pattern of changes in energy metabolism mainly as a result of the metabolic properties and mitochondrial content of the tissues, as shown here. In agreement with this, it is known that PGC-1 $\alpha$  expression is induced by AMP-dependent kinase (AMPK) activation [43], while a deficiency in the activity of this enzyme has been

hypothesized to occur for this cell energy sensor under diabetic conditions [44].

On the other hand, the overexpression of NF- $\kappa$ B (a free radical-sensitive transcription factor), which has been demonstrated by El-Osta and co-workers, in both cultured human aortic endothelial cells and in non-diabetic mice [39], would aid in reducing the OXPHOS activities by eliciting a downstream persistent oxidative stress cascade that would finally converge to inhibit mitochondrial function. In line with this, it was observed that the chronic hyperglycemic condition results in MG-AGE accumulation (Remor et al, 2011, unpublished results) and in severe DNA oxidation in skeletal muscle (Figure 3), a tissue highly dependent on mitochondrial energetics.

The observed reduction in OXPHOS enzyme activities in the heart after short and longer periods of hyperglycemia would lead to a situation of pseudo-hypoxia, where the diabetic heart is not able to utilize oxygen properly; however, in these circumstances there is no reduction in tissue oxygen tension. The cardiac tissue is also unable to produce energy anaerobically, and the inadequate oxygen consumption would lead to enhanced free radical production, with the tissue therefore suffering from marked impairment in oxidative metabolism. Consequently, therapies designed to improve mitochondrial biogenesis / function would protect the diabetic failing heart.

The different patterns of hyperglycemia-induced changes in OXPHOS in the STZ-affected tissues analyzed here could also be related to the cellular MG concentration, which may be due partly to specific expression of the glyoxalase system, the main MG detoxifying pathway, together with molecules such as glutathione, polyamines, carnosine, creatine, and pyridoxamine, which normally exhibit protective carbonyl-scavenging activity towards glycating compounds, avoiding, therefore, the formation of AGEs [45]. In agreement with this, we observed a marked reduction in complexes I and II of the respiratory chain in methylglyoxal-bovine serum albumin (MG-BSA)-exposed skeletal muscle and liver mitochondria from non-treated rats. Furthermore, mitochondrial oxidative stress was induced by both MG-BSA and MG, with short and longer periods of incubation, and this effect impaired mitochondrial physiology (cell respiration), since oxygen consumption was significantly inhibited after the MG-BSA treatment in skin fibroblasts.



### ***Differential insulin-induced effects on peripheral hyperglycemia-related changes in mitochondrial bioenergetics***

Insulin administration was effective in protecting against the hyperglycemia-induced inhibition of mitochondrial OXPHOS enzymes, possibly due to its demonstrated capacity to modulate the levels of mRNA for genes encoding the respiratory chain complexes. Insulin administration also increased OXPHOS activities in kidney from STZ-treated animals, where the hyperglycemic state did not alter electron transport activity. It has been reported that insulin exerts part of its protective activity through activation of the phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-Akt pathway, which is known as the pro-survival pathway [46]. Furthermore, Teshima and co-workers (2010) demonstrated that insulin treatment is capable of down-regulating PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) and phospho-PTEN [47], a phosphatase that dephosphorylates the second messenger produced by PI3K, thereby interrupting the downstream activation of Akt [46]. On the other hand, PTEN could be up-regulated by increased ROS production, mitochondrial dysfunction and/or persistent hyperglycemia [46, 47]; therefore, it is possible that the severe changes in energy metabolism observed in this study accompanying STZ exposure, elicited by both glucose toxicity and lack of insulin, were mediated by the inhibition of Akt signaling. Additionally, the long-term insulin exposure increased the mitochondrial oxidative capacity of the tissue, although this was observed with short-term hormone replacement only when there was an STZ-inhibitory effect.

### ***AGE-disrupted mitochondrial function***

MG and MG-BSA exposure significantly altered mitochondrial function in preparations of this organelle from liver and skeletal muscle tissues, as well as in skin fibroblasts. These results agree with previous reports indicating that AGE exposure (24 h) results in increased expression of RAGE [48], and that AGE-RAGE interaction leads to ROS production and loss of membrane mitochondrial potential [49], which would subsequently lead to reduced ATP synthesis. Here, significant induction of mitochondrial oxidative stress (a decreased MTT reduction:DCF oxidation ratio) was observed after exposing skin fibroblasts to oxidized albumin, with the effect being more pronounced when cells were treated for 24 h. In addition, the observed AGE-induced inhibition of electron transport chain enzyme activities in mitochondrial preparations was also reflected in the rate of oxygen consumption in rat dermal fibroblasts. Therefore, it appears that the reduced mitochondrial

activity in peripheral tissues from STZ rats was mediated, in part, by hyperglycemia-induced AGE formation.

### ***Conclusions***

Here we demonstrated that hyperglycemia results in tissue-specific patterns of energy deficiency and that early and continuous insulin therapy is necessary to maintain proper mitochondrial oxidative metabolism via mechanisms that may determine the rate of mitochondrial oxygen consumption and, therefore, ATP synthesis. Moreover, hyperglycemia predisposed tissue to AGE formation and AGE-induced mitochondrial oxidative stress, which might not only damage mitochondria themselves, but also impair energetics by inhibiting the rate of electron transfer. Thus, insulin replacement appears to have an essential role in the maintenance of mitochondrial homeostasis under diabetic conditions, particularly in the heart, the peripheral tissue in which energetics relies primarily on mitochondrial oxidative metabolism.

### **Acknowledgments**

The authors are grateful to Dr. Gareth Cuttle, English native speaker, for checking the language of this manuscript. This work was supported by grants from FAPESC (Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Bem AF, Saraiva-Gonçalves CA and Latini A are CNPq fellows.

## **5. REFERENCES**

1. S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, and H. King, Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030, *Diabetes Care*, 27 (2004) 1047-53.
2. American Diabetes Association, Standards of medical care in diabetes--2010, *Diabetes Care*, 33 Suppl 1 (2010) S11-61.
3. J.L. Gross, M.J. de Azevedo, S.P. Silveiro, L.H. Canani, M.L. Caramori, and T. Zelmanovitz, Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment, *Diabetes Care*, 28 (2005) 164-76.

4. A.J. Boulton, A.I. Vinik, J.C. Arezzo, V. Bril, E.L. Feldman, R. Freeman, R.A. Malik, R.E. Maser, J.M. Sosenko, and D. Ziegler, Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association, *Diabetes Care*, 28 (2005) 956-62.
5. A.I. Vinik, R.E. Maser, B.D. Mitchell, and R. Freeman, Diabetic autonomic neuropathy, *Diabetes Care*, 26 (2003) 1553-79.
6. P.G. Camici and F. Crea, Coronary microvascular dysfunction, *N Engl J Med*, 356 (2007) 830-40.
7. M. Wei, S.P. Gaskill, S.M. Haffner, and M.P. Stern, Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study, *Diabetes Care*, 21 (1998) 1167-72.
8. H. Brem, P. Sheehan, H.J. Rosenberg, J.S. Schneider, and A.J. Boulton, Evidence-based protocol for diabetic foot ulcers, *Plast Reconstr Surg*, 117 (2006) 193S-209S; discussion 210S-211S.
9. J.S. Skyler, R. Bergenstal, R.O. Bonow, J. Buse, P. Deedwania, E.A. Gale, B.V. Howard, M.S. Kirkman, M. Kosiborod, P. Reaven, and R.S. Sherwin, Intensive glycemic control and the prevention of cardiovascular events: implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA diabetes trials: a position statement of the American Diabetes Association and a scientific statement of the American College of Cardiology Foundation and the American Heart Association, *Circulation*, 119 (2009) 351-7.
10. E.J. Feskens and D. Kromhout, Glucose tolerance and the risk of cardiovascular disease: the Zutphen Study, *J Clin Epidemiol*, 45 (1992) 1327-34.
11. T.J. Orchard and T. Costacou, When are type 1 diabetic patients at risk for cardiovascular disease?, *Curr Diab Rep*, 10 (2010) 48-54.
12. D.M. Nathan, P.A. Cleary, J.Y. Backlund, S.M. Genuth, J.M. Lachin, T.J. Orchard, P. Raskin, and B. Zinman, Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes, *N Engl J Med*, 353 (2005) 2643-53.
13. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 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 (1993) 977-86.

14. P. Reichard, B.Y. Nilsson, and U. Rosenqvist, The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus, *N Engl J Med*, 329 (1993) 304-9.
15. M. Brownlee, The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism, *Diabetes*, 54 (2005) 1615-25.
16. P.J. Thornalley, A. Langborg, and H.S. Minhas, Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose, *Biochem J*, 344 Pt 1 (1999) 109-16.
17. P.J. Beisswenger, Z. Makita, T.J. Curphey, L.L. Moore, S. Jean, T. Brinck-Johnsen, R. Bucala, and H. Vlassara, Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes, *Diabetes*, 44 (1995) 824-9.
18. D.R. McCance, D.G. Dyer, J.A. Dunn, K.E. Bailie, S.R. Thorpe, J.W. Baynes, and T.J. Lyons, Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus, *J Clin Invest*, 91 (1993) 2470-8.
19. H.P. Hammes, A. Alt, T. Niwa, J.T. Clausen, R.G. Bretzel, M. Brownlee, and E.D. Schleicher, Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy, *Diabetologia*, 42 (1999) 728-36.
20. R. Bucala and H. Vlassara, Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease, *Am J Kidney Dis*, 26 (1995) 875-88.
21. G. Basta, A.M. Schmidt, and R. De Caterina, Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes, *Cardiovasc Res*, 63 (2004) 582-92.
22. M.E. Cooper, Importance of advanced glycation end products in diabetes-associated cardiovascular and renal disease, *Am J Hypertens*, 17 (2004) 31S-38S.
23. K.F. Petersen, S. Dufour, D. Befroy, R. Garcia, and G.I. Shulman, Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes, *N Engl J Med*, 350 (2004) 664-71.
24. M.G. Rosca, T.G. Mustata, M.T. Kinter, A.M. Ozdemir, T.S. Kern, L.I. Szweda, M. Brownlee, V.M. Monnier, and M.F. Weiss, Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation, *Am J Physiol Renal Physiol*, 289 (2005) F420-30.

25. Y. Kaji, S. Amano, T. Usui, T. Oshika, K. Yamashiro, S. Ishida, K. Suzuki, S. Tanaka, A.P. Adamis, R. Nagai, and S. Horiuchi, Expression and function of receptors for advanced glycation end products in bovine corneal endothelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44 (2003) 521-8.
26. M. Kasper, C. Roehlecke, M. Witt, H. Fehrenbach, A. Hofer, T. Miyata, C. Weigert, R.H. Funk, and E.D. Schleicher, Induction of apoptosis by glyoxal in human embryonic lung epithelial cell line L132, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23 (2000) 485-91.
27. U. Denis, M. Lecomte, C. Paget, D. Ruggiero, N. Wiernsperger, and M. Lagarde, Advanced glycation end-products induce apoptosis of bovine retinal pericytes in culture: involvement of diacylglycerol/ceramide production and oxidative stress induction, *Free Radic Biol Med*, 33 (2002) 236-47.
28. G. Romeo, W.H. Liu, V. Asnaghi, T.S. Kern, and M. Lorenzi, Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes, *Diabetes*, 51 (2002) 2241-8.
29. J. Kim, C.S. Kim, E. Sohn, I.H. Jeong, H. Kim, and J.S. Kim, Involvement of advanced glycation end products, oxidative stress and nuclear factor-kappaB in the development of diabetic keratopathy, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, (2010)
30. A. Latini, C.G. da Silva, G.C. Ferreira, P.F. Schuck, K. Scussiato, J.J. Sarkis, C.S. Dutra Filho, A.T. Wyse, C.M. Wannmacher, and M. Wajner, Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues, *Mol Genet Metab*, 86 (2005) 188-99.
31. S.M. Keira, L.M. Ferreira, A. Gragnani, I.d.S. Duarte, and I.A.N.d. Santos, Experimental model for fibroblast culture, *Acta Cir Bras*, 19 (2004)
32. M.E. Westwood, A.C. McLellan, and P.J. Thornalley, 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 (1994) 32293-8.
33. A.F. Habeeb, Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid, *Anal Biochem*, 14 (1966) 328-36.
34. K.M. Biemel, O. Reihl, J. Conrad, and M.O. Lederer, Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes: unraveling

- the structure of a pentosidine precursor, *J Biol Chem*, 276 (2001) 23405-12.
35. A.Z. Reznick and L. Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol*, 233 (1994) 357-63.
  36. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 193 (1951) 265-75.
  37. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*, 65 (1983) 55-63.
  38. A. Cassina and R. Radi, Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport, *Arch Biochem Biophys*, 328 (1996) 309-16.
  39. J.C. Fischer, W. Ruitenbeek, J.A. Berden, J.M. Trijbels, J.H. Veerkamp, A.M. Stadhouders, R.C. Sengers, and A.J. Janssen, Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle, *Clin Chim Acta*, 153 (1985) 23-36.
  40. A.H. Schapira, V.M. Mann, J.M. Cooper, D. Dexter, S.E. Daniel, P. Jenner, J.B. Clark, and C.D. Marsden, Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease, *J Neurochem*, 55 (1990) 2142-5.
  41. P. Rustin, D. Chretien, T. Bourgeron, B. Gerard, A. Rotig, J.M. Saudubray, and A. Munnich, Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies, *Clin Chim Acta*, 228 (1994) 35-51.
  42. E. Hutter, K. Renner, G. Pfister, P. Stockl, P. Jansen-Durr, and E. Gnaiger, Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts, *Biochem J*, 380 (2004) 919-28.
  43. P. Rosen, P.P. Nawroth, G. King, W. Moller, H.J. Tritschler, and L. Packer, 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 (2001) 189-212.
  44. I.C. West, Radicals and oxidative stress in diabetes, *Diabet Med*, 17 (2000) 171-80.
  45. T. Nishikawa, D. Edelstein, X.L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M.A. Yorek, D. Beebe, P.J. Oates, H.P.

- Hammes, I. Giardino, and M. Brownlee, Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage, *Nature*, 404 (2000) 787-90.
46. X.L. Du, D. Edelstein, L. Rossetti, I.G. Fantus, H. Goldberg, F. Ziyadeh, J. Wu, and M. Brownlee, 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 (2000) 12222-6.
47. A. Boveris, E. Cadenas, and A.O. Stoppani, Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide, *Biochem J*, 156 (1976) 435-44.
48. Q. Chen, E.J. Vazquez, S. Moghaddas, C.L. Hoppel, and E.J. Lesnefsky, Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III, *J Biol Chem*, 278 (2003) 36027-31.
49. J.F. Turrens, Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain, *Biosci Rep*, 17 (1997) 3-8.
50. J.F. Turrens and A. Boveris, Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria, *Biochem J*, 191 (1980) 421-7.
51. C. Chinopoulos and V. Adam-Vizi, Mitochondria deficient in complex I activity are depolarized by hydrogen peroxide in nerve terminals: relevance to Parkinson's disease, *J Neurochem*, 76 (2001) 302-6.
52. A. El-Osta, D. Brasacchio, D. Yao, A. Poci, P.L. Jones, R.G. Roeder, M.E. Cooper, and M. Brownlee, Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia, *J Exp Med*, 205 (2008) 2409-17.
53. V.K. Mootha, C.M. Lindgren, K.F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehar, P. Puigserver, E. Carlsson, M. Ridderstrale, E. Laurila, N. Houstis, M.J. Daly, N. Patterson, J.P. Mesirov, T.R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E.S. Lander, J.N. Hirschhorn, D. Altshuler, and L.C. Groop, PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes, *Nat Genet*, 34 (2003) 267-73.
54. R.C. Scarpulla, Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells, *Gene*, 286 (2002) 81-9.

55. A. Garnier, D. Fortin, C. Delomenie, I. Momken, V. Veksler, and R. Ventura-Clapier, Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles, *J Physiol*, 551 (2003) 491-501.
56. P. Puigserver and B.M. Spiegelman, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator, *Endocr Rev*, 24 (2003) 78-90.
57. A. Gugliucci, "Blinding" of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: a mechanism that allows perpetuation of hepatic insulin resistance?, *Med Hypotheses*, 73 (2009) 921-4.
58. A.R. Hipkiss, Glycation, ageing and carnosine: are carnivorous diets beneficial?, *Mech Ageing Dev*, 126 (2005) 1034-9.
59. V. Duronio, The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway, *Biochem J*, 415 (2008) 333-44.
60. Y. Teshima, N. Takahashi, L.C. Thuc, S. Nishio, Y. Nagano-Torigoe, H. Miyazaki, K. Ezaki, K. Yufu, M. Hara, M. Nakagawa, and T. Saikawa, High-glucose condition reduces cardioprotective effects of insulin against mechanical stress-induced cell injury, *Life Sci*, 87 (2010) 154-61.
61. M.T. Coughlan, D.R. Thorburn, S.A. Penfold, A. Laskowski, B.E. Harcourt, K.C. Sourris, A.L. Tan, K. Fukami, V. Thallas-Bonke, P.P. Nawroth, M. Brownlee, A. Bierhaus, M.E. Cooper, and J.M. Forbes, RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes, *J Am Soc Nephrol*, 20 (2009) 742-52.
62. W. Cai, J.C. He, L. Zhu, C. Lu, and H. Vlassara, Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 13801-6.



## LEGENDS TO FIGURES AND SCHEME

**Scheme 1.** Experimental design. Hyperglycemic conditions were induced by intraperitoneal administration of streptozotocin (STZ). The glycemic control was achieved by treating with insulin (INS; 1.5 UI Novolin®N) twice a day.

**Figure 1.** Effect of 10 and 30 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin®N insulin twice / day) administration in bodyweight gain (BW) (A) and blood glucose concentrations in adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats (B). Data represent mean  $\pm$  standard deviation (5 to 9 animals / group). BW significant differences between controls and STZ animals started on day 6 (\*), between controls and STZ+INS animals on day 5 (#) and between controls and STZ + INS rats on day 24 (&) (Two-way ANOVA for repeated measures). Glycemia was controlled with 1.5 UI Novolin®N insulin twice a day and measure at days 7 and 10 for 10 day-hyperglycemic treatment and at days 7, 15 and 30 for 30 day-treatment. \* $P$ <0.05; \*\*\* $P$ <0.001, compared to the control group. ### $P$ <0.001, compared to the STZ group (One-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test).

**Figure 2.** Effect of 10 and 30 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin®N insulin twice / day) administration on the activities of the complexes I, II and IV of the respiratory chain in skeletal muscle (AI–III), cardiac muscle (BI–III), liver (CI–III) and kidney (DI–III) from adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats. Data represent mean  $\pm$  standard deviation (3 to 9 animals / group). \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001, compared to controls. #  $P$ <0.05; ## $P$ <0.01; ### $P$ <0.001, compared to STZ group (One-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test).

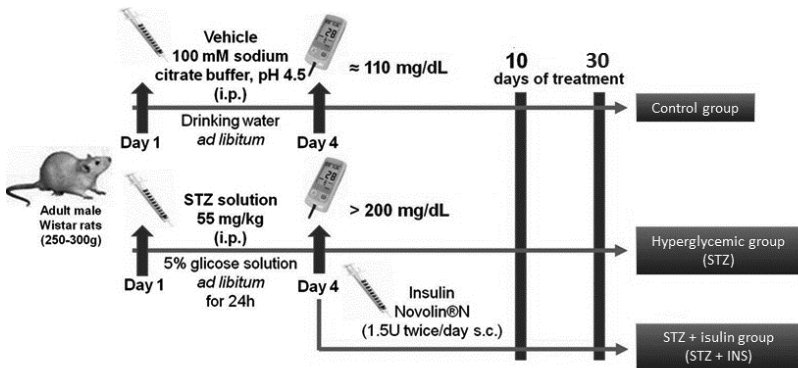
**Figure 3.** Effect of 30 days of insulin (INS; 1.5 UI Novolin®N insulin twice / day) administration on DNA oxidation in skeletal muscle from adult streptozotocin (STZ)-administered Wistar rats. DNA oxidation were identified as described in M&M. For relative immunocontent quantification, total pixels intensity was determined and data were expressed as average of optical density (O.D.). \*\*\* $P$ <0.001, compared to controls. (One-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test). A, Control; B, STZ; C, STZ + INS.

**Figure 4.** Characterization of bovine serum albumin (BSA) derivatives induced by methylglyoxal (MG) exposure (MG-BSA) (A), and *in vitro* effect of MG-BSA on respiratory chain complex activities in mitochondrial preparations from skeletal and liver tissues (B and C). Suspensions of mitochondria from skeletal muscle (B) and hepatic tissue (C) were exposed to MG-BSA for 3h. Data represent mean  $\pm$  standard deviation (3 experiments / group). Control values (nmol  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg protein<sup>-1</sup>) for *skeletal muscle* complex I activity:  $173 \pm 16.0$ , complex II:  $3.70 \pm 0.50$ , and complex: IV  $61.7 \pm 22.0$ ; control values for *liver* complex I activity:  $186 \pm 16.3$ , complex II:  $1.17 \pm 0.70$  and complex IV:  $151 \pm 33.0$ . BSA: bovine serum albumin. MG-BSA<sub>high</sub>= BSA oxidized by high MG concentrations; 100 mM. MG-BSA<sub>low</sub>= albumin oxidized by low MG concentrations; 1 mM. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , compared to controls. For further details about MG-BSA synthesis see M&M) (One-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test).

**Figure 5.** Short and long-term *in vitro* effect of methylglyoxal (MG) and methylglyoxal-induced glycated albumin (MG-BSA) on mitochondrial oxidative stress in primary rat skin fibroblasts. Mitochondrial oxidative stress was estimated as the ratio between MTT reduction (activities of dehydrogenases) and DCF oxidation (content of reactive species) (see M&M for further details). Data represent mean  $\pm$  standard deviation (3 experiments / group). MG: methylglyoxal. BSA: bovine serum albumin. MG-BSA<sub>high</sub>= BSA oxidized by high MG concentrations; 100 mM. MG-BSA<sub>low</sub>= albumin oxidized by low MG concentrations; 1 mM. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , compared to controls. (One-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test).

**Figure 6.** Long-term *in vitro* effect of methylglyoxal (MG)-induced glycated albumin (MG-BSA) on mitochondrial respiration (A), and stepwise titration carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) curve (B) in primary rat skin fibroblasts. The mitochondrial oxygen consumption (pmol O<sub>2</sub>  $\cdot$  s<sup>-1</sup>  $\cdot$  10<sup>-6</sup> cells) under routine respiration, oligomycin, FCCP and rotenone + antimycin A conditions were assessed as indicated in M&M. Data represent mean  $\pm$  standard deviation (3 experiments / group). MG-BSA<sub>high</sub>= BSA oxidized by high MG concentrations; 100 mM. MG-BSA<sub>low</sub>= albumin oxidized by low MG concentrations; 1 mM. \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , compared to BSA (1mg / mL) (One-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test).

## Scheme 1



**Figure 1**

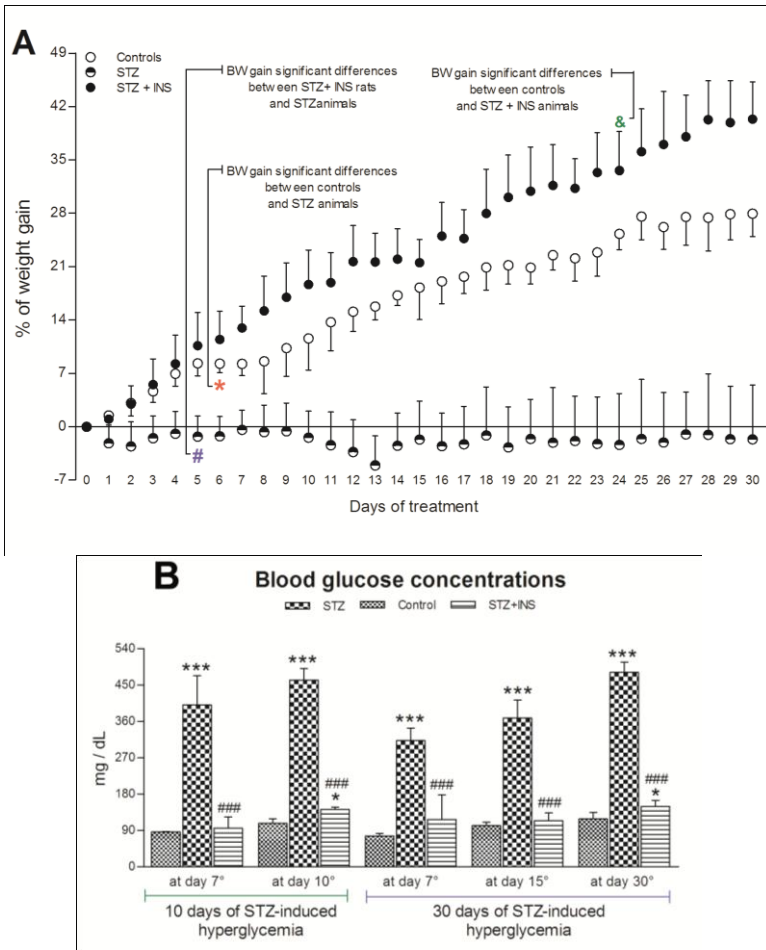
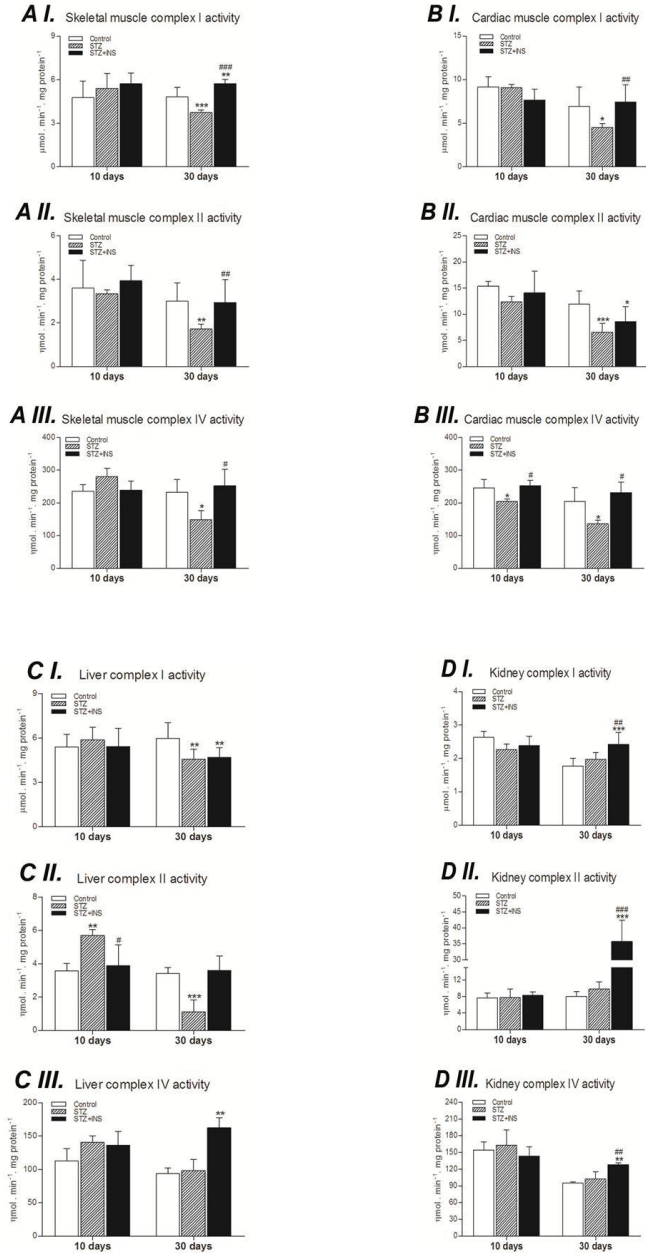


Figure 2



**Figure 3**

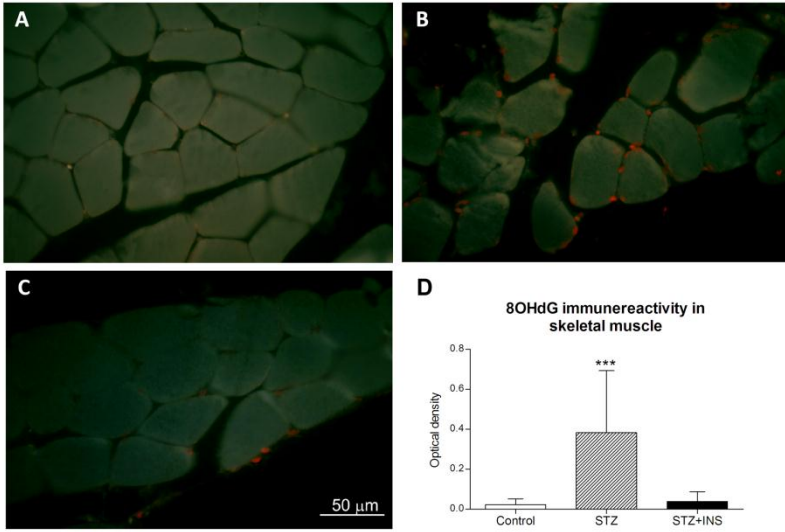


Figure 4A

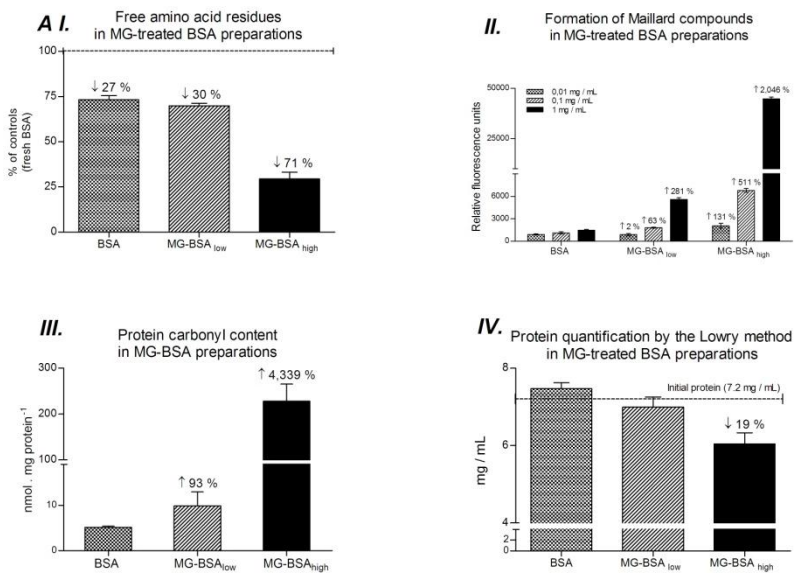


Figure 4B and C

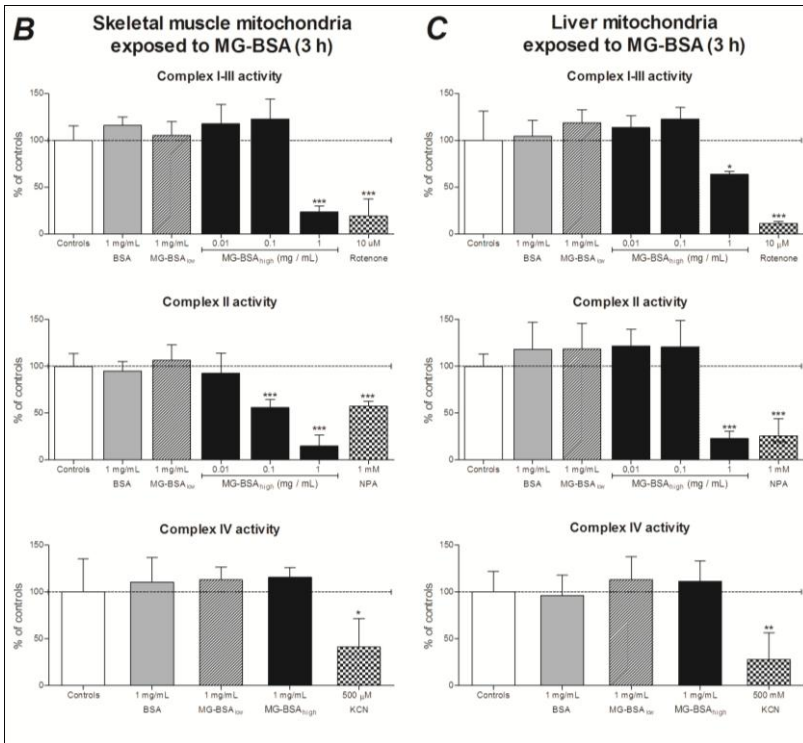




Figure 5

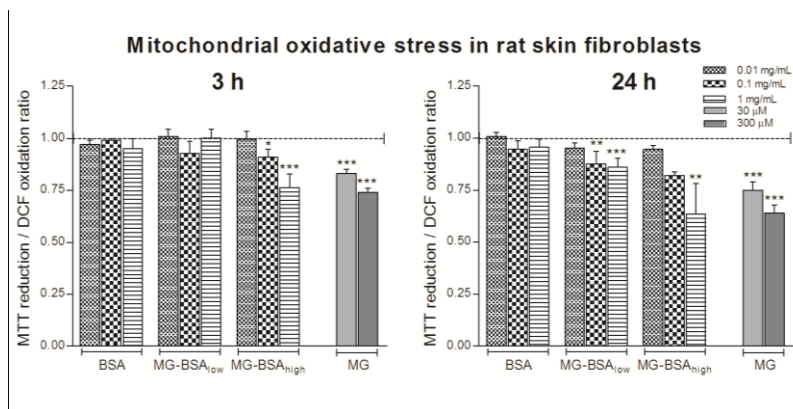
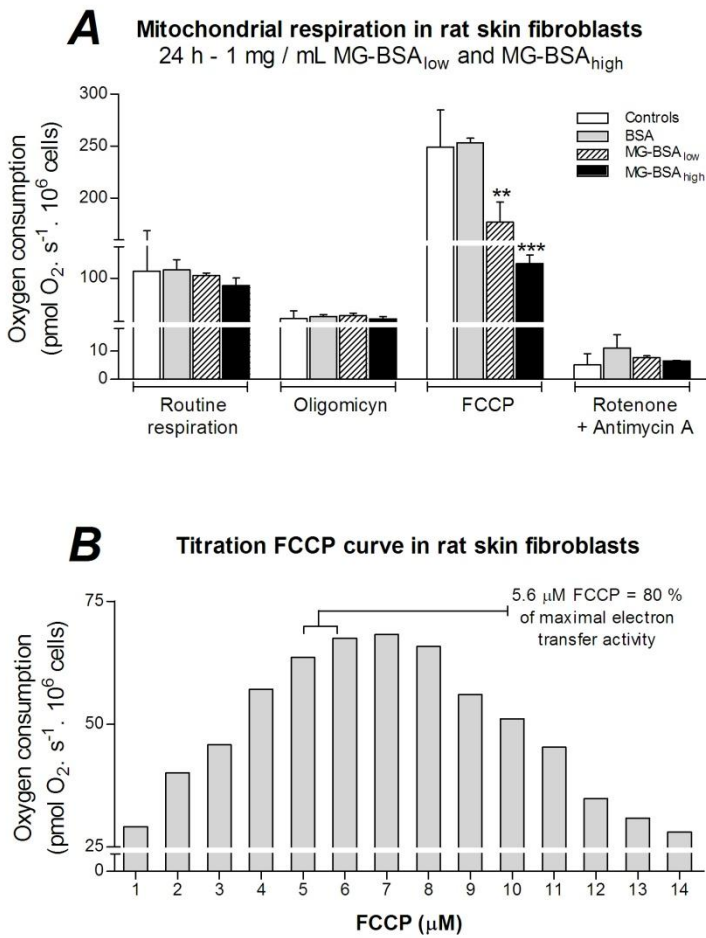


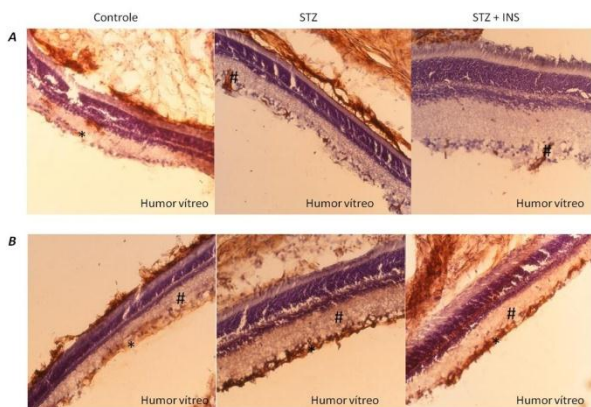
Figure 6



### 5.3 RESULTADOS PRELIMINARES

Os resultados preliminares apresentados nesta sessão foram realizados durante o desenvolvimento do Mestrado Sanduíche realizado na *Universidad Nacional de Córdoba*, Córdoba, Argentina, durante o período de 17 de setembro de 2009 a 20 de novembro de 2009 sob a coordenação da professora co-orientadora deste trabalho, María Cecilia Sánchez. Este estágio internacional foi financiado pelo Programa de Centros Associados para o Fortalecimento das Pós-Graduações Brasil / Argentina (CAFP/B-A, CAPES/SPU 001/2008).

Após a indução do modelo *in vivo* de hiperglicemia por 30 dias como descrito no item 4.1.3, os olhos dos animais foram retirados e processados conforme descritos na sessão de Material e Métodos. Posteriormente, foram realizadas técnicas de imunohistoquímica para identificação de formação de neovasos (formação de novos vasos) através do anticorpo anti-GSA-lectina e de estresse celular empregando o anticorpo anti-GFAP.

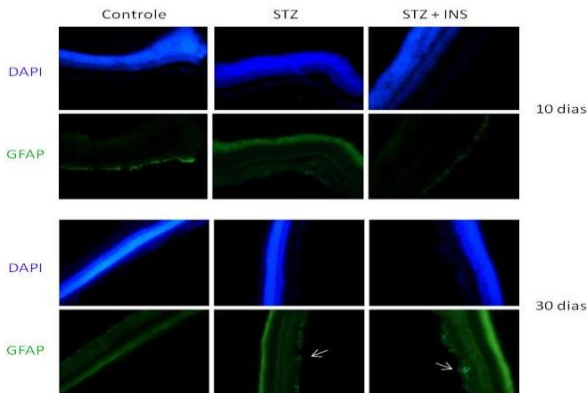


**Figura 12. Efeito da hiperglicemia induzida por estreptozotocina (STZ) na formação de neovasos e estresse celular na retina de ratos Wistar adultos.** Os animais permaneceram hiperglicêmicos por 30 dias e posteriormente tiveram os olhos removidos para a realização de técnicas de imunohistoquímica com marcação para GSA-lectina (neovascularização) (A) e para GFAP (estresse celular) (B). Painel A: \*vasos; #neovasos. Painel B: \*GFAP em astrócitos; #células de Müller. STZ: animais hiperglicêmicos; STZ + INS: animais hiperglicêmicos com administração de insulina (1,5 UI de insulina Novolin® N humana duas vezes ao dia).

A Figura 12A mostra a formação de novos vasos na retina de ratos que permaneceram hiperglicêmicos por um período de 30 dias. Pode-se observar a presença de neovasos sanguíneos na retina de animais hiperglicêmicos (Grupo STZ) quando comparados com o grupo controle. Os animais que tiveram a glicemia controlada pela administração de insulina (Grupo STZ + INS), também apresentaram neovascularização, mostrando que este tratamento não conseguiu prevenir a vasculogênese.

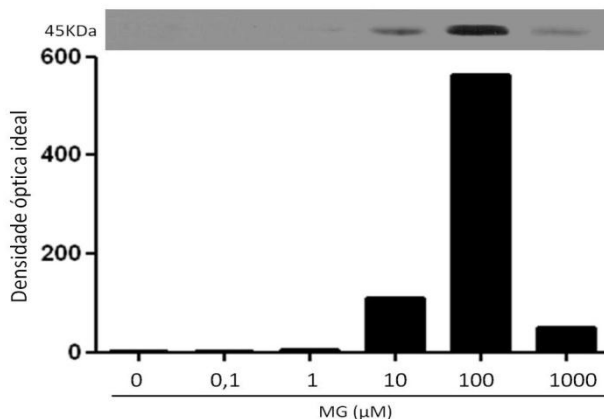
A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é uma proteína marcadora de células astrogliais. Em condições de estresse celular, esta proteína também é expressa em células de Müller de retina. Como mostra na Figura 12B, não houve imunoreatividade para GFAP nas células de Müller no grupo STZ, nem no grupo STZ + INS.

Foram também realizadas técnicas de imunofluorescência para identificação de GFAP em retina de animais que permaneceram hiperglicêmicos por 10 e 30 dias. Como mostra a Figura 13 houve uma maior imunoreatividade para GFAP nos animais que permaneceram hiperglicêmicos (Grupo STZ) por 30 dias quando comparadas com o grupo controle. A insulina não foi capaz de prevenir este efeito.



**Figura 13. Efeito da hiperglicemia induzida por estreptozotocina (STZ) na indução de estresse celular em retina de ratos Wistar adultos.** Os animais permaneceram hiperglicêmicos por 10 e 30 dias e posteriormente tiveram os olhos removidos para a realização de técnicas de imunofluorescência com marcação para GFAP. STZ: animais hiperglicêmicos; STZ + INS: animais hiperglicêmicos com administração de insulina (1,5 UI de insulina Novolin<sup>®</sup> N humana duas vezes ao dia). As setas indicam a presença de GFAP nas células astrogliais.

Após, foi investigado o efeito de concentrações crescentes de MG (0-1000  $\mu\text{M}$ ) sobre o conteúdo de GFAP em células da linhagem celular MIO-M1 humana. As células foram incubadas com o metabólito durante oito horas e posteriormente foi determinada a concentração de GFAP. Pode-se observar um aumento da expressão desta proteína quando as células foram expostas a 100  $\mu\text{M}$  de MG.



**Figura 14. Efeito *in vitro* do metilglioxal (MG) no conteúdo de GFAP em linhagem celular MIO-M1 humana.** As células foram tratadas durante 8 horas com diferentes concentrações de MG (0-1000  $\mu\text{M}$ ). Os resultados são representativos de um experimento preliminar. Na figura é indicado o peso molecular de 45 kDa que representa a proteína GFAP.

## 6 DISCUSSÃO

O DM é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla caracterizada pela persistente hiperglicemia decorrente da falta de insulina e/ou da resistência dos tecidos à ação do hormônio (Han et al., 2007; Malecki e Skupien, 2008). Projeta-se que até o ano de 2030, cerca de 366 milhões de indivíduos no mundo estejam acometidos por esta doença (Wild et al., 2004).

A alta morbidade e mortalidade associadas ao DM devem-se principalmente ao desenvolvimento de alterações patológicas na vasculatura (Winer e Sowers, 2004). Estas alterações podem ser microvasculares, incluindo retinopatia, nefropatia e neuropatia central e periférica, que por sua vez podem desencadear em alterações macrovasculares, como aterosclerose, doença vascular periférica, infarto do tecido cerebral e/ou amputações dos membros inferiores (Wei et al., 1998; Brownlee, 2001; Zimmet et al., 2001; Brem et al., 2006; Wirotko et al., 2008). Numerosos estudos clínicos têm demonstrado que tais alterações vasculares podem ser atenuadas se nos estágios mais precoces da doença (cinco anos iniciais da doença) houver um controle glicêmico eficiente. Este fenômeno é conhecido como “memória metabólica”, onde o constante controle glicêmico nos estágios mais iniciais da doença resultaria em efeitos benéficos, principalmente no que se refere às complicações vasculares (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; Nathan et al., 2005; ADA, 2010).

A persistente hiperglicemia parece contribuir na fisiopatologia das alterações vasculares através da indução de quatro processos principais, incluindo a formação de AGEs, ativação de várias isoformas da proteína cinase C e aumento do fluxo das vias dos polióis e hexosaminas (Brownlee, 2005). Ainda, tem sido demonstrado que estes processos culminam com a formação de EROs (West, 2000; Rosen et al., 2001), portanto, as alterações patológicas na vasculatura podem se relacionar com a indução de estresse oxidativo ocasionado pela persistente hiperglicemia.

Os principais componentes geradores de EROs são os complexos I e III da cadeia respiratória, sendo que a produção destes aumenta no caso de um bloqueio na transferência de elétron (Swerdlow et al., 1996; Turrens, 1997; Nicholls e Budd, 2000; Lenaz, 2001; Sipos et al., 2003; Bell et al., 2007). Neste cenário, sabe-se que as EROs e as espécies reativas do nitrogênio, incluindo o óxido nítrico, podem inibir vários complexos da cadeia respiratória, bem como alterar o DNA mitocondrial (Degli Esposti, 2002; Radi et al., 2002), gerando um

círculo vicioso entre o bloqueio da transferência de elétrons e a produção de espécies reativas. Neste sentido, foi também demonstrado que deficiências nas atividades dos complexos da cadeia respiratória são acompanhadas pela depleção de tióis celulares (glutationa; principal tiol celular), e ainda que o grau de inibição da cadeia respiratória é proporcional à magnitude da depleção desse antioxidante (Barker et al., 1996; Chen et al., 2003).

Além disso, o déficit energético e o aumento da produção de espécies reativas podem levar secundariamente a uma diminuição na atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase com conseqüente despolarização da membrana plasmática, perda da homeostase celular, excitotoxicidade secundária e/ou ativação das cascatas de apoptose (Beal, 1995; Massieu e Tapia, 1997; Beal, 2005).

Embora todos os tecidos do organismo estejam expostos aos altos níveis de glicose durante períodos de hiperglicemia, o cérebro parece ser o mais sensível aos efeitos tóxicos deste nutriente celular, principalmente devido a: *i*) grande tráfego de  $\text{Ca}^{2+}$  através das membranas neuronais; *ii*) altas concentrações de neurotransmissores que podem sofrer auto-oxidação e induzirem a formação de EROs; *iii*) altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados que facilmente podem ser peroxidados e liberar produtos tóxicos, como por exemplo o malondialdeído; *iv*) baixa quantidade de defesas antioxidantes quando comparado com outros órgãos, como por exemplo, o fígado (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Diferente do resto do organismo, a nutrição das células nervosas possui uma constante demanda de glicose e a captação desta é independente da ação da insulina. Assim, a concentração de glicose em células nervosas é dependente da quantidade de glicose presente na circulação. Neste sentido, alguns estudos têm demonstrado que em condições de hiperglicemia o cérebro se encontraria exposto a quantidades de glicose quatro vezes maiores do que o normal, favorecendo desta forma uma condição tóxica provocada pelos altos níveis de glicose (Tomlinson e Gardiner, 2008).

### **Aumento da atividade da creatina cinase mitocondrial como um efeito compensatório às alterações do metabolismo energético no modelo experimental de hiperglicemia induzido pela administração de STZ**

Neste estudo foi demonstrado que a persistente hiperglicemia está envolvida em processos de estresse oxidativo, através do aumento da peroxidação lipídica e diminuição dos grupos tióis observados no

sangue dos animais expostos à condições de hiperglicemia durante um período de 60 dias. Este fenômeno poderia estar relacionado com o aumento no fluxo da via dos polióis, o qual deixaria os tecidos mais sensíveis ao estresse oxidativo pela consequente diminuição dos níveis de NAD(P)H, sendo este um cofator essencial para a manutenção das atividades de enzimas relacionadas com o metabolismo da glutatona (Brownlee, 2001). Ainda, foi observada uma diminuição nos níveis da molécula antioxidante BH4 no líquido dos animais expostos à hiperglicemia. Esta molécula é um cofator obrigatório para as enzimas que participam na síntese de neurotransmissores e também de ON (Cosentino e Luscher, 1999). Neste sentido, o estresse oxidativo observado neste estudo, poderia alterar a neurotransmissão e a fisiologia da vasculatura, contribuindo o desenvolvimento de infarto, demência vascular ou DA (Arvanitakis et al., 2004; Biessels et al., 2006), conferindo desta forma um papel patogênico para BH4 nos processos neurodegenerativos.

Por outro lado, numerosos estudos têm demonstrado que a iNOS pode ser ativada em condições de hiperglicemia (Sobrevia et al., 1996), levando ao aumento na produção de ON e a um rápido consumo do cofator BH4 que excederia a sua capacidade de síntese *de novo*. Além disso, sabe-se que a BH4 tem a capacidade de sequestrar radicais ON comprometendo ainda mais as concentrações desta pterina. Assim, esta situação potencializaria a toxicidade induzida pelos altos níveis de glicose no cérebro, contribuindo para a neurodegeneração.

Por outro lado, a mitocôndria possui um papel chave durante a produção de ATP, o qual é essencial para a excitabilidade e a sobrevivência dos neurônios, e qualquer mudança durante a redução do oxigênio irá favorecer a formação de EROs. Como já foi descrito anteriormente, os complexos I e III da cadeia respiratória são os principais geradores de EROs (Boveris et al., 1976; Chen et al., 2003), e esta situação se intensifica quando ocorre um bloqueio durante a transferência de elétrons (Turrens e Boveris, 1980; Turrens, 1997). Além disso, as espécies reativas formadas no complexo I (NADH desidrogenase) são liberadas na matriz mitocondrial (Chen et al., 2003), provocando dano oxidativo nas enzimas mitocondriais, incluindo os complexos da cadeia respiratória, enzimas do ciclo de Krebs, cinases e várias outras proteínas, bem como o DNA mitocondrial (Bandy e Davison, 1990; Zhang et al., 1990; Hausladen e Fridovich, 1994). Neste sentido, a severa inibição na atividade dos complexos da cadeia respiratória observada nos animais expostos à hiperglicemia poderia estar



comprometendo a viabilidade nos neurônios por desencadear a apoptose, como foi observado neste estudo.

Adicionalmente, neste trabalho foi também demonstrado, um mecanismo compensatório caracterizado pelo aumento da atividade da CK no cérebro e tecidos periféricos, possivelmente mediado pela deficiência no metabolismo energético induzida pela persistente hiperglicemia. A enzima CK é responsável por catalisar a reação reversível de transferência de um grupo fosforil entre o ATP e a creatina (Bessman e Carpenter, 1985). Desta forma, possui a capacidade de gerar energia na forma de ATP para tecidos que necessitam de constante abastecimento energético, como os músculos esquelético e cardíaco e o cérebro, de uma forma muito mais rápida do que durante o processo de fosforilação oxidativa (Wallimann e Hemmer, 1994). Além disso, a localização da CK isoforma mitocondrial, permite regular o potencial de membrana mitocondrial, prevenindo dessa forma a indução do poro de transição mitocondrial (Dolder et al., 2003). Como foi observado um déficit energético e um aumento na ativação da caspase-3 nos animais que ficaram expostos a altos níveis de glicose, seria viável afirmar que o aumento na atividade da CK poderia ser um mecanismo compensatório para manter o estado energético celular. Ainda, a expressão da CK nos diversos tecidos correlaciona de forma inversa com a capacidade de peroxidase tecidual (Meyer et al., 2006); no entanto, foi observado um aumento nesta atividade no tecido hepático após dez dias de hiperglicemia. Isto poderia estar relacionado com uma sinalização celular patológica ou ainda relacionado com um aumento da atividade da CK presente no endotélio vascular. Neste sentido, numerosos estudos sugerem que muitos genes podem sofrer mudanças epigenéticas e responder de forma diferente em condições de hiperglicemia, como por exemplo, podem aumentar a expressão de VEGF (Ishizuka et al., 2011) e NF- $\kappa$ B, o qual compromete a fosforilação oxidativa devido à formação de estresse oxidativo com consequente redução da função mitocondrial (El-Osta et al., 2008) ou diminuir os níveis de mRNA do co-ativador PGC-1 $\alpha$  (Mootha et al., 2003) o qual possui a capacidade de aumentar a expressão de genes responsáveis pela biogênese mitocondrial (Scarpulla, 2002). Desta forma, a deficiência do PGC-1 $\alpha$  decorrente do estado hiperglicêmico, poderia resultar em diferentes alterações no metabolismo energético, tanto uma severa diminuição na atividade da cadeia transportadora de elétrons quanto um aumento na atividade da CK.

Devido à severa deficiência na transferência de elétrons observada nos tecidos periféricos e no cérebro dos animais

hiperglicêmicos, poderia se esperar um aumento na glicólise anaeróbica. No entanto, neste estudo, a atividade da HK se mostrou deficiente no tecido hepático de animais que ficaram expostos a altas concentrações de glicose por um período de dez dias. Neste sentido, a deficiência da atividade da HK mitocondrial foi previamente descrita em modelos experimentais da DA, possivelmente ocasionada pela toxicidade gerada através dos agregados protéicos característicos desta enfermidade (Saraiva et al., 2010).

A administração exógena de insulina mostrou ser efetiva em controlar os níveis de glicemia nos animais que permaneceram hiperglicêmicos por 10, 30 ou 60 dias, sendo capaz de prevenir as alterações no metabolismo energético cerebral. Esta propriedade protetora da insulina estaria relacionada provavelmente com a via de sinalização da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)-Akt (Duronio, 2008), a qual é responsável por garantir a sobrevivência das células. A proteína PTEN é uma fosfatase que defosforila a PI3K, interrompendo assim a ativação desta via. Neste sentido, a literatura tem demonstrado que a insulina é capaz de diminuir a expressão da PTEN e por consequência, manter a via da PI3K ativa (Teshima et al., 2010). Por outro lado, a terapia com insulina não preveniu o estresse oxidativo tanto no sangue, como no líquido e tecido cerebral. Este achado poderia ser explicado através de evidências que demonstram que a persistente hiperglicemia pode estar relacionada com o aumento na produção de EROs, disfunção mitocondrial e/ou pela sua capacidade de aumentar a expressão de PTEN (Duronio, 2008; Teshima et al., 2010).

Por fim, neste estudo foi demonstrado que o estrito controle da glicemia preveniu muitas das alterações observadas no metabolismo energético, mas por outro lado, não controlou a indução do estresse oxidativo. Esta falha poderia estar relacionada com o pico agudo de hiperglicemia (dois dias) que ocorreu logo no início da doença, mais precisamente no período entre a confirmação da indução de hiperglicemia através da administração de estreptozotocina e o início da administração de insulina exógena, o que poderia ter favorecido as mudanças epigenéticas decorrentes da hiperglicemia, como citado anteriormente.

### **Alterações do metabolismo energético no modelo experimental de hiperglicemia induzido pela administração de STZ: Envolvimento dos produtos finais de glicação (AGEs)**

Neste estudo foi demonstrada uma severa deficiência no metabolismo energético em tecidos periféricos de ratos hiperglicêmicos

induzidos pela administração de STZ. As atividades dos complexos I, II e/ou IV da cadeia respiratória se encontraram significativamente diminuídas após 10 e/ou 30 dias de persistente hiperglicemia no músculo esquelético, coração e fígado; enquanto que o rim não mostrou tais alterações. Este diferente comportamento no metabolismo oxidativo mitocondrial nos tecidos expostos à hiperglicemia poderia estar relacionado, como previamente proposto, tanto com a sensibilidade de cada tecido à persistente hiperglicemia, bem como com mudanças epigenéticas ocasionadas pelos altos níveis de glicose ou MG formado.

Estas mudanças epigenéticas incluiriam a alteração na expressão de vários genes, como por exemplo, um aumento na expressão de NF- $\kappa$ B, o qual compromete a fosforilação oxidativa devido à formação de estresse oxidativo com consequente redução da função mitocondrial (El-Osta et al., 2008), ou à diminuição dos níveis de mRNA do co-ativador PGC-1 $\alpha$  (Mootha et al., 2003), o qual possui a capacidade de aumentar a expressão de genes responsáveis pela biogênese mitocondrial (Scarpulla, 2002). A redução na expressão do PGC-1 $\alpha$  parece estar também relacionada com uma atividade deficiente da cinase dependente de AMP (AMPK), visto que como previamente proposto, esta cinase não responderia à deficiência celular em condições de hiperglicemia por se encontrar oxidada pela presença de MG (Puigserver e Spiegelman, 2003; Gugliucci, 2009).

A administração de insulina exógena nos animais hiperglicêmicos preveniu as inibições verificadas nas atividades das enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa. Isto se deve, provavelmente por sua capacidade de modular positivamente os níveis de mRNA de genes responsáveis pela codificação dos complexos da cadeia respiratória (Duronio, 2008). Este efeito pode ser comprovado através do comportamento do tecido renal, onde o tratamento com insulina induz um aumento das atividades dos complexos da cadeia transferidora de elétrons. Esta propriedade protetora da insulina, como já foi discutida nesta sessão, poderia estar relacionada com a via de sinalização da PI3K-Akt, a qual é responsável por garantir a sobrevivência das células e ainda, a uma diminuição na expressão da PTEN (Duronio, 2008; Teshima et al., 2010).

Por outro lado, neste estudo foi também verificado que a exposição de MG-BSA às preparações mitocondriais, tanto de músculo esquelético quanto de fígado, provoca uma diminuição significativa na atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória. Neste sentido, sabe-se que os AGEs têm a capacidade de estimular a expressão dos seus receptores RAGEs (Coughlan et al., 2009), e a interação AGE-

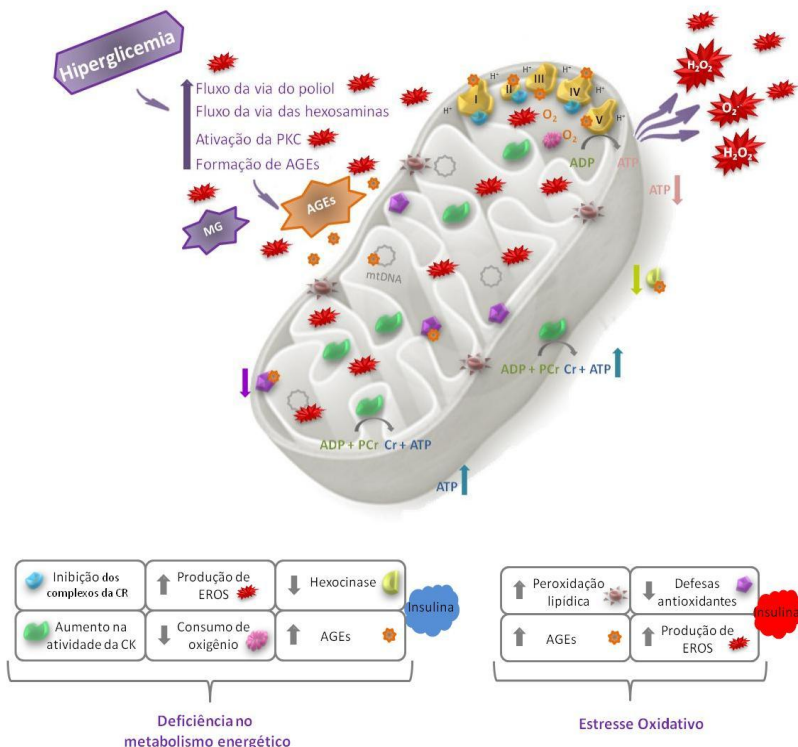
RAGE provoca secundariamente a produção de EROs, bem como a perda do potencial de membrana mitocondrial (Cai et al., 2006), culminando com a redução na síntese de ATP. Desta forma, foi também observada a indução de estresse oxidativo mitocondrial em fibroblastos de pele expostos a MG e MG-BSA, através da significativa diminuição na redução do MTT e a taxa de oxidação da sonda fluorescente DCF. Além disso, foi observada uma inibição significativa na transferência de elétrons destas células, diminuindo desta forma o consumo de oxigênio. Com base nisto, a redução da atividade mitocondrial nos tecidos periféricos de animais expostos à STZ parecem ser mediados, em parte, pela formação de AGEs.

## 7 CONCLUSÕES

- O estado hiperglicêmico provocou severa deficiência no metabolismo energético (diminuição nos complexos I, II e/ou IV da cadeia respiratória) do músculo esquelético, coração e fígado em animais que permaneceram nestas condições por períodos de 10 e/ou 30 dias. O rim não apresentou tais alterações, e a administração exógena de insulina preveniu as inibições observadas nesses tecidos;
- A exposição de preparações mitocondriais de músculo e fígado ao MG-BSA provocou inibições nos complexos I e II da cadeia respiratória. A exposição de fibroblastos de pele de rato a MG e MG-BSA induziram estresse oxidativo mitocondrial observado pela diminuição na redução do MTT e o aumento na taxa de oxidação da sonda fluorescente DCF. Além disso, a exposição dos diferentes sistemas experimentais *in vitro* ao MG-BSA provocou uma inibição significativa na transferência de elétrons, diminuindo como consequência o consumo de oxigênio mitocondrial;
- A persistente hiperglicemia provocou estresse oxidativo por aumentar os níveis de peroxidação lipídica, e diminuir a concentração de tióis livres no sangue dos animais tratados com STZ. Além disso, as concentrações da molécula antioxidante BH4 se encontraram reduzidas no líquido;
- A condição de persistente hiperglicemia também provocou severas inibições nas atividades dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória em cérebro de animais tratados com STZ. Além disso, o estado hiperglicêmico ocasionou um aumento na atividade da CK mitocondrial e/ou total no cérebro e tecidos periféricos, possivelmente como um mecanismo compensatório na tentativa de manter o estado energético celular. Ainda, estas alterações bioquímicas foram acompanhadas por uma inibição da atividade da HK no fígado dos animais hiperglicêmicos;
- O estado hiperglicêmico provocou aumento na clivagem da caspase-3 no cérebro, sugerindo a indução de apoptose;
- A administração de insulina exógena foi capaz de proteger as alterações no metabolismo energético celular, mas não foi efetiva na prevenção de estresse oxidativo.

## 8 CONCLUSÃO GERAL

A hiperglicemia crônica causa severa deficiência no metabolismo energético celular tanto no cérebro quanto nos tecidos periféricos. Esta deficiência parece ser um gatilho para induzir um mecanismo compensatório, o qual foi demonstrado pelo aumento na atividade da enzima CK. Ainda, o estrito e inicial controle dos níveis de glicemia se mostrou eficaz na prevenção das alterações observadas no metabolismo energético mitocondrial. Por outro lado, a persistente hiperglicemia provocou estresse oxidativo, e a normalização dos níveis glicêmicos não foi eficiente em prevenir este processo, provavelmente devido às mudanças epigenéticas que estão relacionadas com o aumento na produção de EROs (Figura 15).



**Figura 15. Efeitos celulares envolvidos durante períodos de hiperglicemia persistente.** *Deficiência no metabolismo energético:* 1) Inibição dos complexos da CR; 2) Aumento na produção de EROs; 3) Diminuição no consumo de oxigênio; 4) Diminuição na síntese de ATP; 5) Diminuição na atividade da hexoquinase; 6) Aumento na produção de AGEs; 7) Aumento na atividade da creatinaquinase como um mecanismo compensatório. *Estresse Oxidativo:* 1) Aumento na peroxidação lipídica; 2) Diminuição das defesas antioxidantes; 3) Aumento na produção de EROs; 4) aumento na formação de AGEs. MG: metilgloxal; AGEs: produtos de glicação terminal; Pcr: fosfocreatina; Cr: creatina; CK: creatinaquinase; CR: cadeia respiratória; EROs: espécies reativas de oxigênio

## 9 PERSPECTIVAS

- Padronizar um modelo de hiperglicemia relacionado com o desenvolvimento de obesidade em camundongos Swiss (Aubert et al., 1980), afim de melhor entender os mecanismo patológicos causados pela hiperglicemia;
- Identificar o acúmulo de metilglioxal e produtos de glicação final (AGEs) em sangue, líquido e/ou tecido cerebral nos roedores, visto que estes compostos estão relacionados com a produção de EROs, oxidação de proteínas, inativação de enzimas, alterações no sistema de defesa antioxidante, entre outros. Ainda, verificar se a administração de insulina exógena e/ou da metformina poderiam prevenir tais alterações;
- Investigar a atividade de uma das proteínas reguladoras do metabolismo energético, AMPK e o conteúdo de AMPK/AMPK fosforilada, em diferentes estruturas cerebrais. Ainda, verificar sua relação com as concentrações do mRNA e o conteúdo imunoproteico do fator angiogênio VEGF, da óxido nítrico sintase endotelial e da hemeoxigenase-1 e a produção de EROs;
- Investigar a respiração celular (respirometria), a gênese mitocondrial (microscopia eletrônica) e a formação de óxido nítrico nos modelos experimentais de hiperglicemia;
- Investigar o efeito *in vitro* do MG e MG-BSA sobre a atividade da AMPK em astrócitos e/ou fibroblastos de pele de rato em preparações comerciais de proteína purificada;
- Verificar a relação entre hiperglicemia e doenças neurodegenerativas através da administração i.n. de MPTP, visto que este composto é capaz de simular a doença de Parkinson, e investigar o conteúdo da enzima tirosina hidroxilase, atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e perfil de neurotransmissores e pterinas.



## 10 REFERÊNCIAS ADICIONAIS

- Abbott MA, Wells DG, Fallon JR (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J Neurosci* 19:7300-7308.
- Abordo EA, Westwood ME, Thornalley PJ (1996) Synthesis and secretion of macrophage colony stimulating factor by mature human monocytes and human monocytic THP-1 cells induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. *Immunol Lett* 53:7-13.
- ADA (2010) American Diabetes Association, Standards of medical care in diabetes. In, pp S11-61: *Diabetes Care*.
- Adamis AP, Altaweel M, Bressler NM, Cunningham ET, Jr., Davis MD, Goldbaum M, Gonzales C, Guyer DR, Barrett K, Patel M (2006) Changes in retinal neovascularization after pegaptanib (Macugen) therapy in diabetic individuals. *Ophthalmology* 113:23-28.
- Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, Hager K, Fleischer G, Munch G (2005) Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *J Neurochem* 92:255-263.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, et al. (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331:1480-1487.
- Akhavani MA, Larsen H, Paleolog E (2007) Circulating endothelial progenitor cells as a link between synovial vascularity and cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 36:83-90.
- Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA (2004) Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol* 61:661-666.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS (2001) Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358:221-229.
- Aubert R, Suquet JP, Lemonnier D (1980) Long-term morphological and metabolic effects of early under- and over-nutrition in mice. *J Nutr* 110:649-661.

- Babcock GT, Wikstrom M (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356:301-309.
- Bandy B, Davison AJ (1990) Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med* 8:523-539.
- Banks WA (2004) The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol* 490:5-12.
- Banks WA, Jaskan JB, Kastin AJ (1997) Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18:1257-1262.
- Barker JE, Heales SJ, Cassidy A, Bolanos JP, Land JM, Clark JB (1996) Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity; an enzyme susceptible to oxidative damage. *Brain Res* 716:118-122.
- Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rotig A, Rustin P, Tzagoloff A (2002) Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286:53-63.
- Baskin DG, Figlewicz DP, Woods SC, Porte D, Jr., Dorsa DM (1987) Insulin in the brain. *Annu Rev Physiol* 49:335-347.
- Bates DO, Harper SJ (2002) Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol* 39:225-237.
- Baura GD, Foster DM, Porte D, Jr., Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW (1993) Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest* 92:1824-1830.
- Baynes JW, Thorpe SR (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48:1-9.
- Baynes JW, Dominiczak MH (2007) *Bioquímica Médica*. Rio de Janeiro: Mosby.
- Beal MF (1995) Metabolic disorders and neurotoxicology. *Curr Opin Neurol* 8:467-468.
- Beal MF (2005) Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 58:495-505.
- Beisswenger BG, Delucia EM, Lapoint N, Sanford RJ, Beisswenger PJ (2005) Ketosis leads to increased methylglyoxal production on the Atkins diet. *Ann N Y Acad Sci* 1043:201-210.

- Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwegold BS (1999) Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* 48:198-202.
- Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Moraes CT, Murphy MP, Budinger GR, Chandel NS (2007) The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol* 177:1029-1036.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007) *Biochemistry*, Sixty Edition. New York: W. H. Freeman and Company.
- Bessman SP, Carpenter CL (1985) The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* 54:831-862.
- Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P (2006) Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5:64-74.
- Bittl JA, Ingwall JS (1985) Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A <sup>31</sup>P NMR magnetization transfer study. *J Biol Chem* 260:3512-3517.
- Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 156:435-444.
- Brem H, Sheehan P, Rosenberg HJ, Schneider JS, Boulton AJ (2006) Evidence-based protocol for diabetic foot ulcers. *Plast Reconstr Surg* 117:193S-209S; discussion 210S-211S.
- 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.
- Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R (2009) S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: Implications for astrocyte development, activation, and tumor growth. *J Biol Chem* 284:8797-8811.
- Burgos R, Simo R, Audi L, Mateo C, Mesa J, Garcia-Ramirez M, Carrascosa A (1997) Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are not influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 40:1107-1109.
- Caceres LC, Bonacci GR, Sanchez MC, Chiabrando GA (2010) Activated alpha(2) macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF-

- kappaB activation in macrophage-derived cell lines. *J Cell Biochem* 111:607-617.
- Cadenas E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58:79-110.
- Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-230.
- Cai W, He JC, Zhu L, Lu C, Vlassara H (2006) Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13801-13806.
- Capaldi RA (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 59:569-596.
- Casazza JP, Felver ME, Veech RL (1984) The metabolism of acetone in rat. *J Biol Chem* 259:231-236.
- Ceriello A, Ihnat MA, Thorpe JE (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.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.
- Chance B, Oshino N, Sugano T, Mayevsky A (1973) Basic principles of tissue oxygen determination from mitochondrial signals. *Adv Exp Med Biol* 37A:277-292.
- Chang T, Wu L (2006) Methylglyoxal, oxidative stress, and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 84:1229-1238.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278:36027-36031.
- Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JW, Vaughan DE (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.
- Chou E, Suzuma I, Way KJ, Opland D, Clermont AC, Naruse K, Suzuma K, Bowling NL, Vlahos CJ, Aiello LP, King GL (2002) Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. *Circulation* 105:373-379.
- Clarke M, Dodson PM (2007) PKC inhibition and diabetic microvascular complications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21:573-586.

- Combettes-Souverain M, Issad T (1998) Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab* 24:477-489.
- Cosentino F, Luscher TF (1999) Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 43:274-278.
- Cotter VT (2007) The burden of dementia. *Am J Manag Care* 13 Suppl 8:S193-197.
- Coughlan MT, Thorburn DR, Penfold SA, Laskowski A, Harcourt BE, Sourris KC, Tan AL, Fukami K, Thallas-Bonke V, Nawroth PP, Brownlee M, Bierhaus A, Cooper ME, Forbes JM (2009) RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 20:742-752.
- Craven PA, Studer RK, DeRubertis FR (1994) Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. Evidence for protein kinase C-mediated suppression of the cholinergic response. *J Clin Invest* 93:311-320.
- Cullum NA, Mahon J, Stringer K, McLean WG (1991) Glycation of rat sciatic nerve tubulin in experimental diabetes mellitus. *Diabetologia* 34:387-389.
- Degli Esposti M (2002) Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* 26:335-340.
- Deng Y, Yu PH (1999) Simultaneous determination of formaldehyde and methylglyoxal in urine: involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in diabetic complications. *J Chromatogr Sci* 37:317-322.
- Desai K, Wu L (2007) Methylglyoxal and advanced glycation endproducts: new therapeutic horizons? *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2:89-99.
- Desai KM, Chang T, Wang H, Banigesh A, Dhar A, Liu J, Untereiner A, Wu L (2010) Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Can J Physiol Pharmacol* 88:273-284.
- Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS (1994) Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem* 269:8445-8454.
- Di Donato S (2000) Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 23:247-263.
- Dolder M, Walzel B, Speer O, Schlattner U, Wallimann T (2003) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by

- creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 278:17760-17766.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Duh E, Aiello LP (1999) Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. *Diabetes* 48:1899-1906.
- Duronio V (2008) The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 415:333-344.
- El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, Cooper ME, Brownlee M (2008) Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med* 205:2409-2417.
- El Hadri K, Moldes M, Mercier N, Andreani M, Pairault J, Fève B (2002) Semicarbazide-sensitive amine oxidase in vascular smooth muscle cells: differentiation-dependent expression and role in glucose uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:89-94.
- Enrique-Tarancon G, Marti L, Morin N, Lizcano JM, Unzeta M, Sevilla L, Camps M, Palacin M, Testar X, Carpena C, Zorzano A (1998) Role of semicarbazide-sensitive amine oxidase on glucose transport and GLUT4 recruitment to the cell surface in adipose cells. *J Biol Chem* 273:8025-8032.
- Feener EP, Xia P, Inoguchi T, Shiba T, Kunisaki M, King GL (1996) Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor expression. *Contrib Nephrol* 118:180-187.
- Fernandez-Checa JC (2003) Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:471-479.
- Ferrara N (2001) Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1358-1366.
- Folmer V, Soares JC, Rocha JB (2002) Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1279-1285.
- Gabriely I, Yang XM, Cases JA, Ma XH, Rossetti L, Barzilai N (2002) Hyperglycemia induces PAI-1 gene expression in adipose tissue by activation of the hexosamine biosynthetic pathway. *Atherosclerosis* 160:115-122.

- Ganz MB, 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.
- Giardino I, Edelstein D, Brownlee M (1994) Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest* 94:110-117.
- Gnaiger E (2007) Mitochondrial pathways through complexes I+II: Convergent electron transport at the Q-junction and additive effect of substrate combinations. . In: *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*, 2nd Edition (Gnaiger E, ed), pp 21-37. Axams: Steiger ruck GmbH.
- Gonzalez FJ (1988) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* 40:243-288.
- Gonzalez RG, Miglior S, Von Saltza I, Buckley L, Neuringer LJ, Cheng HM (1988) <sup>31</sup>P NMR studies of the diabetic lens. *Magn Reson Med* 6:435-444.
- Gugliucci A (2009) "Blinding" of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: a mechanism that allows perpetuation of hepatic insulin resistance? *Med Hypotheses* 73:921-924.
- Guyton AC (2006) *Tratado de Fisiologia Médica*. 9ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Halliwell B, Gutteridge JM (2007) *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press.
- Halliwell B (1991) Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 42:569-605.
- Han D, Williams E, Cadenas E (2001) Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 353:411-416.
- Han Y, Randell E, Vasdev S, Gill V, Gadag V, Newhook LA, Grant M, 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.
- Hausladen A, Fridovich I (1994) Superoxide and peroxyntirite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 269:29405-29408.
- Havrankova J, Schmechel D, Roth J, Brownstein M (1978) Identification of insulin in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5737-5741.

- Hempel A, Maasch C, Heintze U, Lindschau C, Dietz R, Luft FC, Haller H (1997) High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ Res* 81:363-371.
- Hopper DJ, Cooper RA (1971) The regulation of Escherichia coli methylglyoxal synthase; a new control site in glycolysis? *FEBS Lett* 13:213-216.
- Hughes BP (1962) A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 7:597-603.
- Huijberts MS, Wolffenbuttel BH, Boudier HA, Crijns FR, Kruseman AC, Poitevin P, Levy BI (1993) Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J Clin Invest* 92:1407-1411.
- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP (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 MA, Thorpe JE, Ceriello A (2006) Hypothesis: the "metabolic memory", the new challenge of diabetes. *Diabetic Med* 24:582-586.
- Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL (1996) Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272:728-731.
- Ishizuka T, Hinata T, Watanabe Y (2011) Superoxide induced by a high-glucose concentration attenuates production of angiogenic growth factors in hypoxic mouse mesenchymal stem cells. *J Endocrinol* 208:147-159.
- James AM, Smith RA, Murphy MP (2004) Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys* 423:47-56.
- Kalapos MP (2008) The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact* 171:251-271.
- Kalaria RN (2002) Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations. *Cerebrovasc Dis* 13 Suppl 2:48-52.
- Kalmijn S, Foley D, White L, Burchfiel CM, Curb JD, Petrovitch H, Ross GW, Havlik RJ, Launer LJ (2000) Metabolic cardiovascular syndrome and risk of dementia in Japanese-



- American elderly men. The Honolulu-Asia aging study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2255-2260.
- Kaneko T, Baba N, Matsuo M (2001) Structure-activity relationship of antioxidants for inhibitors of linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cytotechnology* 35:43-55.
- Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IdS, Santos IANd (2004) Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cir Bras* 19.
- Kennedy EP, Lehninger AL (1950) The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 185:275-285.
- Kennedy EP, Lehninger AL (1951) Activation of fatty acid oxidation by dihydrodiphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem* 190:361-368.
- Kester MI, Scheltens P (2009) Dementia: the bare essentials. *Pract Neurol* 9:241-251.
- Kojo S (2004) Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 11:1041-1064.
- Koop DR, Casazza JP (1985) Identification of ethanol-inducible P-450 isozyme 3a as the acetone and acetol monooxygenase of rabbit microsomes. *J Biol Chem* 260:13607-13612.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416:15-18.
- Kowluru RA, Odenbach S (2004) Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes* 53:3233-3238.
- Kuusisto J, Koivisto K, Mykkanen L, Helkala EL, Vanhanen M, Hanninen T, Kervinen K, Kesaniemi YA, Riekkinen PJ, Laakso M (1997) Association between features of the insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease independently of apolipoprotein E4 phenotype: cross sectional population based study. *BMJ* 315:1045-1049.
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339:1044-1053.
- Lapolla A, Traldi P, Fedele D (2005) Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem* 38:103-115.
- Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M (2005)

- Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86:188-199.
- Le Bras B, Barallobre MJ, Homman-Ludiye J, Ny A, Wyns S, Tammela T, Haiko P, Karkkainen MJ, Yuan L, Muriel MP, Chatzopoulou E, Breant C, Zalc B, Carmeliet P, Alitalo K, Eichmann A, Thomas JL (2006) VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat Neurosci* 9:340-348.
- Lee EY, Chung CH, Kim JH, Joung HJ, Hong SY (2006) Antioxidants ameliorate the expression of vascular endothelial growth factor mediated by protein kinase C in diabetic podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 21:1496-1503.
- Lehninger A, Nelson D, Cox MM (2004) *Principles of Biochemistry*. Fourth edition. New York: W. H. Freeman.
- Lehninger AL, Smith SW (1949) Efficiency of phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. *J Biol Chem* 181:415-429.
- Lenaz G (2001) The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 52:159-164.
- Limb GA, Salt TE, Munro PM, Moss SE, Khaw PT (2002) In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:864-869.
- Lyles GA, Chalmers J (1992) The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochem Pharmacol* 43:1409-1414.
- Malecki M, Skupien J (2008) Problems in differential diagnosis of diabetes types. *Pol Arch Med Wewn* 118:435-440.
- Malecki MT, Klupa T (2005) Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. *Pharmacol Rep* 57 Suppl:20-32.
- Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F (2008) An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regul Pept* 146:4-11.
- Marshall S, 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.
- Massieu L, Tapia R (1997) Glutamate uptake impairment and neuronal damage in young and aged rats in vivo. *J Neurochem* 69:1151-1160.

- McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108:652-659.
- McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH (1994) Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 87:21-29.
- Mello KFSD, Giannella MLCC, Souza JJSD, Fidelix MSP, Nery M, Giannella-Neto D (2003) Especial condutas: diabetes mellitus. *Revista Brasileira de Medicina* 60:505-515.
- Meyer C, Dostou JM, Welle SL, Gerich JE (2002) Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E419-427.
- Meyer LE, Machado LB, Santiago AP, da-Silva WS, De Felice FG, Holub O, Oliveira MF, Galina A (2006) Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP recycling activity. *J Biol Chem* 281:37361-37371.
- Moore F, Colli ML, Cnop M, Esteve MI, Cardozo AK, Cunha DA, Bugliani M, Marchetti P, Eizirik DL (2009) PTPN2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates interferon-gamma-induced pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes* 58:1283-1291.
- Mootha VK et al. (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34:267-273.
- Morini M, Roccatagliata L, Dell'Eva R, Pedemonte E, Furlan R, Minghelli S, Giunti D, Pfeffer U, Marchese M, Noonan D, Mancardi G, Albin A, Uccelli A (2004) Alpha-lipoic acid is effective in prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 148:146-153.
- Mukherjee B, Anbazhagan S, Roy A, Ghosh R, Chatterjee M (1998) Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother* 52:89-95.
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B (2005) Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 353:2643-2653.
- Newman E, Reichenbach A (1996) The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19:307-312.
- Nicholls DG, Budd SL (2000) Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80:315-360.

- Nicholls DG, Ferguson SJ (2001) The chemiosmotic proton circuit. In: Bioenergetics 3 (Nicholls DG, Ferguson SJ, eds), pp 66-73. Amsterdam, Boston, London, New York, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press.
- Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276:38388-38393.
- Oosawa Y, Ashcroft SJ, Ashcroft FM (1992) Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels from an insulin-secreting cell line incorporated into planar lipid bilayers. *Diabetologia* 35:619-623.
- Ott A, Breteler MM, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJ, Grobbee DE, Hofman A (1995) Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ* 310:970-973.
- Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD (2006) Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol* 44:265-274.
- Pekiner C, Cullum NA, Hughes JN, Hargreaves AJ, Mahon J, Casson IF, McLean WG (1993) Glycation of brain actin in experimental diabetes. *J Neurochem* 61:436-442.
- Phillips SA, Thornalley PJ (1993) The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem* 212:101-105.
- Pieper GM, 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.
- Poli G, Schaur RJ (2000) 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life* 50:315-321.
- Poyton RO, McEwen JE (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* 65:563-607.
- Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ (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, Spiegelman BM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha):

- transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24:78-90.
- Radi R, Cassina A, Hodara R (2002) Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 383:401-409.
- Ravelojaona V, Peterszegi G, Molinari J, Gesztesi JL, Robert L (2007) Demonstration of the cytotoxic effect of Advanced Glycation Endproducts (AGE-s). *J Soc Biol* 201:185-188.
- Rorsman P, Renstrom E (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46:1029-1045.
- Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, 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.
- Ryle C, Leow CK, Donaghy M (1997) Nonenzymatic glycation of peripheral and central nervous system proteins in experimental diabetes mellitus. *Muscle Nerve* 20:577-584.
- Saks VA, Ventura-Clapier R, Aliev MK (1996a) Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochim Biophys Acta* 1274:81-88.
- Saks VA, Tiivel T, Kay L, Novel-Chate V, Daneshrad Z, Rossi A, Fontaine E, Keriel C, Leverve X, Ventura-Clapier R, Anflous K, Samuel JL, Rappaport L (1996b) On the regulation of cellular energetics in health and disease. *Mol Cell Biochem* 160-161:195-208.
- Santiago AP, Chaves EA, Oliveira MF, Galina A (2008) Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie* 90:1566-1577.
- Saraiva LM, Seixas da Silva GS, Galina A, da-Silva WS, Klein WL, Ferreira ST, De Felice FG (2010) Amyloid-beta triggers the release of neuronal hexokinase 1 from mitochondria. *PLoS One* 5:e15230.
- Saraste M (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys* 23:331-366.
- Scarpulla RC (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286:81-89.

- Schechter R, Abboud M, Johnson G (1999) Brain endogenous insulin effects on neurite growth within fetal rat neuron cell cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 116:159-167.
- Schechter R, Beju D, Gaffney T, Schaefer F, Whetsell L (1996) Preproinsulin I and II mRNAs and insulin electron microscopic immunoreaction are present within the rat fetal nervous system. *Brain Res* 736:16-27.
- Schechter R, Yanovitch T, Abboud M, Johnson G, 3rd, Gaskins J (1998) Effects of brain endogenous insulin on neurofilament and MAPK in fetal rat neuron cell cultures. *Brain Res* 808:270-278.
- Schechter R, Whitmire J, Wheat GS, Beju D, Jackson KW, Harlow R, Gavin JR, 3rd (1994) Immunohistochemical and in situ hybridization study of an insulin-like substance in fetal neuron cell cultures. *Brain Res* 636:9-27.
- Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D (1995) Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 96:1395-1403.
- Schrijvers BF, De Vriese AS, Flyvbjerg A (2004) From hyperglycemia to diabetic kidney disease: the role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocr Rev* 25:971-1010.
- Semenza GL (2003) Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med* 54:17-28.
- Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger P, Thorpe SR, Onorato J, 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.
- Simo R, Carrasco E, Garcia-Ramirez M, Hernandez C (2006) Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2:71-98.
- Singh BS, Rajakumar PA, Eves EM, Rosner MR, Wainer BH, Devaskar SU (1997) Insulin gene expression in immortalized rat hippocampal and pheochromocytoma-12 cell lines. *Regul Pept* 69:7-14.

- Sipos I, Tretter L, Adam-Vizi V (2003) The production of reactive oxygen species in intact isolated nerve terminals is independent of the mitochondrial membrane potential. *Neurochem Res* 28:1575-1581.
- Sivitz WI, Yorek MA (2010) Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 12:537-577.
- Sobrevia L, Nadal A, Yudilevich DL, Mann GE (1996) Activation of L-arginine transport (system y<sup>+</sup>) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *J Physiol* 490 ( Pt 3):775-781.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277:44784-44790.
- Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP, Jr., Davis RE, Parker WD, Jr. (1996) Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 40:663-671.
- Szwergold BS, Kappler F, Brown TR (1990) Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science* 247:451-454.
- Tanaka Y, Katoh S, Hori S, Miura M, Yamashita H (1997) Vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Lancet* 349:1520.
- Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Nishio S, Nagano-Torigoe Y, Miyazaki H, Ezaki K, Yufu K, Hara M, Nakagawa M, Saikawa T (2010) High-glucose condition reduces cardioprotective effects of insulin against mechanical stress-induced cell injury. *Life Sci* 87:154-161.
- 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 PJ (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 PJ (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 PJ, Langborg A, Minhas HS (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 344 Pt 1:109-116.
- Tomlinson DR, Gardiner NJ (2008) Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 9:36-45.
- Tsai WC, Li YH, Huang YY, Lin CC, Chao TH, Chen JH (2005) Plasma vascular endothelial growth factor as a marker for early vascular damage in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 109:39-43.
- Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17:3-8.
- Turrens JF, Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191:421-427.
- Umegaki H (2010) Pathophysiology of cognitive dysfunction in older people with type 2 diabetes: vascular changes or neurodegeneration? *Age Ageing* 39:8-10.
- Unger JW, Livingston JN, Moss AM (1991) Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog Neurobiol* 36:343-362.
- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A (1983) Excessive nonenzymatic glycosylation of peripheral and central nervous system myelin components in diabetic rats. *Diabetes* 32:670-674.
- Voet D, Voet JD (1995) *Biochemistry*. New York: John Wiley & sons, Inc.
- Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-1488.
- Wallimann T, Hemmer W (1994) Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 133-134:193-220.
- Wang X, Desai K, Chang T, Wu L (2005) Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. *J Hypertens* 23:1565-1573.
- Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP (1998) Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 21:1167-1172.



- Weimbs T, 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 L, Vosseller K, Hart GW (2001) Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291:2376-2378.
- Werdich XQ, McCollum GW, Rajaratnam VS, Penn JS (2004) Variable oxygen and retinal VEGF levels: correlation with incidence and severity of pathology in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res* 79:623-630.
- West IC (2000) Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17:171-180.
- Westwood ME, McLellan AC, Thornalley PJ (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.
- White MF, Kahn CR (1994) The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269:1-4.
- Whitmer RA, Gunderson EP, Barrett-Connor E, Quesenberry CP, Jr., Yaffe K (2005) Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ* 330:1360.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053.
- Williams B, Gallacher B, Patel H, 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 SK, Howarth NL, Devenny JJ, Bitensky MW (1982) Structural and functional consequences of increased tubulin glycosylation in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:6546-6550.
- Winer N, Sowers JR (2004) Epidemiology of diabetes. *J Clin Pharmacol* 44:397-405.
- Wirostko B, Wong TY, Simo R (2008) Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog Retin Eye Res* 27:608-621.

- Wu L, Juurlink BH (2002) Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 39:809-814.
- Yaffe K, Kanaya A, Lindquist K, Simonsick EM, Harris T, Shorr RI, Tylavsky FA, Newman AB (2004) The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline. *JAMA* 292:2237-2242.
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889-9897.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382:685-691.
- Yu PH, Wright S, Fan EH, Lun ZR, Gubisne-Harberle D (2003) Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1647:193-199.
- Zhang P, Liu N, Wang Y (2009) Insulin may cause deterioration of proliferative diabetic retinopathy. *Med Hypotheses* 72:306-308.
- Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 265:16330-16336.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787.