

CARINA MALAGUTI

**ESTRESSE OXIDATIVO E SUSCEPTIBILIDADE À TRANSIÇÃO DE  
PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL PRECEDEM O APARECIMENTO DO  
DIABETES AUTOIMUNE EM CAMUNDONGOS NOD**

Campinas

2012





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

**ESTRESSE OXIDATIVO E SUSCEPTIBILIDADE À TRANSIÇÃO DE  
PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL PRECEDEM O APARECIMENTO DO  
DIABETES AUTOIMUNE EM CAMUNDONGOS NOD**

Carina Malaguti

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutora em Fisiopatologia Médica, área de concentração em Medicina Experimental. Sob orientação do Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi e co-orientação da Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/8852  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

M29e	<p>Malaguti, Carina, 1981 - Extresse oxidativo e susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial precedem o aparecimento do diabetes autoimune em camundongos nod / Carina Malaguti. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador : Aníbal Eugênio Vercesi. Coorientador: Helena Coutinho Franco de Oliveira. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Diabetes tipo 1. 2. Mitocôndria. 3. Consumo de oxigênio. 4. Espécies reativas de oxigênio. I. Vercesi, Aníbal Eugênio. II. Oliveira, Helena Coutinho Franco de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</p>
------	--

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Oxidative stress and susceptibility to permeability transition precede the onset of autoimmune diabetes in nod mice.

**Palavras-chave em inglês:**

Type 1 diabetes

Mitochondria

Oxygen consumption

Reactive oxygen species

**Área de concentração:** Medicina Experimental

**Titulação:** Doutora em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Aníbal Eugênio Vercesi [Orientador]

Marisa Passarelli

Leonardo Reis Silveira

Antônio Carlos Boschiero

Elizabeth João Pavin

**Data da defesa:** 14-03-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

## Banca examinadora de Tese de Doutorado

Carina Malaguti

**Orientador: Prof. Dr. Anibal Eugênio Vercesi**

### Membros:

Professor (a) Doutor (a) Marisa Passarelli

Professor (a) Doutor (a) Leonardo dos Reis Silveira

Professor (a) Doutor (a) Antonio Carlos Boschiero

Professor (a) Doutor (a) Elizabeth João Pavin

Professor (a) Doutor (a) Anibal Eugênio Vercesi

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 14/03/2012**

Dedico este trabalho aos meus pais Zélia e José Maria, meus irmãos Carla e Cassius e meu noivo Anderson, por me incentivarem e me darem apoio nos momentos mais difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Aníbal Vercesi, por receber-me de braços abertos em seu laboratório, além de ter proporcionado outros trabalhos que foram significativos em minha vida profissional e ter me mostrado o que realmente é fazer ciência.

À professora Helena Oliveira, por me co-orientar de maneira muito eficaz e pelos seus conselhos importantes nos momentos certos.

Ao professor Roger Castilho, por auxiliar nas discussões e problemas relacionados a projetos.

Aos professores Marisa Passarelli, Leonardo Reis Silveira, Antônio Carlos Boschero, Elizabeth João Pavin, Luciane Carla Alberici, Maria Cândida Ribeiro Parisi e Fernanda Ortis por aceitarem fazer parte de minha banca.

Ao professor Rodrigo Ramos Catharino, pela oportunidade de aprender a lecionar aulas teóricas e práticas e ainda pelos preciosos conselhos..

Ao professor Dr. Ricardo de Lima Zollner por ceder o uso do Biotério e também seu laboratório para alguns experimentos

As queridas professoras Dra. Bete, Dra. Cândida e Dra. Denize por me receberam no ambulatório com grande carinho e respeito.

Aos queridos funcionários Márcia, Edilene, Roberto, Ana Carolina e Elisângela por toda a dedicação aos nossos trabalhos e pela amizade.

As queridas funcionárias e amigas Conceição e Margarida por ajudar a cuidar dos camundongos e realizar alguns experimentos e agradeço a vocês juntamente com a Karla, pela nossa amizade por quase 10 anos.

Agradeço também com grande carinho, Emerielli Vanzela, por ensinar-me a canulação dos camundongos e pela amizade.

Aos colegas Bruno, Daniela, Felipe, Franco, Guilherme, Ivan, Juliana, Karina, Luciane, Mariana, Natália, Rute, Silvia, Sônia, Tiago e Vinícius pelas discussões, ensinamentos, ajudas, convivência no laboratório e alguns pela grande amizade.

Ao Paolo por auxiliar em experimentos deste trabalho e de outros trabalhos e ainda por sempre se dispor a ajudar.

Aos meus queridos e inesquecíveis amigos Ana Catarina (Catita) e Carlos (Carlão), pela grande amizade, momentos de diversão, companhia mesmo fora do laboratório, conselhos e até pelas brigas. Enfim, agradeço a vocês dois por ajudarem emocionalmente em todos esses anos de convivência.

Agradeço também a minha irmã e amiga Mariana Baratti, por ter me incentivado a procurar pelo professor Aníbal para fazer o Doutorado e por nossa grande relação de irmã.

À minha amiga Helena Raposo pelos jantares e caronas com divertidas e desabafadoras conversas.

Por fim, agradeço a minha família por todo incentivo, carinho, amor e compreensão.

“A vida é uma peça de teatro que não  
permite ensaios. Por isso, cante, chore,  
dance, ria e viva intensamente, antes que a  
cortina se feche e a peça termine sem  
aplausos.”

Charles Chaplin

**RESUMO**

---

Espécies reativas de oxigênio (EROs) tem sido associado com uma grande variedade de doenças metabólicas humanas incluindo o diabetes tipo 1 auto-imune (DM1A). A destruição das células beta pancreáticas no DM1A está associada com estresse oxidativo celular no qual a morte celular ocorre via mitocondrial. O objetivo desse trabalho foi determinar se o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial estão presentes no modelo experimental de DM1A, camundongos NOD (não obeso diabético) e se isso está relacionado com o desenvolvimento da doença. Foram realizados experimentos em biópsias de fígado e músculo sóleo, mitocôndrias isoladas de fígado, linfócitos de baço e circulante, células tronco de medula óssea e ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD e camundongos Balb/c. Os camundongos NOD foram estudados nas três fases da doença: não diabéticos (glicemia < 100 mg/dL, 4-6 semanas de vida), pré-diabéticos (glicemia entre 100-150 mg/dL, 7-10 semanas de vida) e diabéticos (glicemia > 250 mg/dL, 14-25 semanas de vida) comparados aos camundongos Balb/c nas idades correspondentes.

A respiração mitocondrial (consumo de oxigênio) foi medida no estado de fosforilação e repouso nas biópsias de fígado e músculo sóleo e em mitocôndrias isoladas e não foram diferentes em camundongos NOD nos três estágios em comparação com os Balb/c nas mesmas idades. Entretanto, as mitocôndrias isoladas de NOD mostraram ser mais susceptível a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) induzida pelo cálcio e sensível a ciclosporina A, determinado por inchamento mitocondrial e pela diminuição da capacidade de retenção de cálcio. Essa maior susceptibilidade a TPM foi observada nos três estágios de desenvolvimento do DM1A. Produção de peróxido de hidrogênio (Amplex red) foi maior nas mitocôndrias isoladas de NOD não-diabéticos, mas não foi alterada nos estágios pré-diabético e diabético. A oxidação do H<sub>2</sub>DCF pelas células intactas, foi significativamente maior nos linfócitos e células tronco de NOD não-diabéticos, pré-diabéticos e diabéticos comparadas ao controle. Além disso, observamos maiores taxas de oxidação do H<sub>2</sub>DCF em ilhotas pancreáticas de NOD não-diabéticos. Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo precede o desenvolvimento da doença e pode ser a causa da disfunção mitocondrial que está envolvida na morte das células beta. Propomos que o estresse oxidativo é um evento chave na patogênese da DM1A e pode ser um alvo potencial para intervenções.

## **ABSTRACT**

---

Reactive oxygen species (ROS) have been extensively associated with a large variety of human metabolic diseases including type 1 diabetes auto-immune (T1D A). The destruction of islet beta cells in T1DA is associated with cellular oxidative stress and with the mitochondrial pathway of cell death. The aim of this study was to determine whether oxidative stress and mitochondrial dysfunction are present in T1DA experimental model NOD (non obese diabetic mouse) and if they are related to the stages of the development of the disease. The experiments were done in liver and soleus muscles biopsies, isolated liver mitochondria, spleen and circulating lymphocytes, bone marrow stem cells and isolated pancreatic islets from NOD and control Balb/c mice. NOD mice were studied at 3 stages: non-diabetic (glycemia < 100 mg/dL, 4-6 weeks of age), pre-diabetic (glycemia range 100-150 mg/dL, 7-10 weeks of age) and diabetic (glycemia > 250 mg/dL, 14-25 weeks of age) and compared to age matched Balb/c mice.

Mitochondria respiration rates (oxygen consumption) measured at phosphorylating and resting states in liver and soleus biopsies and in isolated liver mitochondria were similar in NOD at the three stages of the disease as compared to age matched Balb/c mice. However, NOD isolated liver mitochondrial were shown to be more susceptible to calcium induced mitochondrial permeability transition (MPT), as determined by calcium induced cyclosporine A sensitive swelling and by decreased calcium retention capacity. This higher MPT susceptibility was observed in all 3 stages of the development of diabetes. Hydrogen peroxide production (Amplex red) was higher in isolated liver mitochondria from non-diabetic NOD, but unaltered in pre-diabetic and diabetic NOD mice. The oxidation of H<sub>2</sub>DCF by intact cells was significantly increased in NOD lymphocytes and stem cells in non-, pre- and diabetic stages as compared to controls. In addition, we observed higher rates of H<sub>2</sub>DCF oxidation in pancreatic islets from non-diabetic NOD mice. These results suggest that the oxidative stress precedes the establishment of diabetes and may be the cause of mitochondrial dysfunction that is involved in beta cell death. We propose that oxidative stress is a key event in the pathogenesis of T1DA and may be a potential target for interventions.

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1. Modelo proposto por Gurzov e colaboradores para explicar a apoptose via proteína DP-5 ativada (*death protein-5*) pelas citocinas pró-inflamatórias ou pelo estresse de retículo endoplasmático (adaptado de (1)).** As citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  combinadas levam a apoptose por duas vias: Pela ativação de JNK que fosforila c-Jun, expressando DP-5. A DP-5 bloqueia proteínas anti-apoptóticas e ativa proteínas pró-apoptóticas, levando à apoptose via mitocôndria ou via retículo endoplasmático. A outra via dependente das citocinas, ocorre através da fosforilação do NF- $\kappa$ B que expressa mais iNOS produzindo NO. O NO aumenta a expressão da DP-5 que bloqueia as proteínas anti-apoptóticas e ativa proteínas pró-apoptóticas, levando à apoptose (**Painel A**). O estresse de retículo endoplasmático também leva a apoptose a um evento independente do primeiro (**Painel B**). Um agressor químico induz o estresse de retículo que ativar a JNK. Em seguida, a c-Jun é fosforilada expressando DP-5, que por sua vez, bloqueia as proteínas anti-apoptóticas e ativa proteínas pró-apoptóticas, levando à apoptose por causa da permeabilização das mitocôndrias.....pg 27.

**FIGURA 2. Esquema da cadeia respiratória e sistema redox mitocondrial mostrando o transporte de elétrons, a geração da força próton-motriz, formação de espécies reativas de oxigênio e atividades de enzimas antioxidantes (2) modificado por (3).....pg 34.**

**FIGURA 3. Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca<sup>2+</sup> e EROs na membrana mitocondrial interna (4).** A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radicais O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Estes radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), que promove a geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é então reduzido à H<sub>2</sub>O pela glutathione peroxidase (GP), tioredoxina peroxidase (TP) ou catalase (em mitocôndria de coração). GSH, oxidado pela GP, e TSH, oxidado pela TP, são recuperados pelo sistema enzimático glutathione e tioredoxina redutases (GR e TR), que usam NADPH como

doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então  $\text{NADP}^+$  usando a NAD(P) transidrogenase. Quando a geração de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  aumenta na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Pi}$ , e/ou os mecanismos de remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  estão inativados,  $\text{H}_2\text{O}_2$  acumula-se e na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ , gera o radical  $\text{OH}^{\cdot}$  altamente reativo.  $\text{OH}^{\cdot}$  oxida grupos tiólicos (-SH) do complexo do poro de TPM, levando à formação e abertura do poro. Alternativamente,  $\text{OH}^{\cdot}$  pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por  $\text{Pi}$ .....pg 36.

**FIGURA 4. Representação da dinâmica de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e das proteínas do MAM envolvidas no transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático e mitocôndria (modificado de (5)).** Uma série de estímulos atua sobre os receptores da membrana plasmática ativando a proteína PLC que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato o IP3. O IP3 se liga ao receptor IP3R estimulando a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático para a mitocôndria. Esse transporte é feito de forma direta através da proteína grp75, transferindo o  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo para a mitocôndria através do VDAC. Na MMI há uma série de canais e bombas que introduzem ou retiram o  $\text{Ca}^{2+}$  da matriz mitocondrial, porém, este  $\text{Ca}^{2+}$  em excesso na matriz pode causar danos irreversíveis como a TPM. ....pg 39.

**FIGURA 5. Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio) em biópsias de fígado (A) e músculo esquelético (B) não foi alterada em camundongos NOD antes e durante o desenvolvimento do diabetes.** Biópsias de tecido (2-3 mg) foram adicionadas em meio MiR05. Adições foram: 400  $\mu\text{M}$  ADP, 1 mg/ml oligomicina, 0,2  $\mu\text{M}$  FCCP para fígado ou 1,5  $\mu\text{M}$  FCCP para músculo esquelético. Dados representados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de cinco experimentos independentes.....pg 63.

**FIGURA 6. Susceptibilidade de inchamento mitocondrial induzido por cálcio em mitocôndrias é marcadamente maior em camundongos NOD antes e**

**durante o desenvolvimento do diabetes.** Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio padrão a 28°C com adição de 60  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Absorbância em 10 minutos para Balb/c vs. NOD foram: Grupo Não-diabético:  $1,1 \pm 0,2$  vs.  $0,86 \pm 0,1$ ; Grupo Pré-diabético:  $1,06 \pm 0,2$  vs.  $0,82 \pm 0,1$ ; Grupo Diabético:  $1,3 \pm 0,3$  vs.  $1,02 \pm 0,3$ .  $P < 0,05$  para todas as comparações. Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média. Figura representativa de oito experimentos em duplicatas.....pg 67.

**FIGURA 7. Capacidade mitocondrial de retenção de cálcio é profundamente reduzida em camundongos NOD antes e durante o desenvolvimento do diabetes.** Mitochondrias (0,5 mg/ml) foram incubadas com meio padrão a 28°C com 0,1  $\mu\text{M}$  calcium green em 5 N de sal hexapotassio. Tempo (segundos) de liberação do cálcio por Balb/c vs. NOD foram: Grupo não diabéticos:  $972,2 \pm 122,0$  vs.  $349,2 \pm 132,9$ ; Grupo Pré-diabéticos:  $670,8 \pm 151,8$  vs.  $244,5 \pm 96,6$ ; Grupo Diabético:  $968,9 \pm 28,5$  vs.  $182,8 \pm 11,9$ ;  $P < 0,05$  para todas as comparações. Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média. Figura representativa de oito experimentos em duplicatas.....pg 68.

**FIGURA 8. Geração mitocondrial de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Amplex-red) é aumentada em camundongos NOD não-diabéticos mas não nos demais estágios da doença.** Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas com meio padrão a 28 °C, na presença de 1 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (**A**) e 10  $\mu\text{M}$  Amplex-red e 1 U/ml horseradish peroxidase (**B**) e 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle. Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de cinco experimentos independentes em duplicatas.  $*p \leq 0,05$  NOD vs. Balb/c (Student t test).....pg 70.

**FIGURA 9. Oxidação de  $\text{H}_2\text{DCF}$  é aumentada em linfócitos não permeabilizados e em células troncos de camundongos NOD antes e durante o desenvolvimento do diabetes.**  $1 \times 10^6$  linfócitos de baço (**A**),  $1 \times 10^5$  linfócitos

circulantes (**B**) e  $1 \times 10^6$  células tronco (**C**) foram incubadas com meio HBSS na presença de  $1 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ . Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle. Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de cinco experimentos independentes em duplicatas.  $*p \leq 0,05$  NOD vs. Balb/c (Student t test).....pg 72.

**FIGURA 10. Produção de superóxido mitochondrial (MitoSox) não é alterada nos linfócitos e células tronco intactos isolados de camundongos NOD ao longo do desenvolvimento do diabetes.**  $1 \times 10^6$  linfócitos de baço (**A**),  $1 \times 10^5$  linfócitos circulantes (**B**) e  $1 \times 10^6$  células tronco (**C**) foram incubados com meio RPMI 1640 na presença de  $5 \mu\text{M}$  MitoSOX Red. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle. Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de cinco experimentos independentes em duplicatas. Foi aplicado teste estatístico Student t test.....pg 73.

**FIGURA 11. Oxidação de  $\text{H}_2\text{DCF}$  foi aumentada em ilhotas isoladas de camundongos NOD não diabéticos (4 semanas de vida) sem alteração na atividade de citrato sintase, comparado com ilhotas isoladas de camundongos Balb/c na mesma idade.** 25 ilhotas foram incubadas em meio HBSS na presença de  $1 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ . Representativo de três experimentos independentes em duplicata (**A**). Resultados expressos em porcentagem em relação ao controle (**B**). Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de três experimentos independentes em duplicatas com 25 ilhotas. Atividade de citrato sintase em ilhotas isoladas (**C**). Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de oito experimentos independentes em duplicatas com 25 ilhotas.  $*p \leq 0,05$  NOD vs. Balb/c (Student t test).....pg 75.

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.** Consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos NOD e camundongos Balb/c nas idades correspondentes, medidos na fosforilação oxidativa (V3, adição de ADP) e no estado de repouso (V4). CR-controle respiratório.....pg 64.

**TABELA 2.** Atividade de citrato sintase em biópsias de fígado e músculo sóleo de camundongos NOD e Balb/c nas idades correspondentes (mU/mg de tecido). Grupo não-diabético (glicemia <100 mg/dL; 4-6 semanas de vida), grupo pré-diabéticos (glicemia 100-150 mg/dL, 7-10 semanas de vida) e grupo diabético (glicemia >250 mg/dL; 14-25 semanas de vida). \*  $p \leq 0,05$ .....pg 65.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP= Adenosina difosfato

AG= ácidos graxos

AGE= produto final de glicação avançada (do inglês: advanced glycation end products)

AGL= ácidos graxos livres

AIF= fator indutor de apoptose

APC= célula apresentadora de antígeno

ATP = Adenosina trifosfato

BSA= Albumina sérica bovina

CD8+= cluster of differentiation 8

CEMIB= Centro Multidisciplinar de investigação biológica

CsA = ciclosporina A

DM1AA= Diabetes Mellitus tipo 1

EGTA = Ácido etilenoglicoltetracético

EROS = espécies reativas de oxigênio

FACS= Fluorescence-Activated Cell Sorting

FADH<sub>2</sub> = Flavina adenina dinucleotídeo reduzido

FCCP= carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

FMN = flavinamononucleotídeo

GO= glioxal

GPX= glutathione peroxidase

GSH = glutathione

GSNO = nitrosoglutathione

HBSS= Hank's Balanced Salt Solution

H<sub>2</sub>DCF-DA = 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio

IFN-γ= Interferon gama

IL-1β= Interleucina 1 beta

IL-6= Interleucina 6

LADA= Latent autoimmune diabetes in adults  
MAM= Mitochondria Associated Membranes  
MCU = transportador uniporter de  $\text{Ca}^{2+}$   
MGO= metilglioxal  
MHC= complexo principal de histocompatibilidade  
MitoSox= Hidroetidina específica para mitocôndria  
MME = membrana mitocondrial externa (OMM - Inglês)  
MMI= Membrana mitocondrial interna (IMM- Inglês)  
NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)  
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)  
NO= óxido nítrico  
NOD= Non obese diabetic  
 $\text{O}_2^{\bullet-}$  = ânion superóxido  
ONOO- = peroxinitrito  
PBS= Phosphate buffered saline (solução salina fosfatada)  
SERCA = proteína reguladora de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de ATP  
SPF= livre de patógenos específicos  
SOD = superóxido dismutase  
TCR= receptor de célula T  
TPM = transição de permeabilidade mitocondrial  
TNA= translocador de nucleotídeo de adenina  
TPM = transição de permeabilidade mitocondrial  
UCP= proteína desacopladora  
UQ = Ubiquinona (forma oxidada)  
 $\text{UQH}^{\bullet}$  = radical semiquinona  
 $\text{UQH}_2$  = Ubiquinona (forma reduzida)  
 $\Delta\mu\text{H}^+$  = gradiente eletroquímico de prótons  
 $\Delta\Psi$ = potencial elétrico de membrana  
VDAC = canal aniônico voltagem dependente

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1A .....	24
1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 1A E APOPTOSE .....	25
1.3. EROS E AS COMPLICAÇÕES DO DM1A .....	28
1.4. CAMUNDONGOS NOD .....	29
1.5. BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	31
1.6. TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL .....	34
1.7. CALCIO E MEMBRANA ASSOCIADA A MITOCÔNDRIA (MAM)..	37
1.8. MORTE CELULAR INDUZIDA POR TPM .....	40
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
3.1. OBJETIVOS GERAIS .....	45
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	48
4.2. BIÓPSIA DE FIBRA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	49
4.3. BIÓPSIA DE FÍGADO .....	50
4.4. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE CAMUNDONGO .....	50
4.5. ISOLAMENTO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS .....	51
4.6. ISOLAMENTO DE CÉLULAS LINFOMONONUCLEARES A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO .....	51

4.7. ISOLAMENTO DE CÉLULAS TRONCO DE MEDULA FEMURAL.....	52
4.8. ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS .....	53
4.9. DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	54
4.10. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DOS EXPERIMENTOS COM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS .....	55
4.11. CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL .....	55
4.12. ABERTURA DO PORO DE TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL .....	56
Medida de inchamento mitocondrial .....	56
Transporte de íons cálcio .....	56
4.13. ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	57
Amplex Red .....	57
H <sub>2</sub> DCF-DA .....	57
MitoSOX .....	58
4.14. ATIVIDADE DE CITRATO SINTASE .....	58
4.15. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	59
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

## **1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1A**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o termo diabetes mellitus é usado para definir uma doença metabólica de múltipla etiologia caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, como resultado da deficiência na produção ou na ação da insulina (6). Considerando as características etiológicas do diabetes mellitus e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em diabetes mellitus tipo 1 (DM1A), diabetes tipo 2 (DM2), tipos específicos incluindo diabetes secundário ou associado a outras patologias e o diabetes gestacional.

O DM1A é uma doença autoimune resultante de um processo mediado por linfócitos T tendo as células beta pancreáticas como alvo de destruição. É uma das mais comuns doenças pediátricas e vista como uma doença complexa com variadas patogenias e sintomas clínicos (7). Alguns estudos mostram os possíveis fatores que desencadeiam a autoimunidade nesta doença como a predisposição genética, alimentação, sazonalidade e área geográfica do nascimento e viroses (8-14). A incidência de jovens com DM1A vem aumentando nos últimos anos, provavelmente devido a mudanças na alimentação, frequência de atividade física, mudanças climáticas, infecções, vacinações e uso de medicamentos e esse aumento é maior em crianças com idade abaixo de 5 anos (15).

De acordo com American Diabetes Association (ADA), nos Estados Unidos, a estimativa de pessoas com diabetes é de 10,3 % em 2010 havendo predições de aumentar para 12% até 2030. No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes, cerca de 6 % da população tem diabetes e esse número subirá para

7,7% em 20 anos. O DM1A, conhecido também como diabetes insulino-dependente, ocorre somente por volta de 5-10% de todos os casos de diabetes, entretanto, essa incidência vem crescendo em todo o mundo. O início do DM1A é na maior parte das vezes agudo, acometendo mais freqüentemente crianças e adolescentes (16), porém acomete também pessoas acima de 30 anos, o chamado LADA (Latent autoimmune diabetes in adults) (17).

As complicações microvasculares como retinopatia, nefropatia e neuropatia e macrovasculares como doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e vascular periférica, estão associadas ao DM1A e são as responsáveis pela elevada morbimortalidade (18). As taxas de mortalidade cardiovascular e renal, cegueira, amputação de membros e perda de função e qualidade de vida é muito superior em indivíduos com diabetes que em indivíduos sem a doença.

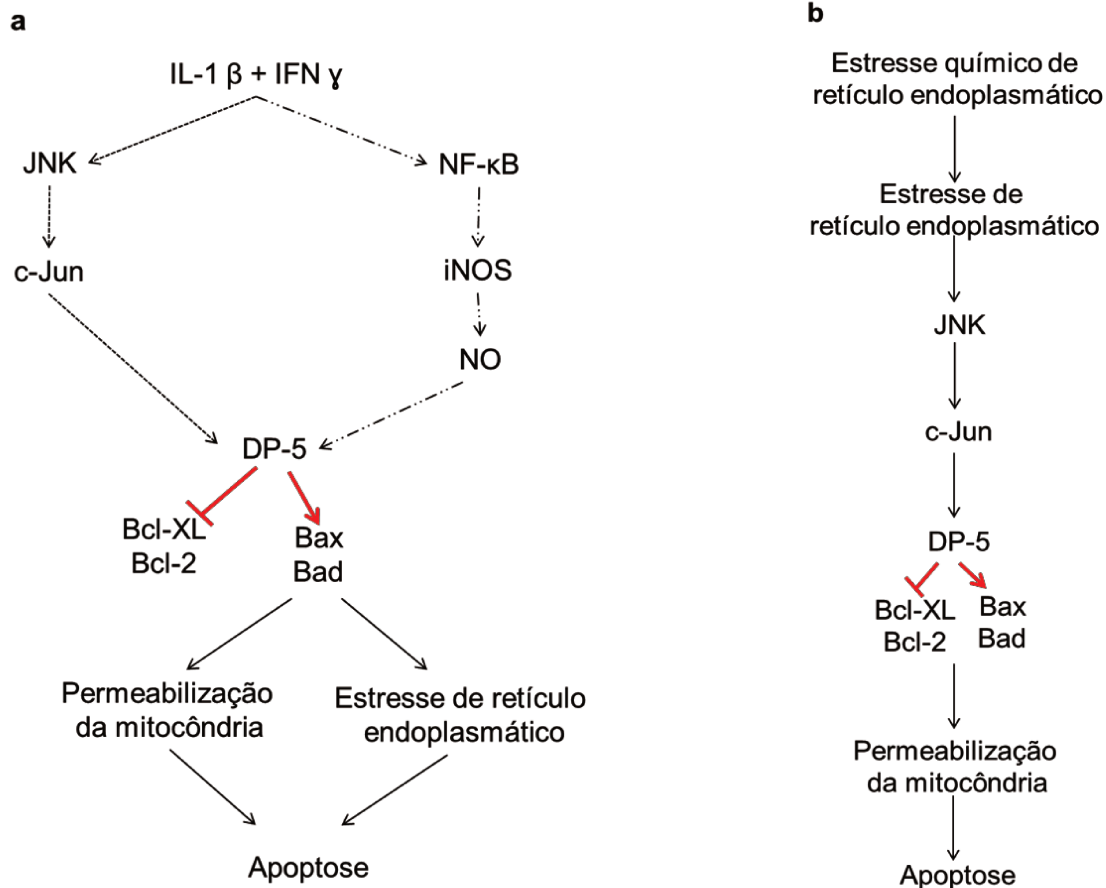
## **1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 1A E APOPTOSE**

A inflamação pode contribuir para a destruição autoimune das células  $\beta$  no pâncreas mais precocemente ou em estágios mais avançados, suprimindo a função das células beta e subsequentemente induzindo a apoptose (19).

Assim, as citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as quais são produzidas pelos linfócitos T ou macrófagos são responsáveis pela indução de morte celular das células  $\beta$  pancreática (20) são também prováveis estímulos pelo aumento de EROS nessa doença. Essas citocinas combinadas induzem apoptose através da ativação de FASL e perforinas/granzimas (19, 21) e ainda pela geração de EROS (22, 23). Há evidências de que ânion superóxido, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil juntamente com a geração de óxido nítrico estão

implicados na morte e disfunção das células  $\beta$  pancreáticas (24). Delaney e Cols mostraram que ilhotas humanas são susceptíveis aos efeitos de peroxinitrito em cultura primária e que essas ilhotas apresentam diminuição da oxidação de glicose e morte por necrose, além de alterações na estrutura da membrana das células e das mitocôndrias, inchamento e perda da matriz mitocondrial (25).

Gurzov (1) propôs que as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  combinadas podem levar a apoptose por duas vias. A primeira é pela ativação da quinase JNK que fosforila o fator de transcrição c-Jun expressando DP-5. A outra via pode ocorrer através da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B que aumenta a expressão de iNOS produzindo mais NO. Este NO formado aumenta a expressão de DP-5. Uma vez a DP-5 ativada, ela bloqueia BCL-XL e BCL-2 (proteína anti-apoptótica) e ativa BAX e BAD (proteína pró-apoptótica) podendo causar o estresse de retículo endoplasmático ou a permeabilização mitocondrial, e ambos resultam em apoptose (**Figura 2 a**). Ainda há outra forma de induzir a apoptose, através do estresse de retículo endoplasmático independente das citocinas, como um evento em paralelo. Um agressor químico induz o estresse de retículo que ativará a JNK. Em seguida, a c-Jun é fosforilada e há a expressão de DP-5, bloqueando as proteínas anti-apoptóticas e ativando as proteínas pró-apoptóticas. Isso leva a permeabilização da mitocôndria acarretando em apoptose (**FIGURA 1 b**).



**FIGURA 1. Modelo proposto por Gurzov e colaboradores para explicar a apoptose via proteína DP-5 ativada (*death protein-5*) pelas citocinas pró-inflamatórias ou pelo estresse de retículo endoplasmático (adaptado de (1)).** As citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  combinadas levam a apoptose por duas vias: Pela ativação de JNK que fosforila c-Jun, expressando DP-5. A DP-5 bloqueia proteínas anti-apoptóticas e ativa proteínas pró-apoptóticas, levando à apoptose via mitocôndria ou via retículo endoplasmático. A outra via dependente das citocinas, ocorre através da fosforilação do NF- $\kappa$ B que expressa mais iNOS produzindo NO. O NO aumenta a expressão da DP-5 que bloqueia as proteínas anti-apoptóticas e ativa proteínas pró-apoptóticas, levando à apoptose (**Painel A**). O estresse de retículo endoplasmático também leva a apoptose a um evento independente do primeiro (**Painel B**). Um agressor químico induz o estresse de retículo que ativará a JNK. Em seguida, a c-Jun é fosforilada expressando DP-5, que por sua vez, bloqueia as proteínas anti-apoptóticas e ativa proteínas pró-apoptóticas, levando à apoptose por causa da permeabilização das mitocôndrias.

### 1.3. EROS E AS COMPLICAÇÕES DO DM1A

As EROS podem participar da sinalização para a apoptose das células  $\beta$ , e ainda causar oxidação de proteínas (26), peroxidação lipídica (27) e danos no DNA mitocondrial (28) contribuindo para o desenvolvimento das complicações diabéticas (29-31).

Em mitocôndria com o funcionamento normal, há geração contínua de EROS; porém, elas possuem enzimas antioxidantes que são responsáveis pela detoxificação dessas EROS, permitindo que essas mitocôndrias continuem funcionais. Contudo, alguns estudos mostraram que as ilhotas pancreáticas possuem menor capacidade antioxidante comparada a outros tecidos (32, 33). Lenzen e colaboradores (33) compararam a expressão gênica de enzimas antioxidantes em vários tecidos de ratos e observaram que as ilhotas expressam menos genes para as enzimas CuZnSOD, MnSOD, catalase e GPX quando comparadas à expressão no fígado, rim, cérebro, pulmão, músculo esquelético e cardíaco e algumas glândulas.

Esse desequilíbrio entre a formação das EROs e a diminuição da eficiência das enzimas antioxidantes, possivelmente, deixam essas ilhotas mais suscetíveis à morte celular e compromete consequentemente órgãos alvos (34).

Muitas são as fontes de EROS e a hiperglicemia tem sido descrita como mais um estímulo para a produção dessas EROS (35). Uma vez a glicemia aumentada, há maior metabolização da glicose pela via glicolítica aumentando ainda mais a produção de EROs (36). Assim, há um desvio na formação de substratos formando aldeído bifuncional metilglioxal (MGO) ou glioxal (GO), os quais modificam proteínas e lípidos intracelulares dando origem aos produtos de

glicação avançada (AGE). Esses AGEs são capazes de aumentar o estresse oxidativo através de maior geração de EROS formando-se assim um ciclo (37).

Um estudo com pacientes com DM1A mostrou que células linfomononucleares, assim como células mesangiais e macrófagos de camundongos NOD, apresentam diminuição do AGE-R1 (receptor antagônico à via de sinalização do receptor de AGE) que é responsável por reduzir o estresse oxidativo celular e minimiza a resposta inflamatória, e AGEs aumentados no soro dos pacientes e de camundongos (38).

#### **1.4. CAMUNDONGOS NOD**

Um dos principais modelos experimentais usados para o estudo de DM1A são os camundongos NOD. Desde seu desenvolvimento há aproximadamente 30 anos, essa linhagem tem proporcionado um grande avanço no entendimento dos processos complexos envolvidos em doenças autoimunes (39-41). Embora o modelo seja uma ferramenta valiosa para o estudo de doenças imunológicas, ele é principalmente utilizado para diabetes autoimune podendo ser comparado à doença humana (40, 41).

Os camundongos NOD foram desenvolvidos a partir de cruzamentos endogâmicos dos camundongos CTS (Cataract Shionogi Strain) propensos à catarata, dando origem à sublinhagem Jcl:ICR. Após cruzamentos dessa sublinhagem, os camundongos da geração F6 apresentaram altos níveis de glicose em jejum, porém não apresentavam catarata. Ao chegar na geração F13, os camundongos não mais apresentavam altos níveis de glicemia em jejum e foram separados, sendo denominados NOD Shi. Em 1974, na F20, uma fêmea

NOD Shi desenvolveu espontaneamente diabetes mellitus insulino-dependente. A linhagem atual de camundongos NOD foi então derivada de cruzamentos entre irmãos da prole desta fêmea diabética NOD Shi (42, 43). Originalmente a linhagem era restrita ao Japão, e em 1980, iniciou-se sua distribuição primeiramente para Austrália e Estados Unidos (44). No Brasil, a colônia foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas (45), a partir de matrizes provenientes do Laboratório INSERM U-25 Neker, Paris, França. A partir de uma extensa revisão da literatura, verifica-se que é frequente o uso de camundongos Balb/c como controle experimental (44, 46-51).

A incidência do diabetes espontâneo da linhagem NOD nas várias colônias distribuídas pelo mundo varia entre 50 e 90% em fêmeas e entre 0 e 20% em machos (42, 52). Inicialmente, os camundongos NOD desenvolvem uma infiltração de linfócitos e macrófagos nas ilhotas pancreáticas por volta de 4 semanas de vida. Após este período, o desenvolvimento da doença é extremamente influenciado por fatores ambientais, como a exposição dos animais a agentes microbianos. Deste modo, a manutenção deste fenótipo de diabetes depende das condições de manutenção do animal, livre de patógenos específicos (SPF). Se não obedecidas tais condições, a incidência do diabetes é reduzida (52-54). Estudos recentes mostram que a incidência do DM1A nos camundongos NOD pode ser modulada de acordo com a flora bacteriana presente no animal e, por esse motivo, em condições *germ-free*, há maior incidência de diabetes nesta linhagem (55-57). Em nosso estudo, verificamos que o diabetes na linhagem NOD/unib da geração F64, inicia-se tipicamente entre a 12<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> semana de vida nas fêmeas, com período de incidência máxima ao redor da 17<sup>a</sup> semana de vida.

Morfologicamente, há a presença de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na periferia das ilhotas dos camundongos NOD jovens e ao envelhecerem, essas células migram para o interior das ilhotas, causando sua destruição e consequentemente a hiperglicemia (39, 41, 43).

### **1.5. BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução para a forma de energia química necessária aos processos celulares. Este processo de conversão de energia de óxido redução em energia química na forma de ATP é denominado de fosforilação oxidativa e envolve uma série de complexos transportadores de elétrons e a enzima ATP sintetase localizada na membrana mitocondrial interna (MMI).

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém do potencial eletroquímico gerado pela cadeia de transporte de elétrons, através de bombeamento de prótons H<sup>+</sup> para o espaço intermembranas. Este potencial eletroquímico é utilizado pela ATP sintetase para fosforilar ADP à ATP. Assim, a cadeia respiratória, que controla este potencial de membrana mitocondrial, é acoplada à fosforilação oxidativa.

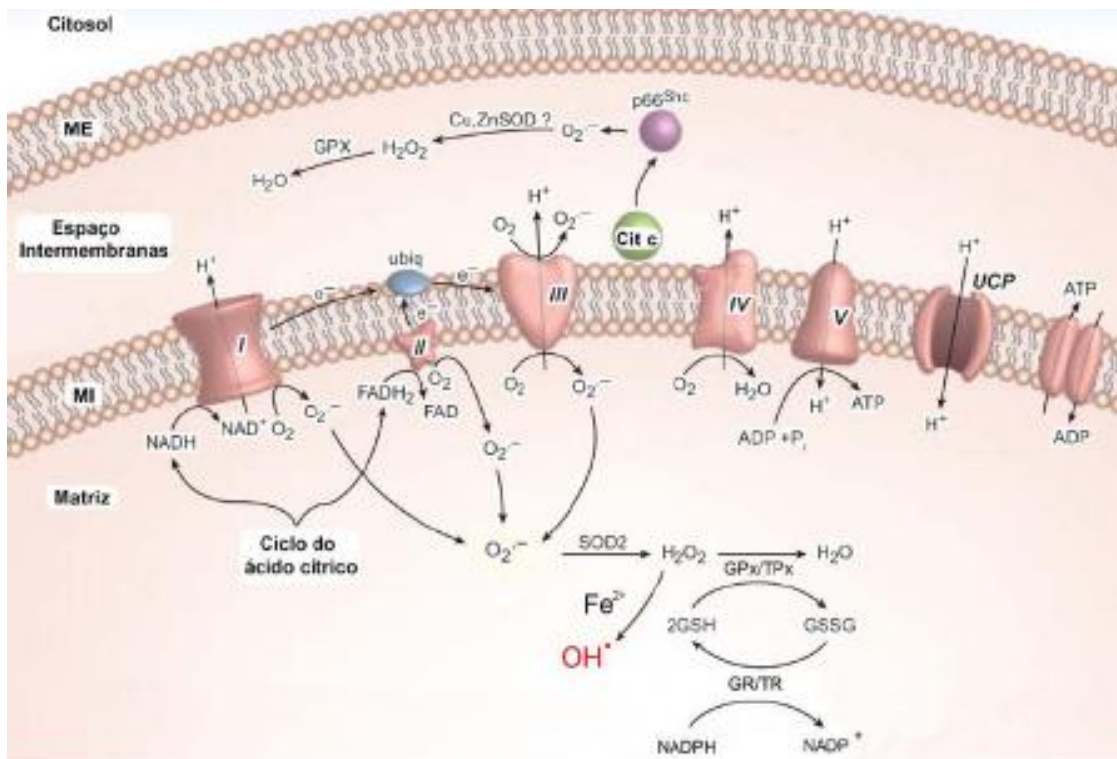
Elétrons provenientes das coenzimas NADH e FADH<sub>2</sub> reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos ao complexo I e II, respectivamente. O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima

(UQH<sub>2</sub>). Elétrons recebidos através do complexo II passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. Em alguns tecidos, a coenzima Q pode também ser reduzida pelo glicerol-3-fosfato desidrogenase (na presença de glicerol-3-fosfato citosólico) ou pela ubiquinona oxireductase (como resultado da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos). A UQH<sub>2</sub> é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona (UQH<sup>\*</sup>), a forma que doa elétrons ao citocromo c. Este transfere elétrons à citocromo oxidase (complexo IV) que é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (58).

Segundo MITCHELL (59), a passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, contra um gradiente de concentração. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico é o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a fosforilação do ADP em ATP. O fluxo de H<sup>+</sup> do espaço intermembranas através da ATP sintetase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, fornece energia para a fosforilação do ADP. A ATP sintetase, responsável por esta reação, é constituída de duas unidades distintas denominadas F<sub>1</sub>, solúvel e localizada na matriz mitocondrial, e F<sub>o</sub>, hidrofóbica e mergulhada na membrana mitocondrial interna, onde estão também localizados os complexos da cadeia respiratória (**FIGURA 3**).

A geração de um gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons é um elemento central no aproveitamento de energia em sistemas biológicos. Evolutivamente este mecanismo é fundamental, já que é aproveitado tanto na fosforilação oxidativa em mitocôndrias quanto na fotossíntese de ATP em cloroplastos. Além disso, este gradiente pode ser usado diretamente para processos ativos de transporte (por exemplo endergônicos) sem a participação de ATP. São exemplos deste mecanismo de acoplamento direto as trocas eletroforéticas de  $\text{ATP}^{4-}$  por  $\text{ADP}^{3-}$ , a redução de  $\text{NAD(P)}^+$  pela transidrogenase específica e a captação eletroforética de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Como a geração mitocondrial de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é um processo contínuo e fisiológico, a mitocôndria possui um eficiente sistema antioxidante, composto por enzimas tiólicas, superóxido dismutase, glutatona, NADPH, vitaminas E e C (**FIGURA 2**) (60-63).



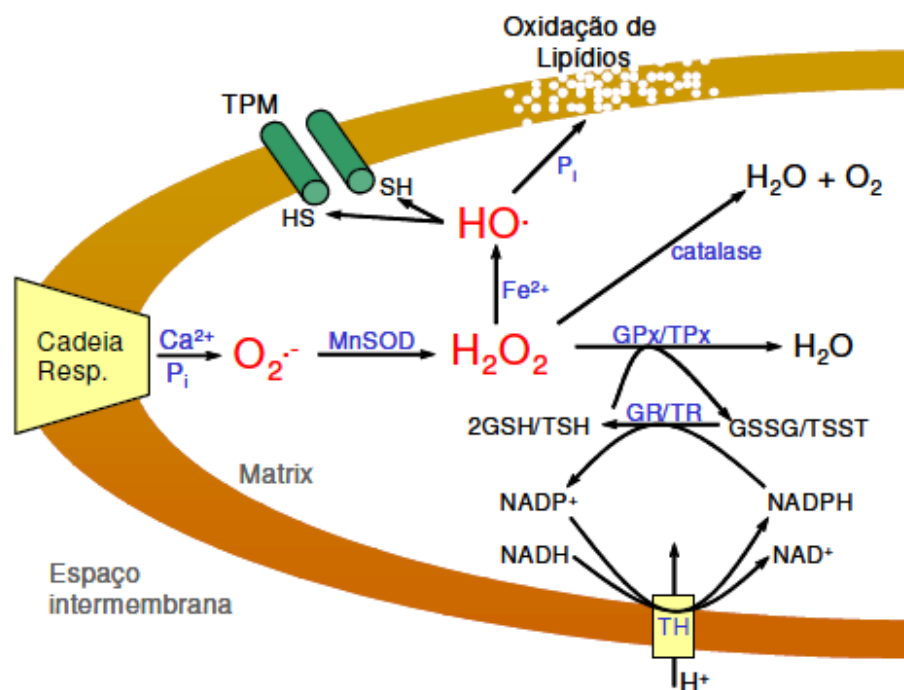
**FIGURA 2.** Esquema da cadeia respiratória e sistema redox mitocondrial mostrando o transporte de elétrons, a geração da força próton-motriz, formação de espécies reativas de oxigênio e atividades de enzimas antioxidantes (2) modificado por (3).

## 1.6. TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL

Devido ao alto conteúdo protéico da membrana mitocondrial interna, é esperado que estas proteínas sejam um dos principais alvos das EROs geradas pela mitocôndria. Estas proteínas sofrem extensa oxidação em condições de estresse oxidativo mitocondrial induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  (64-69). As EROs, principalmente o radical hidroxil, são capazes de oxidar resíduos de cisteína e metionina proteicos, levando à formação de ligações cruzadas S-S e sulfóxido de metionina, respectivamente. Como a oxidação de resíduos de metionina tem pouco efeito sobre a estrutura e função protéica (70), a disfunção mitocondrial

devido à oxidação de proteínas da membrana mitocondrial, provavelmente está associada à oxidação de resíduos de cisteína, com a formação de ligações cruzadas S-S (64, 67).

As alterações oxidativas das proteínas da membrana mitocondrial interna que ocorrem na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  levam a uma permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM- para revisão (4, 71, 72). A TPM é caracterizada por uma permeabilização progressiva da membrana mitocondrial interna, que gradativamente se torna permeável a prótons, íons, outros solutos e até mesmo pequenas proteínas (72). Esta permeabilização é dependente da presença de  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial, e é inibida por concentrações submicromolares de ciclosporina A, um imunossupressor (73, 74), provavelmente devido à ligação da ciclosporina a ciclofilinas da membrana mitocondrial interna, que seriam necessárias para a abertura do poro da TPM (75, 76). Experimentos com animais Knockout (77) mostram a importância da ciclofilina D na TPM. Foi verificado que houve proteção contra a geração de EROs e a formação de TPM. O nome "transição de permeabilidade" é utilizado devido à observação de que a permeabilização mitocondrial pode ser parcialmente revertida pela adição de quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  ou redutores ditiólicos logo após a permeabilização (**FIGURA 3**) (65, 67, 78, 79).



**FIGURA 3. Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  e EROs na membrana mitocondrial interna (4).** A cadeia respiratória, inserida na membrana mitocondrial interna, constantemente gera pequenas quantidades de radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Estes radicais são normalmente removidos pela Mn-superóxido dismutase (MnSOD), que promove a geração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é então reduzido à  $\text{H}_2\text{O}$  pela glutatona peroxidase (GP), tioredoxina peroxidase (TP) ou catalase (em mitocôndria de coração). GSH, oxidado pela GP, e TSH, oxidado pela TP, são recuperados pelo sistema enzimático glutatona e tioredoxina redutases (GR e TR), que usam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então  $\text{NADP}^+$  usando a NAD(P) transidrogenase. Quando a geração de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  aumenta na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{P}_i$ , e/ou os mecanismos de remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  estão inativados,  $\text{H}_2\text{O}_2$  acumula-se e na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ , gera o radical  $\text{OH}^{\bullet}$  altamente reativo.  $\text{OH}^{\bullet}$  oxida grupos tiólicos (-SH) do complexo do poro de TPM, levando à formação e abertura do poro. Alternativamente,  $\text{OH}^{\bullet}$  pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por  $\text{P}_i$ .

Embora a oxidação de grupamentos tiólicos na TPM seja um processo generalizado (4, 66, 80), é provável que a permeabilização da membrana mitocondrial seja promovida pela oxidação de um grupo específico de proteínas (65, 67, 71, 81). O translocador de ADP/ATP é a proteína mais abundante da membrana mitocondrial interna, possui quatro resíduos de cisteína (82) e certamente está envolvido no processo de TPM. Ligantes do translocador de ADP/ATP que o mantêm na sua configuração *c* (o sítio de ligação para o nucleotídeo está voltado para o lado citoplasmático), como ADP e bongkreonato, inibem e até reverterem a TPM, enquanto ligantes que mantêm o translocador em sua conformação *m* (o sítio de ligação para o nucleotídeo está voltado para o lado da matriz mitocondrial), como o carboxiatractilosídeo, promovem TPM (67, 78, 83). O ADP também é capaz de inibir parcialmente, de modo sensível a carboxiatractilosídeo, oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial promovida por TPM (67). Por outro lado, Novgorodov e colaboradores (84) demonstraram que o translocador de ADP/ATP participa indiretamente da formação do poro de TPM. Estes resultados sugerem que alterações na configuração do translocador de ADP/ATP podem mudar o posicionamento de grupamentos tiólicos de proteínas de membrana, promovendo ou inibindo sua oxidação, e, conseqüentemente, a ocorrência de TPM (72).

### **1.7. CÁLCIO E MEMBRANA ASSOCIADA A MITOCÔNDRIA (MAM)**

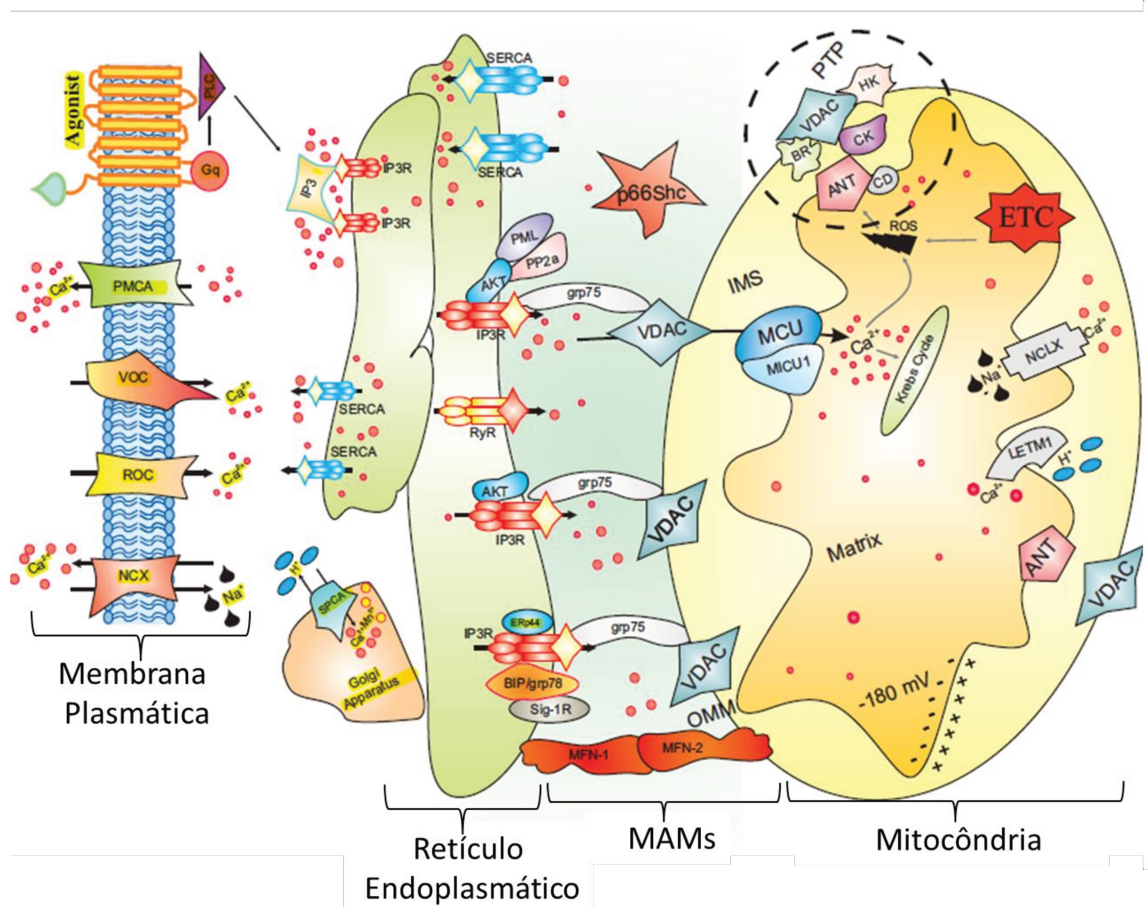
As variações da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  são fundamentais para a sinalização de vários processos celulares, tais como, proliferação, secreção, transporte, ativação de genes, e também para morte celular por necrose ou apoptose.

No espaço extracelular a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é de 1-2 mM. O  $\text{Ca}^{2+}$  entra na célula através de canais de específicos situados na membrana plasmática. As organelas como, retículo endoplasmático, principalmente e a mitocôndria são

organelas que podem captar  $\text{Ca}^{2+}$  do citoplasma e armazená-lo em grandes concentrações, para equilibrar a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma. O retículo endoplasmático é capaz de captar entre 250 e 600  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  (5) e na mitocôndria a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  livre é entre 100 a 300  $\text{nM}$  (85, 86).

Além dessas organelas captarem o  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático por canais específicos como SERCA (retículo) e VDAC (mitocôndria), existe uma interação física e direta entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria, e essa interação é formada por diversas proteínas presentes na membrana do retículo (AKT, IP3R entre outras), na membrana da mitocôndria (VDAC) e ainda há uma proteína que faz a ponte entre essas proteínas do retículo com as proteínas da membrana mitocondrial, transferindo-se assim o  $\text{Ca}^{2+}$  de uma organela para a outra independentemente do citoplasma. Essa fração subcelular é conhecida como MAM (Mitochondrial Associated Membranes – **FIGURA 4**) (5). Em condições fisiológicas, as proteínas localizadas no MAM (PML, AKT, grp-75, BiP) regula a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático para a mitocôndria, de acordo com a necessidade da mitocôndria frente a estímulos para seus processos funcionais ou mesmo para a morte celular. Porém, essas proteínas reguladoras de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser desreguladas, liberando  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo para a mitocôndria, em excesso. Estando o  $\text{Ca}^{2+}$  em excesso na matriz mitocondrial, podem ser desencadeadas reações irreversíveis como a TPM.

Essa aproximação do retículo endoplasmático e da mitocôndria ocorre devido a seletivas transferências de  $\text{Ca}^{2+}$  em variados tipos celulares e uma das razões dessa aproximação é devido à fusão e fissão mitocondrial (5).



**FIGURA 4. Representação da dinâmica de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e das proteínas do MAM envolvidas no transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático e mitocôndria (modificado de (5)).** Uma série de estímulos atua sobre os receptores da membrana plasmática ativando a proteína PLC que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ao IP3. O IP3 se liga ao receptor IP3R estimulando a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático para a mitocôndria. Esse transporte é feito de forma direta através da proteína grp75, transferindo o  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo para a mitocôndria através do VDAC. Na MMI há uma série de canais e bombas que introduzem ou retiram o  $\text{Ca}^{2+}$  da matriz mitocondrial, porém, este  $\text{Ca}^{2+}$  em excesso na matriz pode causar danos irreversíveis como a TPM.

## 1.8. MORTE CELULAR INDUZIDA POR TPM

Na morte celular necrótica, o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ocorre por falência dos mecanismos homeostáticos do cátion, o que pode levar a TPM generalizada, depleção de ATP e morte celular. No caso da morte por apoptose, relacionada ao aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , a TPM seria um evento localizado em sítios de aumento regulado deste íon e a manutenção da produção de ATP, seria preservada as custas de mitocôndrias não atingidas. A abertura do poro de transição de permeabilidade promove a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais tais como Pró-caspase 9, SMAC/DIABLO, fator indutor de apoptose (AIF) e citocromo c. A presença destes fatores no citosol leva a ativação de proteases denominadas caspases, que iniciam a fase efetora da apoptose e culminam com o encolhimento e fragmentação celular, formando os corpos apoptóticos. No núcleo celular ocorre condensação da cromatina e fragmentação do DNA. Finalmente, os restos celulares são fagocitados por células vizinhas. Este processo é fisiológico e necessário para a vida de seres multicelulares, pois elimina células desnecessárias ou disfuncionais, sem desencadear um processo inflamatório. Porém, a ausência de controle dos mecanismos de regulação da apoptose pode levar ao aparecimento de doenças degenerativas (Alzheimer, Parkinson) ou proliferativas (câncer) (para revisão (79, 87)).

## **2. JUSTIFICATIVA**

---

O DM1A é caracterizado por uma doença imunológica como resultado de um processo autoimune mediado por célula T tendo as células beta pancreáticas como alvo de destruição e essa destruição envolve a participação de EROs e ERNs (88, 89). Uma das fontes de EROs e ERNs nesta doença são as citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as quais são produzidas por células T e macrófagos e são responsáveis por induzir apoptose e disfunção das células beta (89-91). A redução da função das células beta ou a morte dessas células é regulada por fatores transcricionais iniciados pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , combinadas (92). A transcrição de fatores que induzem apoptose pode ocorrer por diferentes mecanismos que levam a modulação de proteínas da família Bcl-2, permeabilização mitocondrial e ativação de caspases (20, 93). Estes eventos descrevem a apoptose via intrínseca, ou seja, via mitocondrial (1, 20).

As citocinas pró-inflamatórias combinadas podem levar à apoptose por duas vias: pelo estresse de retículo ou pela permeabilização mitocondrial. E ainda pode ocorrer apoptose independente das citocinas pró-inflamatórias, porém, devido ao estresse de retículo que leva ao dano mitocondrial e conseqüentemente à apoptose (1).

Mitocôndrias têm sido sistematicamente investigada por sua relação com patogenias, através da geração de EROs levando à apoptose. Sob condições fisiológicas, as mitocôndrias formam EROs, porém elas também possuem enzimas antioxidantes para detoxificar essas EROs geradas pela própria mitocôndria, controlando o estresse oxidativo (79, 94). O desequilíbrio entre a geração de EROS e a ação do sistema antioxidante, resulta em estresse oxidativo, o qual na

presença de  $\text{Ca}^{2+}$  resulta na morte celular através da TPM (4, 95). O TPM é uma permeabilização não seletiva da membrana mitocondrial interna normalmente promovida pelo acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  o qual é estimulado por uma variedade de componentes e condições (95). Este processo pode ser um entre vários processos que favorecem a sinalização de moléculas de apoptose da mitocôndria para o citosol (96).

Algumas doenças metabólicas estão relacionadas com a geração de EROs que podem levar a TPM, como: hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, distúrbios no metabolismo de glicose e dislipidemias (79, 94, 97-101). O objetivo principal é estabelecer uma relação entre a disfunção mitocondrial, principalmente pela geração de EROS e as alterações do metabolismo da glicose, que levam ao DM1A. Assim, o objetivo específico deste estudo foi analisar a disfunção mitocondrial em biópsias de fígado e músculo, mitocôndrias isoladas de fígado, linfócitos de baço e circulantes, células tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea e ilhotas pancreáticas de camundongos NOD em diferentes estágios, antes, durante e depois da destruição de células beta pancreáticas.

### **3. OBJETIVOS**

---

### **3.1. OBJETIVOS GERAIS**

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram a disfunção mitocondrial através da participação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  em tecidos de modelos animais que apresentavam estresse oxidativo, incluindo distúrbios metabólicos, tais como dislipidemias, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (79, 98, 100, 101). Dessa forma, sabendo que o diabetes mellitus tipo 1A é uma doença auto-imune e metabólica e ainda, tendo em vista a provável participação de espécies reativas de oxigênio na destruição das células beta pancreáticas, nosso objetivo foi investigar possíveis alterações da função mitocondrial associadas ao diabetes, em camundongos NOD/unib nos estados não-diabético, pré-diabético e diabético comparado a animais da linhagem Balb/c (grupo controle) nas idades correspondentes.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a eficiência da respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa em biópsias de fígado e músculo esquelético e mitocôndrias isoladas de fígado.
- Avaliar a suscetibilidade à abertura do poro de transição de permeabilidade em preparações de mitocôndrias isoladas de fígado, utilizando ensaios de inchamento mitocondrial e transporte de íon cálcio.

- Avaliar o estresse oxidativo ou dano celular através de indicadores da geração de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias isoladas e células relevantes para o desenvolvimento do diabetes tipo 1A: células linfomononucleares de baço e de sangue periférico, células tronco isoladas de medula do fêmur e ilhotas pancreáticas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

---

#### 4.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos NOD/unib e Balb/c fêmeas provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e armazenadas em condições sanitárias livres de patógenos conhecidos (SPF), com controle de luz e temperatura, recebendo ração e água *ad libitum*, no biotério do laboratório de Imunologia e Alergia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob supervisão do Professor Doutor Ricardo de Lima Zollner. De acordo com Ventura-Oliveira et al. (2003) (102) e Vilella et al. (2005) (103), que utilizaram a mesma colônia de camundongos NOD, provenientes do CEMIB e mantidos no mesmo biotério SPF, camundongos NOD/unib com 4 a 6 semanas de vida possuem pouco infiltrado inflamatório (sendo considerados não diabéticos), o infiltrado inflamatório é pouco maior com 8 semanas de vida (sendo considerados pré diabéticos) e com 16 e 20 semanas de vida há a presença de insulite, estando as ilhotas destruídas (sendo considerados diabéticos). Tendo em vista que o Diabetes Mellitus tipo 1 A ocorre de maneira progressiva, os camundongos NOD/unib foram divididos em 3 grupos de acordo com a destruição das ilhotas:

- Não-diabético: constituído por animais com 4 a 6 semanas de vida e glicemia até 100 mg/dL.
- Pré-diabético: constituído por camundongos com 7 a 10 semanas de vida e glicemia entre 100 e 150 mg/dL.
- Diabéticos: composto por animais com 14 a 25 semanas de vida e glicemias acima de 250 mg/dL.

Como grupo controle, nós utilizamos os camundongos Balb/c nas idades correspondentes aos camundongos NOD/unib.

A glicemia foi verificada nos camundongos NOD/unib semanalmente retirando-se amostra de sangue da veia caudal do animal e submetida a glicofita (Optium™, Abbott Diabetes Care Limited, Reino Unido)(104, 105).

.O sacrifício foi feito por deslocamento cervical, seguido da extração de cada órgão a ser analisado. Somente para a extração de sangue total por punção cardíaca, os animais foram submetidos à anestesia intraperitoneal de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil).

#### **4. 2. BIÓPSIA DE FIBRA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO**

O músculo esquelético sóleo foi retirado e mantido em um meio de conservação de biópsias contendo tampão  $\text{Ca}^{2+}$  /EGTA 10 mmol/L, imidazol 20 mmol/L, MES 50 mmol/L, dithiothreitol 0,5 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  7 mmol/L, ATP 5 mmol/L, fosfocreatina 15 mmol/L, pH 7,1. Em seguida 3-5 mg de tecido foram retirados e, com o auxílio de pinças, as fibras do tecido foram dissecadas e pesadas. Em seguida, as fibras foram inseridas em meio de conservação de biópsias acrescido de saponina 50 µg/ml por 30 minutos, para a permeabilização das células. Após esse período, o tecido foi lavado por 3 vezes em meio MiR05 (lactobionato de potássio 60 mmol/L, EGTA 0,5 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  3 mmol/L, taurina 20 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mmol/L, HEPES 20 mmol/L, sacarose 110 mmol/L, BSA 1 g/L, pH 7,1).

#### **4. 3. BIÓPSIA DE FÍGADO**

O fígado foi retirado e cortado em fragmentos de 1 mm no aparelho Tissue Shopper e em seguida foi colocado no meio de conservação de biópsias contendo tampão  $\text{Ca}^{2+}$  /EGTA 10 mmol/L, imidazol 20 mmol/L, MES 50 mmol/L, dithiothreitol 0.5 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  7 mmol/L, ATP 5 mmol/L, fosfocreatina 15 mmol/L, pH 7.1. Em seguida 3-5 mg de tecido foram retirados e, com o auxílio de pinças, o tecido foi pesado. Em seguida, os fragmentos de fígado foram inseridos em meio de conservação de biópsias acrescido de saponina 50  $\mu\text{g/ml}$  por 30 minutos, para a permeabilização das células. Após a esse período, o tecido foi lavado por 3 vezes em meio MiR05 (lactobionato de potássio 60 mmol/L, EGTA 0.5 mmol/L,  $\text{MgCl}_2$  3 mmol/L, taurina 20 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mmol/L, HEPES 20 mmol/L, sacarose 110 mmol/L, BSA 1 g/L, pH 7,1).

#### **4.4. ISOLAMENTO DE MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE CAMUNDONGO**

Mitocôndrias foram isoladas de fígados de camundongos utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial, segundo Schneider e Hogeboom (106). Os fígados, retirados após a morte dos animais por deslocamento cervical, foram lavados em solução de sacarose 250 mM contendo tampão 10 mM de HEPES pH 7,2 e 0,5 mM de EGTA, picados com tesoura e homogeneizados em homogeneizador Potter-Elvehjem. O material foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante resultante foi centrifugado durante 10 minutos a 8000 rpm sendo a fase lipídica superior retirada com pipeta Pasteur. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 250 mM de sacarose, 5 mM de

HEPES pH 7,2 e 0,3 mM de EGTA, e novamente centrifugado como a condição anterior. A fração mitocondrial foi ressuspensa na mesma solução e isenta de EGTA.

#### **4.5. ISOLAMENTO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS**

Baços foram cuidadosamente homogeneizados em um homogeneizador manual Douncer e depositado sobre gradiente de Ficoll-Hypaque ( $d = 1,076\text{g/ml}$ ) sendo a seguir centrifugados a 1400 rpm por 25 minutos a 24°C. Ao final da centrifugação, a camada correspondente às células mononucleares, localizadas na interface entre o gradiente e o plasma foi coletada, removendo-se eritrócitos e debris através de duas ou três lavagens em PBS a 500 rpm por 10 minutos a 24°C. As células foram ressuspensas em PBS e contadas usando câmara de Neubauer e só utilizadas quando apresentaram viabilidade celular >98% em azul de tripan.

#### **4.6. ISOLAMENTO DE CÉLULAS LINFOMONONUCLEARES A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO**

O sangue periférico foi retirado dos camundongos através de punção cardíaca com uma seringa de 1 ml e transferido para tubo coletor contendo anticoagulante. Logo após, o sangue retirado de 2 animais foi transferido para tubo falcon de 15 ml contendo 2 ml de Ficoll-Hypaque ( $d = 1,076\text{g/ml}$ ; Sigma).

A transferência foi realizada com o auxílio de pipeta Pasteur, para evitar a mistura do sangue com o ficoll, de modo a formar duas fases. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos. Após centrifugação, o anel de célula formado na interface das soluções foi retirado com pipeta Pasteur e transferido para outro tubo falcon de 15 ml, completando o volume com PBS para 10 ml e em seguida foi centrifugado a 1500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e a fração celular foi ressuspensa em 5 ml de tampão de lise, ficando por 15 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi acrescentado 5 ml de PBS e centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e foi feita outra lavagem com PBS. A fração celular foi ressuspensa em PBS e submetida à coloração Azul de Tripán para a contagem das células.

#### **4.7. ISOLAMENTO DE CÉLULAS TRONCO DE MEDULA FEMURAL**

Após o sacrifício dos animais os fêmures foram expostos. Em seguida, os fêmures foram seccionados entre a articulação fêmur-ilíaca e fêmur-tibial. Com o auxílio de uma seringa e agulha, foi injetado PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino. A suspensão celular foi então colocada em tubo Falcon e homogeneizada até a total dissociação das células. Em seguida, a suspensão foi transferida para tubo falcon de 15 ml contendo 3 ml da Ficoll-Hypaque ( $d = 1,076\text{g/ml}$ ; Sigma). A transferência foi realizada com o auxílio de pipeta Pasteur, para evitar a mistura do sangue com o ficoll, de modo a formar duas fases. Em

seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos. Após centrifugação, o anel de célula formado na interface das soluções foi retirado com pipeta Pasteur e transferido para outro tubo falcon de 15 ml completando o volume com PBS para 10 ml e logo a seguir foi centrifugado a 1500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e a fração celular foi ressuspensa em 5 ml de tampão de lise, ficando por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foi acrescentado 5 ml de PBS e centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e foi feita outra lavagem com PBS. A fração celular foi ressuspensa em PBS e submetida à coloração por Azul de Tripán para a contagem das células.

#### **4.8. ISOLAMENTO DE ILHOTAS PANCREÁTICAS**

As ilhotas foram isoladas seguindo-se a técnica originalmente descrita por MOSKALEWSKI (107), aplicada a pâncreas murino por LACY e KOSTIANOVSKY (108), com algumas modificações. A cavidade abdominal e torácica foi aberta e o pâncreas localizado. Após distensão e seu isolamento dos outros órgãos, o pâncreas foi infundido com solução de Hank enriquecido com 2,8 mM de glicose, contendo 2 mg/ml de collagenase (Sigma) através de seringa até o seu intumescimento. A seguir, o órgão foi removido e transferido para uma placa de Petri onde sofreu fragmentação suave com o auxílio de tesoura cirúrgica. A suspensão foi então transferida para tubo de ensaio vedado com rolha e encubado em banho térmico a 37°C durante 24 minutos. Decorrido esse período e sob o

banho térmico, o tubo foi agitado manualmente por aproximadamente 1 minuto, para finalizar a digestão do órgão. Em seguida, o conteúdo foi transferido para um Becker de 100 ml e adicionado Hank gelado até completar volume de 80 ml. Após intervalo de 2 minutos, o sobrenadante foi aspirado com uma seringa de 20 ml. Repetiam-se este procedimento três vezes com a finalidade de separação do tecido adiposo, collagenase e enzimas pancreáticas.

O isolamento das ilhotas foi realizado manualmente através de lupa, colocando-se por volta de 10 ml da suspensão de ilhotas em Hank contendo 2,8 mM de glicose e 3 mg/ml de albumina em uma placa de Petri com fundo escuro. As ilhotas foram coletadas por aspiração, com auxílio de pipeta Pasteur. A seguir, as ilhotas foram transferidas para outra placa de Petri com fundo escuro contendo Hank suplementado com 2,8 mM de glicose e 3 mg/ml de albumina. As ilhotas coletadas foram transferidas para tubo plástico de 1,5 ml e em seguida submetidas aos experimentos de consumo de oxigênio e produção EROs.

#### **4.9. DOSAGEM DE PROTEÍNAS**

A concentração de proteína foi determinada pelo método de biureto (109), modificado pela adição de colato 1% (110). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda de 540 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, do qual uma solução de BSA a 1% é utilizada como padrão.

#### **4.10. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DOS EXPERIMENTOS COM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS**

Os experimentos com mitocôndrias foram realizados a 28°C em meio de reação padrão contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de Cloreto de potássio, 10 mM de HEPES pH 7,2, 2 mM de fosfato de sódio, e 1 mM de cloreto de magnésio. Como substrato respiratório foi utilizado malato, piruvato, glutamato e  $\alpha$ -cetoglutarato (5 mM). Experimentos com células isoladas foram realizados a 37°C em meio HBSS tamponado (Invitrocell).

#### **4.11. CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL**

O consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas (0,5 mg/ml) foi medido em meio de reação padrão, utilizando-se um eletrodo do tipo Clark (Hansatech Instruments, Pentney King's Lynn, GR) conectado a um oxígrafo tipo Clark, em uma câmara de acrílico de 0,5 ml, equipada com agitador magnético. A concentração de oxigênio inicial no meio de reação a 28 °C é de 225 nmol/ml (111). O consumo de oxigênio das biópsias de músculo e fígado foi medido utilizando-se um oxígrafo de alta resolução OROBOROS (Innsbruck, Áustria) equipado com agitador magnético, utilizando 2 ml de meio MiR05, a 37°C e como substrato respiratório foram utilizados glutamato 10 mM e malato 5 mM.

## **4.12. ABERTURA DO PORO DE TRANSIÇÃO DE PERMEABILIDADE MITOCONDRIAL**

### **Medida de inchamento mitocondrial**

As suspensões mitocondriais são turvas e espalham a luz incidente. A luz espalhada é uma função da diferença entre o índice de refração da matriz e do meio, e, qualquer processo que diminua esta diferença irá diminuir a luz espalhada e aumentar a transmitância (112). Assim, um aumento no volume da matriz mitocondrial, associado com a entrada de solutos permeáveis, resulta numa aproximação entre o índice de refração da matriz e do meio de reação com a consequente diminuição da luz espalhada. O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm (113) foi realizado em um espectrofotômetro conectado a um registrador potenciométrico. As mitocôndrias de fígado de camundongo (0,5 mg de proteína/ml) foram incubadas no meio de reação, e os experimentos foram realizados a temperatura de 28°C.

### **Transporte de íons cálcio**

Captação e liberação de íons cálcio por mitocôndrias isoladas de fígado (0,5 mg/ml) foi determinada através da fluorescência emitida utilizando 0,1  $\mu$ M Calcium Green-5N (Molecular Probes) e espectrofotômetro Hitachi modelo F4500 com comprimentos de onda de excitação e emissão em 506 e 531 nm, respectivamente e temperatura em 28°C (114).

#### **4.13. ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

##### **Amplex Red**

Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão a 28 °C adicionado 10 µM Amplex-red (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) (115) e 1 U/ml HRP (116). A fluorescência foi monitorada usando o espectrofluorímetro RF5301 (Shimatsu PC, Kyoto, Japan) operando com comprimento de onda de excitação e emissão de 563 e 587 nm, respectivamente e largura da fenda de 5 nm, sob constante agitação.

##### **H<sub>2</sub>DCF-DA**

A produção de EROs em mitocôndrias, células e ilhotas isoladas dos camundongos foi monitorada espectrofluorimetricamente usando o corante permeável à membrana H<sub>2</sub>DCF-DA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína) (117, 118). Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão a 28 °C adicionado 5 µM H<sub>2</sub>DCF-DA (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). A fluorescência foi monitorada usando o espectrofluorímetro F4500 (Hitachi, Tokyo, Japan) operando com comprimento de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente e largura da fenda de 2,5 nm, sob constante agitação. Nas células isoladas (linfócitos circulantes 10<sup>5</sup> células/ml, linfócitos esplênicos e células tronco 10<sup>6</sup> células/ml) e ilhotas pancreáticas (25 i/ml) a oxidação do marcador fluorescente H<sub>2</sub>DCF-DA foi realizada utilizando meio HBSS tamponado a 37 °C.

### **MitoSOX Red**

A produção de ânion superóxido de origem mitocondrial foi medida usando MitoSOX™ Red (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). As incubações foram realizadas a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub> e o sinal de fluorescência emitido pelo MitoSOX™ Red oxidado foi detectado por citometria de fluxo. MitoSOX™ Red foi adicionado as células isoladas e lavadas (linfócitos circulantes 10<sup>5</sup> células/ml, linfócitos esplênicos e células tronco 10<sup>6</sup> células/ ml) na concentração final de 5 mM em meio RPMI 1640 (Invitrocell) e incubado a 37°C por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas. A intensidade de fluorescência foi analisada usando citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipado com laser de argônio e software CellQuest (version 4.1) com comprimento de onda de excitação e emissão de 488 nm e 620 nm, respectivamente. Foi coletado mínimo de 10.000 eventos (119).

### **4.14. ATIVIDADE DE CITRATO SINTASE**

A atividade de citrato sintase foi realizada de acordo com Shepherd e Garland (120). As amostras de fígado, músculo e de ilhotas foram homogeneizadas em tampão Tris 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 5%, pH 7,4. Após centrifugação em 700 g por 10 min, os sobrenadantes foram recuperados e diluídos em tampão Tris 50 mM para a concentração final de 1 mg. Cinco µg de proteína de cada amostra foi adicionado em microplacas pipetando 250 µL do meio de reação para citrato sintase. A leitura da microplaca foi feita em 412 nm utilizando leitor de microplacas (PowerWave XS 2, BioTek) por 6 minutos. A

atividade da enzima foi calculada como  $\mu\text{mol}$  de citrato por minuto e expresso em mg de proteína (U/mg).

#### **4.15. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) de, pelo menos, três experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. As análises estatísticas foram feitas utilizando ANOVA para comparações múltiplas, seguida pelo pós teste de Turkey e *t* teste para comparações entre duas médias.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 5. RESULTADOS

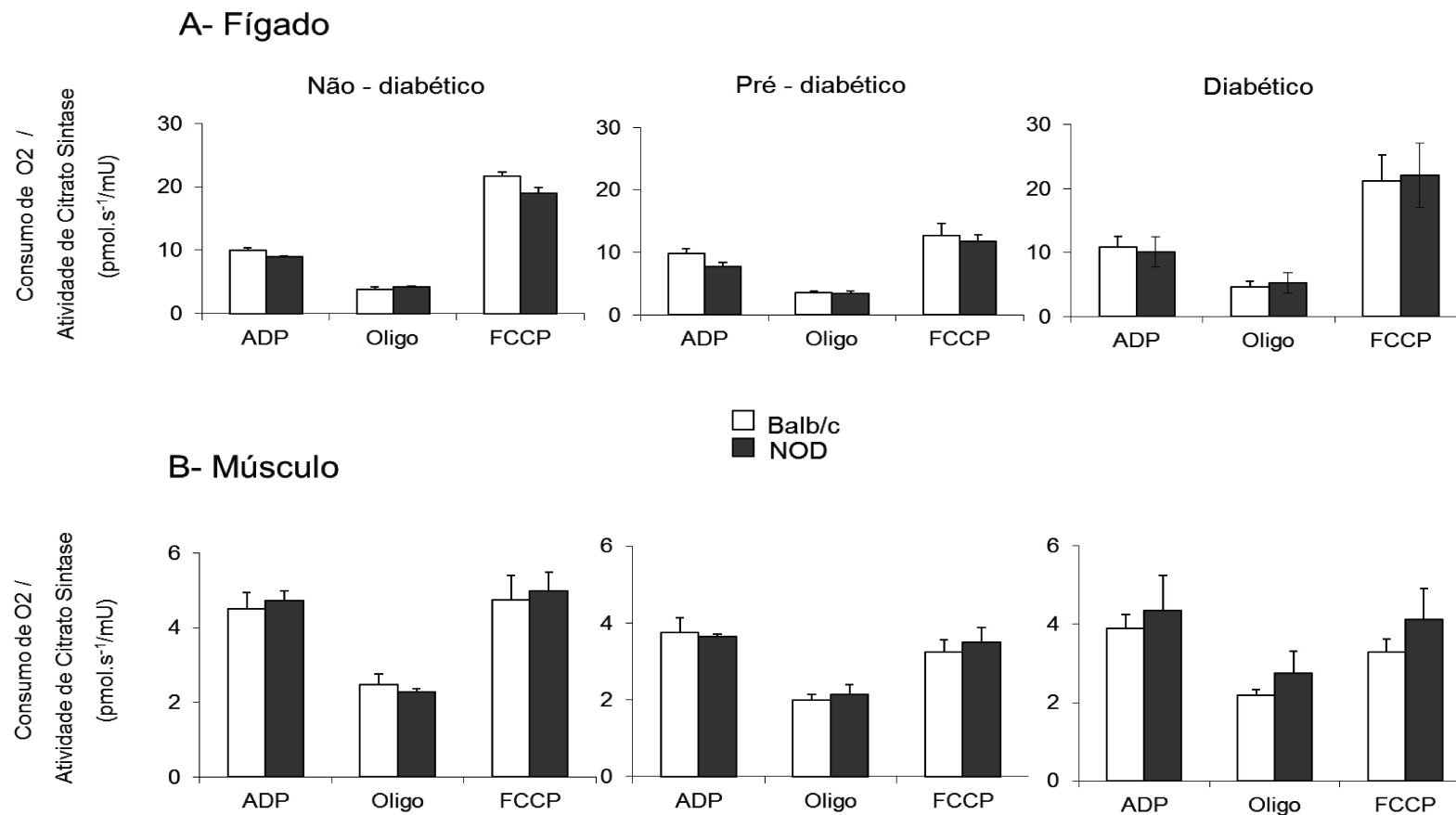
---

Sabe-se que o Diabetes Tipo 1 (DM1A) nos camundongos NOD é iniciado pela inflamação (insulite) causada pela infiltração de macrófagos e células T nas ilhotas pancreáticas seguido da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . Esses eventos contribuem para a indução de apoptose das células  $\beta$  pancreáticas (20, 39, 90) possivelmente mediada pela via mitocondrial (20).

Neste trabalho estudamos as funções mitocondriais em vários tecidos (fígado, músculo, linfócitos, células tronco e ilhotas pancreáticas) em três estágios de infiltrado inflamatório e conseqüentemente o desenvolvimento do diabetes, nomeados não-diabéticos (glicemia < 100 mg/dL, 4-6 semanas de vida), pré-diabéticos (glicemia 100-150 mg/dl, 7-10 semanas de vida) e diabéticos (glicemia > 250 mg/dl, 14-25 semanas de vida) comparados com os camundongos controles Balb/c nas idades correspondentes.

A **FIGURA 5** representa atividade respiratória mitocondrial em biópsias permeabilizadas de fígado (**painel A**) e músculo sóleo (**painel B**) no estado de repouso (adição de oligomicina A), fosforilando (adição ADP) e desacoplado (adição de FCCP). Os resultados das velocidades respiratórias foram normalizados pela atividade de citrato sintase (pmol O<sub>2</sub> / s / mU citrato sintase) e demonstram que, independentemente do estágio da doença, não houve diferenças significativas entre as atividades respiratórias dos camundongos NOD e Balb/c em ambos os tecidos. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos com mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos NOD não-diabéticos, pré-diabéticos e diabéticos comparados às mitocôndrias isoladas de camundongos Balb/c nas idades correspondentes (**Tabela 1**). Observou-se que

somente nas biópsias musculares a atividade de citrato sintase diminuiu 32% no estágio diabético (**Tabela 2**). Isso sugere que o DM1A reduz o número de mitocôndrias nesse tecido.



**FIGURA 5. Respiração mitocondrial (consumo de oxigênio) em biópsias de fígado (A) e músculo esquelético (B) não foi alterada em camundongos NOD antes e durante o desenvolvimento do diabetes.** Biópsias de tecidos (2-3 mg) foram adicionadas em meio MiR05. Adições foram: 400  $\mu$ M ADP, 1 mg/ml oligomicina, 0,2  $\mu$ M FCCP para fígado ou 1,5  $\mu$ M FCCP para músculo esquelético. Dados representados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de cinco experimentos independentes.

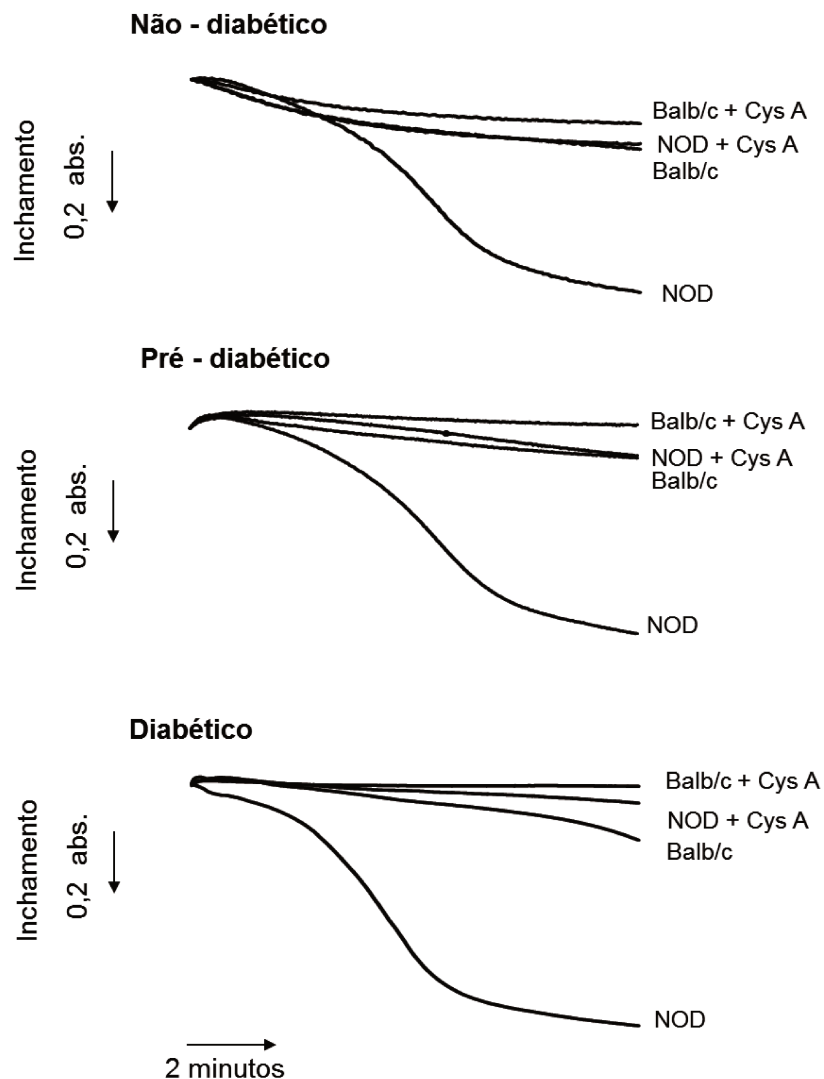
**TABELA 1.** Consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos NOD e camundongos Balb/c nas idades correspondentes, medidos na fosforilação oxidativa (V3, adição de ADP) e no estado de repouso (V4). CR- controle respiratório.

Consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado (n átomos de O/min/mg)	Não diabético 4-6 semanas de vida		Pré-diabético 7- 10 semanas de vida		Diabético 14 -25 semanas de vida	
	Balb/c n=8	NOD n=8	Balb/c n=11	NOD n=12	Balb/c n=16	NOD n=16
Estado III (Fosforilação oxidativa)	51,6 $\pm$ 1,1	54,6 $\pm$ 1,8	45,4 $\pm$ 2,6	51,4 $\pm$ 2,0	46,2 $\pm$ 1,3	44,2 $\pm$ 1,2
Estado IV (estado de repouso)	9,6 $\pm$ 0,3	11,0 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 0,5	10,2 $\pm$ 0,4	9,4 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 0,3
Controle Respiratório (Estado III/Estado IV)	5,4 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,3

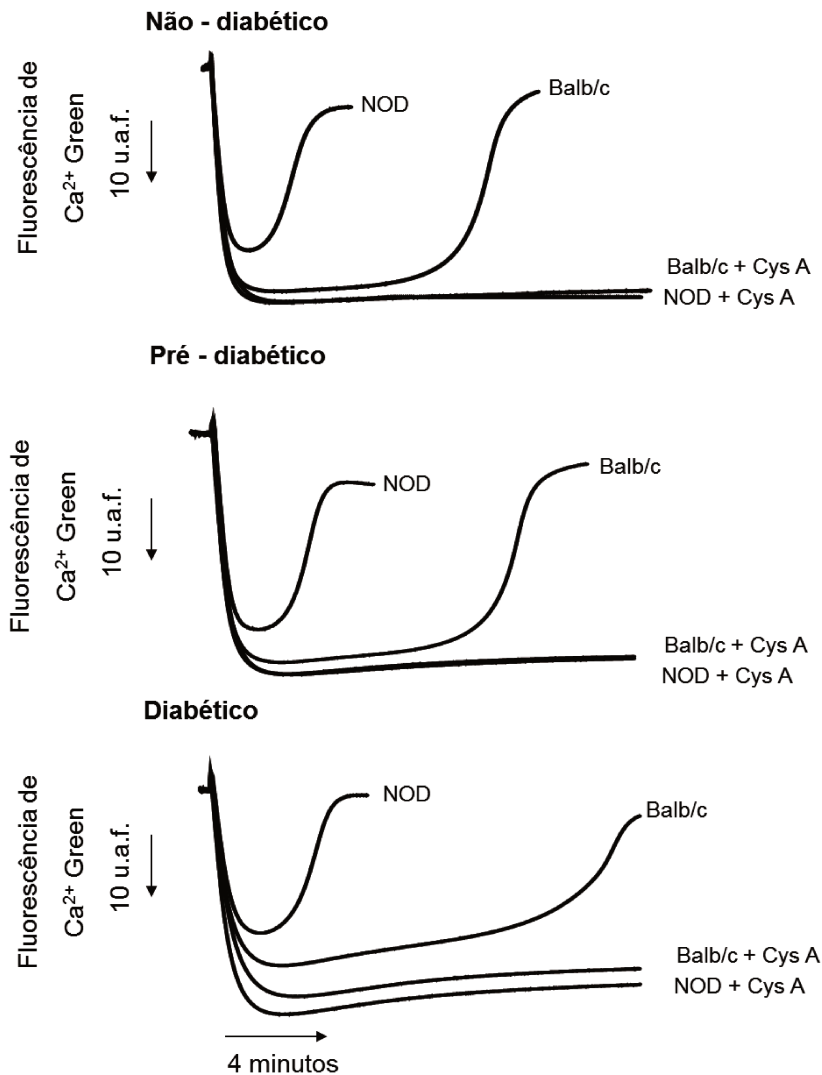
**TABELA 2.** Atividade de citrato sintase em biópsias de fígado e músculo sóleo de camundongos NOD e Balb/c nas idades correspondentes (mU/mg de tecido). Grupo não-diabético (glicemia <100 mg/dL; 4-6 semanas de vida), grupo pré-diabéticos (glicemia 100-150 mg/dL, 7-10 semanas de vida) e grupo diabético (glicemia >250 mg/dL; 14-25 semanas de vida). \*p≤ 0,05

Atividade de Citrato Sintase (um/mg de tecido)	Não diabético 4-6 semanas de vida		Pré-diabético 7- 10 semanas de vida		Diabético 14 -25 semanas de vida	
	Balb/c n=5	NOD n=5	Balb/c n=5	NOD n=5	Balb/c n=5	NOD n=5
Fígado	3,4 ± 0,7	3,6 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,9 ± 0,6	2,5 ± 0,6	2,3 ± 0,7
Músculo	8,8 ± 1,7	9,0 ± 1,7	9,3 ± 0,3	9,3 ± 1,1	9,4 ± 1,3	6,4 ± 1,9 *

Uma vez que a apoptose pode ser desencadeada pela transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) foi avaliada a susceptibilidade das mitocôndrias de camundongos NOD para este processo, determinando o inchamento mitocondrial induzido por  $\text{Ca}^{2+}$  e pela capacidade das mitocôndrias em manter o cátion acumulado. A **FIGURA 6** mostra que em todas as fases da doença as mitocôndrias de fígado de camundongos NOD apresentam extenso inchamento sensível a ciclosporina A, em contraste com mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos Balb/c. Em concordância com esses resultados, as mudanças na fluorescência de  $\text{Ca}^{2+}$  Green mostrado na **FIGURA 7** indicam que mitocôndrias de fígado de NOD retêm  $\text{Ca}^{2+}$  por um período mais curto de tempo do que mitocôndrias de fígado de Balb/c, independentemente do estágio da doença: mitocôndrias de Balb/c são capazes de reter cálcio 3-5 vezes mais do que mitocôndrias de NOD. Estes resultados indicam que mitocôndrias de fígado de NOD são mais susceptíveis a TPM induzida  $\text{Ca}^{2+}$  e não está relacionado com o aumento dos níveis de glicemia.



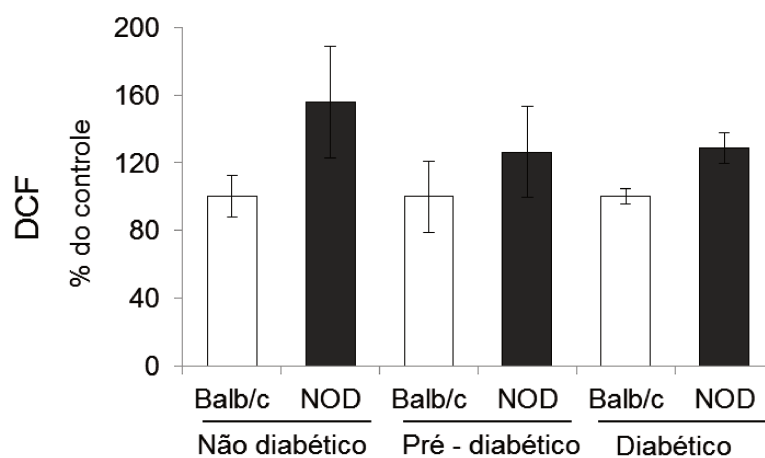
**FIGURA 6. Suscetibilidade de inchamento mitocondrial induzido por cálcio em mitocôndrias é marcadamente maior em camundongos NOD antes e durante o desenvolvimento do diabetes.** Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas em meio padrão a 28°C com adição de 60  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Absorbância em 10 minutos para Balb/c vs. NOD foram: Grupo Não-diabético:  $1,1 \pm 0,2$  vs.  $0,86 \pm 0,1$ ; Grupo Pré-diabético:  $1,06 \pm 0,2$  vs.  $0,82 \pm 0,1$ ; Grupo Diabético:  $1,3 \pm 0,3$  vs.  $1,02 \pm 0,3$ .  $P < 0,05$  para todas as comparações. Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média. Figura representativa de oito experimentos em duplicatas.



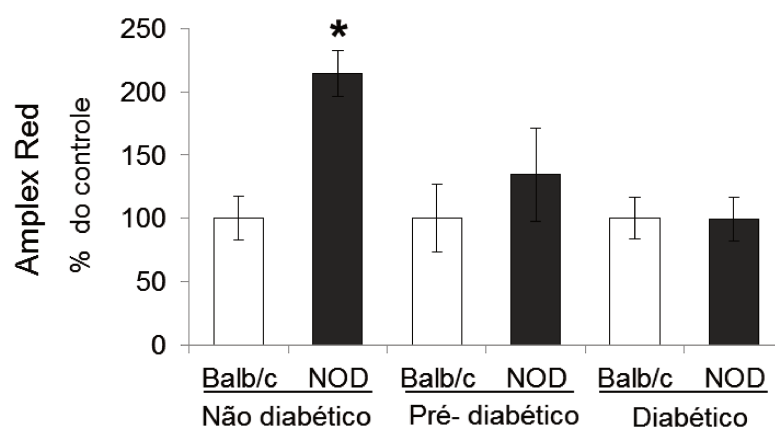
**FIGURA 7. Capacidade mitocondrial de retenção de cálcio é profundamente reduzida em camundongos NOD antes e durante o desenvolvimento do diabetes.** Mitochondrias (0,5 mg/ml) foram incubadas com meio padrão a 28°C com 0,1  $\mu$ M calcium green em 5 N de sal hexapotássio. Tempo (segundos) de liberação do cálcio por Balb/c vs. NOD foram: Grupo não diabéticos:  $972,2 \pm 122,0$  vs.  $349,2 \pm 132,9$ ; Grupo Pré-diabéticos:  $670,8 \pm 151,8$  vs.  $244,5 \pm 96,6$ ; Grupo Diabético:  $968,9 \pm 28,5$  vs.  $182,8 \pm 11,9$ ;  $P < 0.05$  para todas as comparações. Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média. Figura representativa de oito experimentos em duplicatas.

É conhecido (69, 72) que as espécies reativas de oxigênio (EROS) tem um papel importante na abertura do poro TPM. Assim, utilizamos dois marcadores diferentes para estresse oxidativo: Amplex red, uma sonda específica para peróxido de hidrogênio e H<sub>2</sub>DCF-DA o qual detecta uma grande variedade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (121), bem como os danos e morte celular como consequência do estresse oxidativo (122). Alteração na fluorescência de ambos H<sub>2</sub>DCF-DA (**FIGURA 8 A**) e Amplex Red (**FIGURA 8 B**) nas mitocôndrias isoladas de fígado de NOD ou Balb/c indicam que apenas as mitocôndrias isoladas de camundongos NOD não diabéticos estão sob estresse oxidativo. Os dados sugerem que tanto a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou sua taxa de eliminação é significativamente alterada em mitocôndrias de NOD não-diabéticos, em comparação com a idade correspondente em camundongos Balb/c controles. Curiosamente, em estágios mais avançados de diabetes, as diferenças nas taxas de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em mitocôndrias de fígado de NOD e Balb/c desaparecem.

A

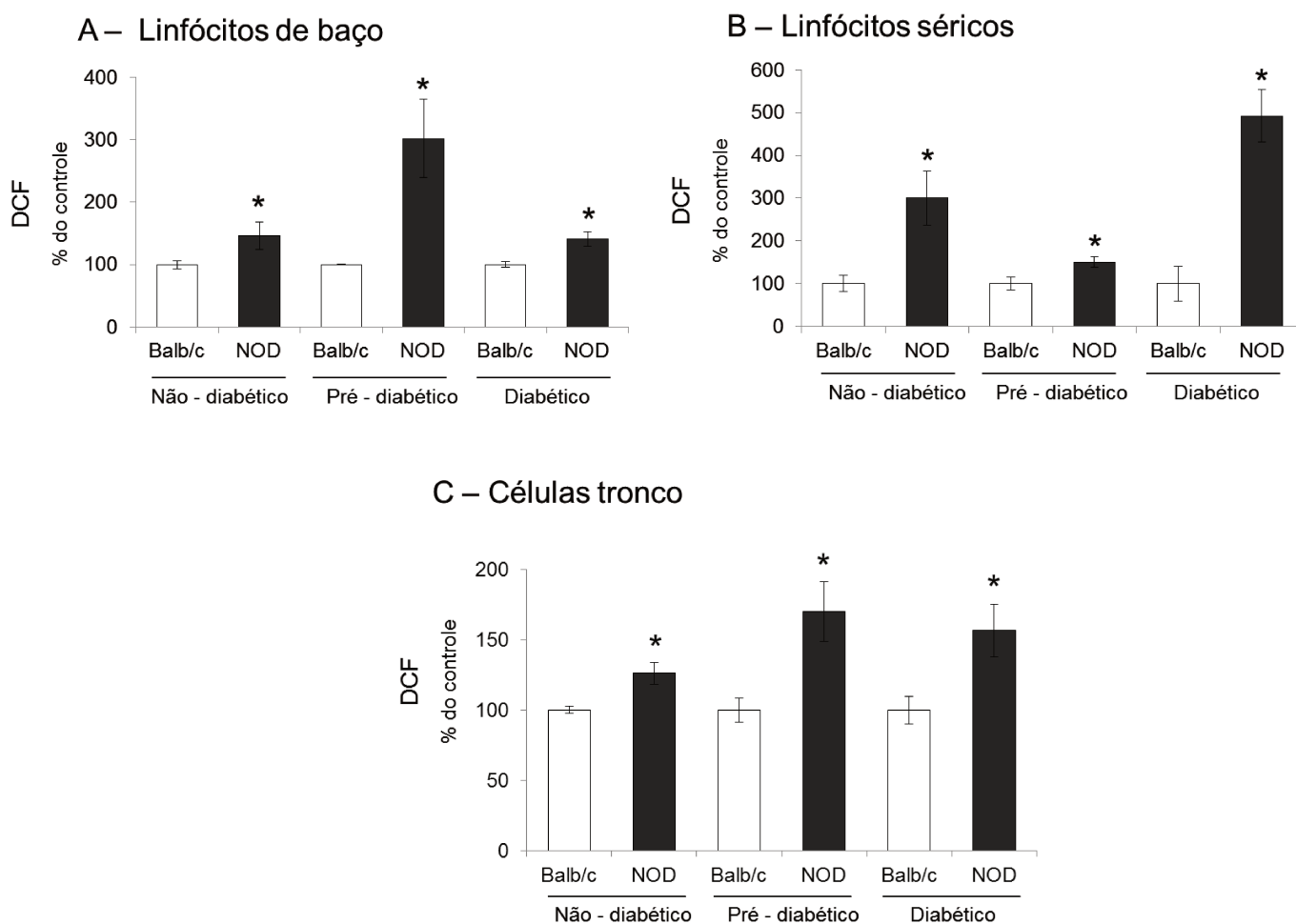


B

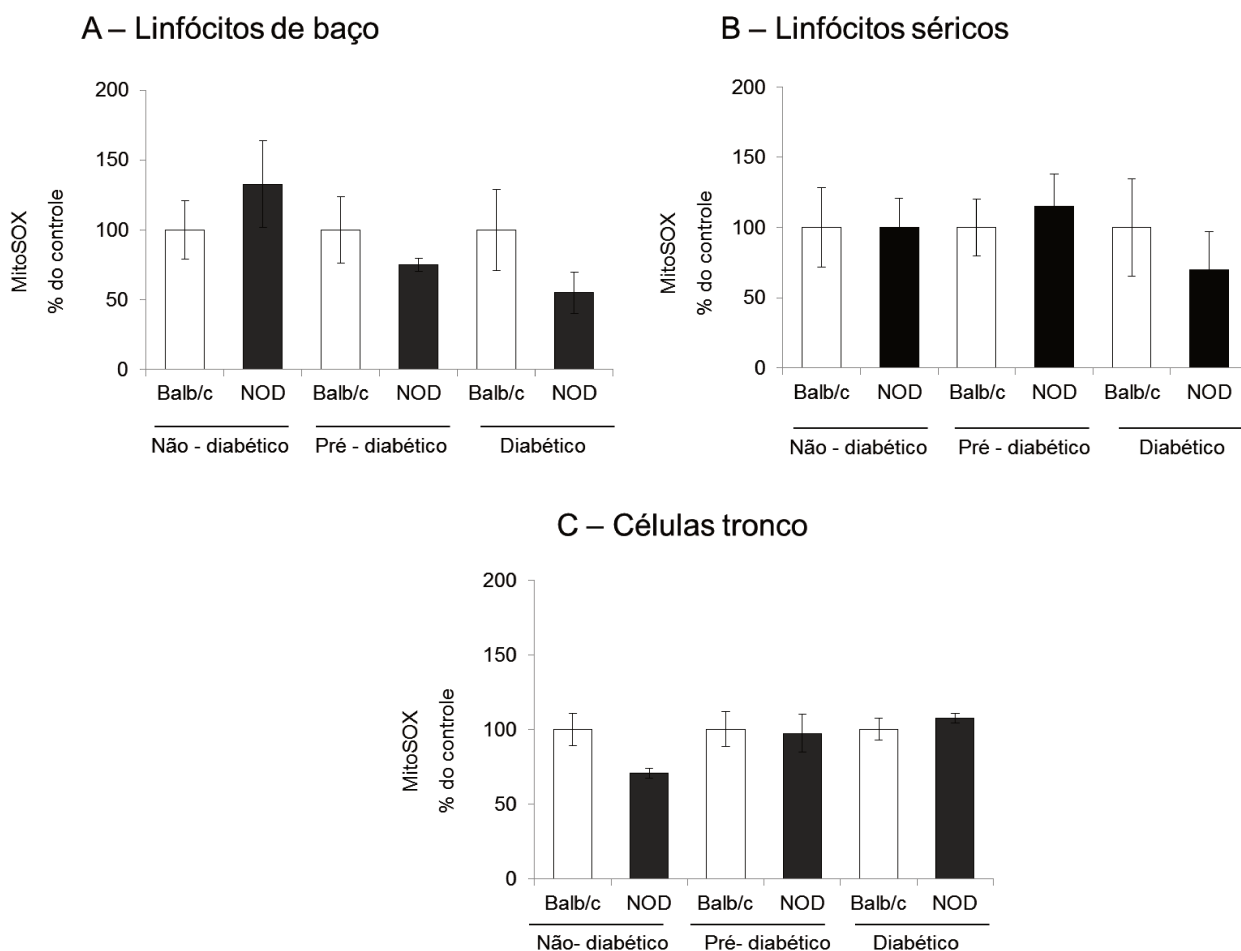


**FIGURA 8. Geração mitocondrial de  $H_2O_2$  (Amplex-red) é aumentada em camundongos NOD não-diabéticos, mas não nos demais estágios da doença.** Mitocôndrias (0,5 mg/ml) foram incubadas com meio padrão a 28 °C, na presença de 1  $\mu$ M  $H_2DCF$ -DA (A) e 10  $\mu$ M Amplex-red e 1 U/ml horseradish peroxidase (B) e 10  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ . Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle. Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de cinco experimentos independentes em duplicatas. \* $p \leq 0,05$  NOD vs. Balb/c (Student t test).

Como DM1A é uma doença autoimune que envolve a ativação linfocitária, um processo associado ao estresse oxidativo (39, 43, 123, 124) investigamos a produção de EROS em linfócitos de baço e séricos e ainda seus precursores, as células tronco. Células tronco hematopoiéticas podem ser diferenciadas em células linfóides como os linfócitos T e B, importantes no desenvolvimento do DM1A (125). Para esses experimentos, utilizamos H<sub>2</sub>DCF-DA e MitoSOX, um marcador para ânion superóxido mitocondrial apropriado para experimentos com células intactas (126, 127). Níveis mais elevados de oxidação de H<sub>2</sub>DCF-DA ocorreram em todos os tipos de células em todas as fases do diabetes em camundongos NOD em comparação com as células de camundongos Balb / c nas respectivas idades. Estes resultados não mostraram relação linear para o estado glicêmico dos camundongos (**FIGURA 9, A-C**). Em contraste com H<sub>2</sub>DCF-DA, as mudanças na fluorescência de MitoSOX não revelaram qualquer diferença entre os camundongos NOD e Balb/c em todas as fases da doença nos linfócitos do baço (**FIGURA 10 A**), de linfócitos circulantes (**FIGURA 10 B**), bem como células tronco hematopoéticas (**FIGURA 10 C**).

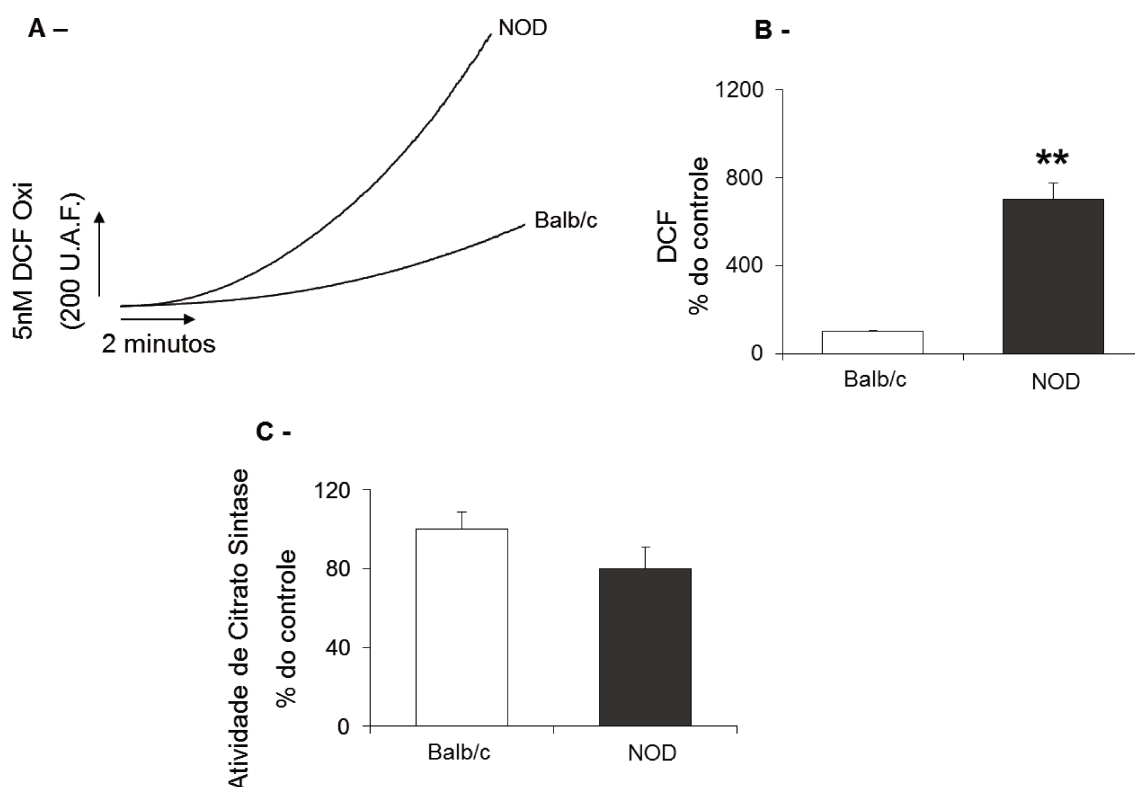


**FIGURA 9. Oxidação de H<sub>2</sub>DCF-DA é aumentada em linfócitos não permeabilizados e em células troncos de camundongos NOD antes e durante o desenvolvimento do diabetes.** 1 x 10<sup>6</sup> linfócitos de baço (A), 1 x 10<sup>5</sup> linfócitos circulantes (B) e 1x10<sup>6</sup> células tronco (C) foram incubadas com meio HBSS na presença de 1μM H<sub>2</sub>DCF-DA. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle. Dados apresentados em média ± Erro Padrão da Média de cinco experimentos independentes em duplicatas. \*p ≤ 0,05 NOD vs. Balb/c (Student t test).



**FIGURA 10. Produção de superóxido mitochondrial (MitoSox) não é alterada nos linfócitos e células tronco intactos isolados de camundongos NOD ao longo do desenvolvimento do diabetes.**  $1 \times 10^6$  linfócitos de baço (**A**),  $1 \times 10^5$  linfócitos circulantes (**B**) e  $1 \times 10^6$  células tronco (**C**) foram incubados com meio RPMI 1640 na presença de 5  $\mu$ M MitoSOX Red. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle. Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de cinco experimentos independentes em duplicatas. Foi aplicado teste estatístico Student t test.

Infiltração de macrófagos nas ilhotas pancreáticas de NOD é um evento conhecido que antecipa a destruição das ilhotas (39, 43). Portanto, avaliamos a oxidação de H<sub>2</sub>DCF-DA em ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD não-diabéticos. Camundongos com 4 semanas de vida foram usados para obter ilhotas com mínima infiltração celular. A oxidação de H<sub>2</sub>DCF-DA foi 7 vezes maior em ilhotas isoladas de NOD comparado a ilhotas de camundongos Balb/c (**FIGURAS 11 A e 11 B**). Para avaliar se a oxidação exacerbada do marcador nas ilhotas de camundongos NOD estava relacionada com o conteúdo das mitocôndrias, medimos a atividade total de citrato sintase. Não foram observadas diferenças na atividade de citrato sintase em ilhotas de camundongos NOD não diabéticos e Balb/c (**FIGURA 11 C**), indicando número semelhante de mitocôndrias funcionais na ilhota de ambos os grupos nessa idade.



**FIGURA 11. Oxidação de H<sub>2</sub>DCF-DA foi aumentada em ilhotas isoladas de camundongos NOD não diabéticos (4 semanas de vida) sem alteração na atividade de citrato sintase, comparado com ilhotas isoladas de camundongos Balb/c na mesma idade.** 25 ilhotas foram incubadas em meio HBSS na presença de 1  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCF-DA. Representativo de três experimentos independentes em duplicata (**A**). Resultados expressos em porcentagem em relação ao controle (**B**). Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de três experimentos independentes em duplicatas com 25 ilhotas. Atividade de citrato sintase em ilhotas isoladas (**C**). Dados apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média de oito experimentos independentes em duplicatas com 25 ilhotas. \* $p \leq 0,05$  NOD vs. Balb/c (Student t test).

## 6. DISCUSSÃO

---

No presente trabalho analisamos a função mitocondrial nos principais órgãos metabólicos, como fígado, músculo esquelético e ilhotas pancreáticas e ainda nas principais células envolvidas em doenças autoimunes, os linfócitos, nas três fases de desenvolvimento de DM1A: antes, durante e após a destruição das células beta pancreáticas no modelo NOD comparados aos controles Balb/c da mesma idade.

O consumo de oxigênio e o número de mitocôndrias funcionais em biópsias de fígado no estado de não diabetes, pré-diabetes e diabetes, não apresentaram alterações significativas comparadas aos controles. Contudo, em biópsias de músculo de camundongos diabéticos houve uma diminuição no indicador de número de mitocôndrias funcionais (atividade da citrato sintase). Esses dados corroboram o trabalho de Bonnard e colaboradores (128) que sugerem que a hiperglicemia pode ser responsável pela diminuição da biogênese mitocondrial em músculo esquelético em modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina. Os autores sugerem que essa disfunção mitocondrial poderia ser corrigida através do controle da glicemia e/ou tratamento com antioxidantes. Herlein e colaboradores (129) também mostraram que não houve alteração da respiração mitocondrial em mitocôndrias de fígado de ratos diabéticos por estreptozotocina.

Uma maneira de se avaliar a funcionalidade e integridade das mitocôndrias é determinar sua suscetibilidade à transição de permeabilidade em situações fisiológicas e de estresse, às quais estão diretamente ligadas com suscetibilidade à morte celular. Verificamos que a susceptibilidade das mitocôndrias hepáticas a sofrerem transição de permeabilidade induzida por

cálcio foi, marcadamente aumentada, nas organelas obtidas de camundongos NOD, antes e durante o desenvolvimento do diabetes em comparação aos controles de mesma idade (Fig 5 e 6). Esta transição de permeabilidade foi avaliada através da medida do inchamento (aumentado nos NOD) e da capacidade de retenção de cálcio na organela (reduzida nos NOD). A presença do cálcio como agente indutor da TPM é altamente relevante, tanto do ponto de vista fisiológico (sinalização), como patológico (morte celular). Há uma interação física entre o retículo endoplasmático (RE), principal depósito intracelular de cálcio (250 - 600  $\mu\text{M}$ ), e as mitocôndrias. Essa interação é mediada por membranas denominadas como MAM (Mitochondria Associated Membranes), as quais podem ser isoladas em fracionamentos celulares e, são constituídas de proteínas que interagem com as membranas das 2 organelas propiciando a transferência direta de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE para a mitocôndria. Por exemplo, a proteína grp75 faz a conexão do receptor de IP3 do RE com o VDAC da mitocôndria (5). Assim, é evidente que a mitocôndria *in situ* pode estar exposta a altas concentrações de cálcio liberadas diretamente do RE, e independente da concentração citoplasmática de cálcio, em determinadas condições fisiológicas ou patológicas.

Como está bem estabelecido em trabalhos do nosso grupo (79) que TPM induzida por cálcio é consequência de estresse oxidativo, realizamos diversos experimentos em mitocôndrias isoladas e em células intactas para estimar geração de EROS e/ou danos oxidativos. Utilizamos diversas sondas fluorescentes disponíveis comercialmente: o Amplex red, o  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  e o MitoSOX. O Amplex Red usado em conjunto com *horseradish peroxidase*

(HRP) é um indicador sensível da produção de  $H_2O_2$  em fluídos biológicos. Apesar de críticas sobre o uso do  $H_2DCF$ -DA por sua inespecificidade, utilizamos este probe por ser um marcador para ampla variedade de EROs e especialmente de ERNs, como o peroxinitrito (121), de qualquer origem celular, não apenas mitocondrial. Além disso, a oxidação do  $H_2DCF$  pode ser indicativa de morte celular (122). O uso do probe MitoSOX nos informa especificamente a produção de ânion superóxido de origem mitocondrial em células intactas (126, 127).

Nossos resultados indicam que a geração mitocondrial de  $H_2O_2$  (Amplex-red) está aumentada em mitocôndrias de fígado de camundongos NOD não-diabéticos, mas não nos demais estágios da doença (Fig 9). Herlein e colaboradores (129) também não observaram alteração na produção de  $H_2O_2$  em mitocôndrias de fígado de animais diabéticos por estreptozotocina. O aumento de  $H_2O_2$  nas mitocôndrias de fígado dos NOD não diabéticos observados por nós, poderia ser explicado pela ativação de macrófagos e linfócitos nesta fase precoce da doença (39, 89, 91), o que leva a um quadro de inflamação generalizada, inclusive do tecido hepático, rico em células de Kupffer. Pode ser que o  $H_2O_2$  esteja presente apenas nos estágios iniciais da doença auto-imune, enquanto nos estágios mais avançados verifica-se a presença de produtos peroxidados, tais como lipoperóxidos, não detectados pelo Amplex red.

Observamos que a oxidação do probe  $H_2DCF$ -DA está aumentada em linfócitos intactos, tanto circulante quanto de baço, e em células troncos de camundongos NOD antes e durante o desenvolvimento do diabetes (Fig 10).

Essa oxidação de H<sub>2</sub>DCF-DA pode ter sido resultado tanto da ação direta de EROS e ERNS, como também refletir os danos causados por EROS, como por exemplo, o extravazamento de ferro e de citocromo c de mitocôndrias danificadas para o citosol (122). Portanto, o H<sub>2</sub>DCF pode indicar tanto a presença de EROS e ERNs como ser considerado um marcador de morte celular. Assim, estes resultados evidenciam danos oxidativos nas células de NOD tanto nos estágios precoces quanto nos mais avançados do desenvolvimento de diabetes, porém, não há dados na literatura sobre a oxidação de H<sub>2</sub>DCF em linfócitos de camundongos NOD ou animais diabéticos por estreptozotocina. Kim e colaboradores (130) isolaram linfócitos séricos e esplênicos de ratos Zucker que possuem síndrome metabólica e encontraram aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podendo estar de acordo com nossos resultados já que o H<sub>2</sub>DCF também detecta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Usando o MitoSOX, mostramos que a produção de superóxido especificamente de origem mitochondrial, não está alterada nos linfócitos e células tronco isolados de camundongos NOD ao longo do desenvolvimento do diabetes (Fig 9). Herlein e colaboradores (131) também mostraram que não há alteração na produção de superóxido pelas mitocôndrias isoladas de músculo, coração e fígado de ratos diabéticos por estreptozotocina. A interpretação dos autores atribuída a estes resultados é de que possam ocorrer respostas adaptativas ao estresse oxidativo, por exemplo, aumento de enzimas anti-oxidantes, tecido específicas, e pelo aumento da expressão ou eficiência de UCP-3, a qual leva a redução da geração mitocondrial de EROS. No entanto, é possível que o aumento de superóxido não seja detectado

simplesmente porque este radical já foi dismutado em  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou reagiu diretamente com substratos, por exemplo, NO, formando peroxinitrito, o qual é detectado pelo  $\text{H}_2\text{DCF}$ . Não encontramos outros dados da literatura sobre produção de superóxido em células linfocitárias de modelos de DM1A. No entanto, Kim e colaboradores (130) verificaram a produção de ânion superóxido em linfócitos séricos e esplênicos de ratos com síndrome metabólica e não encontraram aumento de superóxido nessas células.

As ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD não diabéticos (4 semanas de vida) apresentaram a oxidação de  $\text{H}_2\text{DCF}$  aumentada, enquanto o número de mitocôndrias funcionais (atividade de citrato sintase) não estava alterado (FIGURA 12). Nesta fase anterior ao estabelecimento da doença, há hipersecreção de insulina devido ao aumento do volume das células beta em resposta ao aumento de citocinas pró-inflamatórias nas ilhotas pancreáticas (46). Isso está de acordo com a presença de mitocôndrias funcionais. Além disso, sabe-se que a presença de citocinas e/ou o processo inflamatório causam estresse oxidativo, o que explica o aumento de EROS ou danos celulares observados nas ilhotas isoladas dos NOD não-diabéticos.

Assim, nosso trabalho mostrou que as células linfocitárias dos camundongos NOD oxidam mais  $\text{H}_2\text{DCF}$  e que suas mitocôndrias são mais suscetíveis à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial quando comparado aos camundongos Balb/c, não somente no estado de diabetes, mas também no estado não diabético e pré-diabético.

Esses eventos provavelmente ocorrem devido a diferentes fatores em cada fase da doença. No estágio inicial, a maior suscetibilidade à TPM nos

camundongos NOD não diabéticos, assim como o aumento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas mitocôndrias isoladas e na oxidação de  $\text{H}_2\text{DCF}$  pelas células linfocitárias, podem ser explicados pela ativação de macrófagos e linfócitos presentes no início do desencadeamento da doença autoimune, e consequente aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como  $\text{IL-1 } \beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IFN-}\gamma$  (39, 89, 91). Após a infiltração de linfócitos T em um tecido alvo, há ativação de macrófagos residentes e recrutamento de monócitos que se tornarão macrófagos. Os macrófagos ativados produzem citocinas pró-inflamatórias ( $\text{IL-1 } \beta$  e  $\text{TNF-}\alpha$ ) e EROs, principalmente via ativação da NADPH oxidase. As citocinas e EROs podem ativar a transcrição do NF- $\kappa\text{B}$  o qual pode induzir mais produção de citocinas pró-inflamatórias e mais EROs (NADPH oxidase), sustentando um ciclo vicioso da produção de EROs e contribuindo para a inflamação crônica (132).

Nos camundongos NOD pré-diabéticos, também observamos maior susceptibilidade à TPM e aumento da oxidação celular de  $\text{H}_2\text{DCF}$ . Esses resultados podem ser explicados pelo aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular nesta fase, o que foi observado por Liang e colaboradores (46). Estes autores descreveram que camundongos NOD com idades entre 10 e 14 semanas de vida (pré-diabéticos) possuem menor expressão da SERCA (proteína reguladora de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular dependente de ATP) em células beta pancreáticas quando comparadas às células de camundongos Balb/c. Em consequência disso, há aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, fazendo com que a secreção de insulina permaneça aumentada, favorecendo o controle da glicemia. Se este achado também ocorrer em outros tipos celulares, esse

aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pode predispor as mitocôndrias à TPM e aumentar a geração de EROS tanto de fonte mitocondrial como extra-mitocondrial.

Na fase em que os camundongos NOD são diabéticos, também observamos aumento de suscetibilidade à TPM e aumento da oxidação de  $\text{H}_2\text{DCF}$ , provavelmente em consequência de diferentes fatores. A disfunção mitocondrial nessa fase poderia ser causada pela formação dos AGEs (produtos finais de glicação avançada) devido a hiperglicemia. Esses AGEs são capazes de induzir respostas anormais in vivo, como aumento de expressão e secreção de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B, citocinas pró-inflamatórias, causando alterações da matriz extracelular, alteração das proteínas da cadeia respiratória mitocondrial, danos no DNA mitocondrial e apoptose de diferentes tipos celulares (36, 37, 133). AGEs também podem aumentar a expressão e atividade da NADPH oxidase e depletar o sistema antioxidante contribuindo para a formação de radicais livres (133). Foi verificado que há aumento de AGEs em soro de pacientes portadores de DM1A (38) assim como há aumento das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 e aumento das proteínas JAK e STAT, modificando a sinalização celular associada à migração e proliferação celular (133). Sabe-se que os AGEs presentes na dieta podem antecipar o aparecimento do diabetes em camundongos NOD, assim como em camundongos db/db (modelo experimental de resistência à insulina), e em camundongos deficientes em apolipoproteína-E (modelo de aterosclerose), devido ao processo inflamatório desencadeado por eles (37).

Portanto, nós verificamos que há estresse oxidativo e transição de permeabilidade mitocondrial nas três fases de desenvolvimento do diabetes auto-imune e que esses eventos podem ser por diferentes motivos, podendo não ser a mitocôndria a causa direta do desenvolvimento.

## 7. CONCLUSÃO

---

Podemos concluir com nossos resultados que o estresse oxidativo celular e a transição de permeabilidade mitocondrial precedem o aparecimento do diabetes tipo 1A, e portanto, podem desempenhar um papel importante na patogênese desta doença. Observamos que:

- Não houve alteração na respiração mitocondrial em biópsias de fígado e músculo esquelético e em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos NOD comparados aos camundongos Balb/c nas três fases da doença. No entanto, existe um prejuízo na quantidade de mitocôndrias funcionais nos músculos dos camundongos NOD.
- Mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos NOD possuem maior susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  nas três fases do desenvolvimento do diabetes
- Camundongos NOD não diabéticos apresentaram maior produção de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias isoladas de fígado quando comparadas às mitocôndrias de camundongos Balb/c na mesma idade.
- Houve maior oxidação de  $\text{H}_2\text{DCF}$  nos linfócitos esplênicos e séricos e células tronco hematopoiéticas isoladas de camundongos NOD nas três fases do diabetes quando comparadas às células de camundongos Balb/c nas mesmas idades.

- Houve maior oxidação de  $H_2DCF$  nas ilhotas pancreáticas isoladas de camundongos NOD não diabéticos, ou seja, com 4 semanas de vida, comparada a oxidação nas ilhotas isoladas de Balb/c na mesma idade.

## 8. REFERÊNCIAS

---

1. Gurzov EN, Ortis F, Cunha DA, Gosset G, Li M, Cardozo AK, et al. Signaling by IL-1 $\beta$ +IFN- $\gamma$  and ER stress converge on DP5/Hrk activation: a novel mechanism for pancreatic beta-cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 2009 Nov;16(11):1539-50.
2. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation research.* 2007 Mar 2;100(4):460-73.
3. Paim BA. Estresse oxidativo em camundongos knockout para o receptor de LDL : papel dos substratos redutores de NADP<sup>+</sup> mitocondrial e dos níveis de 'Ca POT.2+' intracelular [Tese de Doutorado]. Campinas (SP). Universidade Estadual de Campinas. . 2008.
4. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS letters.* 2001 Apr 20;495(1-2):12-5.
5. Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, et al. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal.*9:19. 2011.
6. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998 Jul;15(7):539-53.
7. Mayer-Davis EJ, Bell RA, Dabelea D, D'Agostino R, Jr., Imperatore G, Lawrence JM, et al. The many faces of diabetes in American youth: type 1 and type 2 diabetes in five race and ethnic populations: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care.* 2009 Mar;32 Suppl 2:S99-101.
8. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA.* 2003 Oct 1;290(13):1713-20.
9. Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia.* 1999 Dec;42(12):1395-403.
10. Padaiga Z, Tuomilehto J, Karvonen M, Dahlquist G, Podar T, Adojaan B, et al. Seasonal variation in the incidence of Type 1 diabetes mellitus during 1983 to 1992 in the countries around the Baltic Sea. *Diabet Med.* 1999 Sep;16(9):736-43.

11. Pitkaniemi J, Onkamo P, Tuomilehto J, Arjas E. Increasing incidence of Type 1 diabetes--role for genes? *BMC Genet.* 2004 Apr 2;5:5.
12. Rayfield EJ, Seto Y. Viruses and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes.* 1978 Nov;27(11):1126-40.
13. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA.* 2003 Oct 1;290(13):1721-8.
14. Hypponen E, Virtanen SM, Kenward MG, Knip M, Akerblom HK. Obesity, increased linear growth, and risk of type 1 diabetes in children. *Diabetes Care.* 2000 Dec;23(12):1755-60.
15. Vehik K, Dabelea D. The changing epidemiology of type 1 diabetes: why is it going through the roof? *Diabetes Metab Res Rev.* Jan;27(1):3-13. 2011.
16. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1986 May 22;314(21):1360-8.
17. Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes.* 1993 Feb;42(2):359-62.
18. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2006 Mar 11;367(9513):847-58.
19. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol.* 2009 Apr;5(4):219-26.
20. Gurzov EN, Eizirik DL. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of beta-cell death and dysfunction. *Trends Cell Biol.* Jul;21(7):424-31. 2011.
21. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia.* 2001 Dec;44(12):2115-33.
22. Acharya JD, Ghaskadbi SS. Islets and their antioxidant defense. *Islets.* Jul-Aug;2(4):225-35. 2011.
23. Yamada K, Inada C, Otabe S, Takane N, Hayashi H, Nonaka K. Effects of free radical scavengers on cytokine actions on islet cells. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1993 Apr;128(4):379-84.

24. Corbett JA, Wang JL, Hughes JH, Wolf BA, Sweetland MA, Lancaster JR, Jr., et al. Nitric oxide and cyclic GMP formation induced by interleukin 1 beta in islets of Langerhans. Evidence for an effector role of nitric oxide in islet dysfunction. *Biochem J.* 1992 Oct 1;287 ( Pt 1):229-35.
25. Delaney CA, Tyrberg B, Bouwens L, Vaghef H, Hellman B, Eizirik DL. Sensitivity of human pancreatic islets to peroxynitrite-induced cell dysfunction and death. *FEBS Lett.* 1996 Oct 7;394(3):300-6.
26. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, et al. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005 Nov;54(11):3103-11.
27. Murphy MP, Smith RA. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:629-56.
28. Papa S. Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Sep 12;1276(2):87-105.
29. Carlsson C, Borg LA, Welsh N. Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology.* 1999 Aug;140(8):3422-8.
30. Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free radical biology & medicine.* 2003 Dec 1;35(11):1491-9.
31. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000 Apr 13;404(6779):787-90.
32. Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J.* 1981 Nov 1;199(2):393-8.
33. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(3):463-6.
34. Friederich M, Hansell P, Palm F. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. *Current diabetes reviews.* 2009 May;5(2):120-44.

35. Yoon Y, Galloway CA, Jhun BS, Yu T. Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid Redox Signal*. Feb 1;14(3):439-57. 2011.
36. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*. Oct 29;107(9):1058-70. 2011.
37. Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep*. Aug;11(4):244-52. 2011.
38. He CJ, Koschinsky T, Buening C, Vlassara H. Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE. *Mol Med*. 2001 Mar;7(3):159-68.
39. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:447-85.
40. Babad J, Geliebter A, DiLorenzo TP. T-cell autoantigens in the non-obese diabetic mouse model of autoimmune diabetes. *Immunology*. Dec;131(4):459-65.2011.
41. Driver JP, Serreze DV, Chen YG. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopathol*. Jan;33(1):67-87. 2011.
42. Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol*. 1992;51:285-322.
43. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu*. 1980 Jan;29(1):1-13.
44. <http://jaxmicejaxorg/strain/001976html> [Acessado em 10/02/2012]
45. Pavin EJ, Zollner RL. Implantação da linhagem "NOD-mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. *Arq Bras Endo Metabol* 1994;38:105-8.
46. Liang K, Du W, Zhu W, Liu S, Cui Y, Sun H, et al. Contribution of Different Mechanisms to Pancreatic Beta-cell Hyper-secretion in Non-obese Diabetic (NOD) Mice during Pre-diabetes. *The Journal of biological chemistry*. Nov 11;286(45):39537-45. 2011.

47. Wu G, Lu ZH, Gabius HJ, Ledeen RW, Bleich D. Ganglioside GM1 deficiency in effector T cells from NOD mice induces resistance to regulatory T-cell suppression. *Diabetes*. Sep;60(9):2341-9. 2011.
48. Fujishima Y, Koide Y, Kaidoh T, Nishimura M, Yoshida TO. Restriction fragment length polymorphism analysis of major histocompatibility complex genes in the non-obese diabetic mouse strain and its non-diabetic sister strains. *Diabetologia*. 1989 Feb;32(2):118-25.
49. Many MC, Drexhage HA, Deneef JF. High frequency of thymic ectopy in thyroids from autoimmune prone nonobese diabetic female mice. *Lab Invest*. 1993 Sep;69(3):364-7.
50. Park SA, Jeong SM, Yi NY, Kim MS, Jeong MB, Suh JG, et al. Study on the ophthalmic diseases in ICR mice and BALB/c mice. *Exp Anim*. 2006 Apr;55(2):83-90.
51. Hayashi K, Kojima R, Ito M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol Pharm Bull*. 2006 Jun;29(6):1110-9.
52. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev*. 1994 Aug;15(4):516-42.
53. Bowman MA, Leiter EH, Atkinson MA. Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. *Immunol Today*. 1994 Mar;15(3):115-20.
54. Singh B, Rabinovitch A. Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes. *Autoimmunity*. 1993;15(3):209-13.
55. Alam C, Bittoun E, Bhagwat D, Valkonen S, Saari A, Jaakkola U, et al. Effects of a germ-free environment on gut immune regulation and diabetes progression in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetologia*. Jun;54(6):1398-406. 2011.
56. King C, Sarvetnick N. The incidence of type-1 diabetes in NOD mice is modulated by restricted flora not germ-free conditions. *PLoS One*. 6(2):e17049. 2011.
57. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Vannucci L, Tuckova L, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol*. Mar;8(2):110-20. 2011.

58. Nicholls D, Ferguson S. Bioenergetics 3. Academic Press Inc London, UK. 2002.
59. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961 Jul 8;191:144-8.
60. Sutton HC, Winterbourn CC. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radic Biol Med*. 1989;6(1):53-60.
61. Watabe S, Hiroi T, Yamamoto Y, Fujioka Y, Hasegawa H, Yago N, et al. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur J Biochem*. 1997 Oct 1;249(1):52-60.
62. Netto LE, Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymol*. 2002;348:260-70.
63. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford Univ. Press. Oxford, U.K. 1989:188-277.
64. Fagian MM, Pereira-da-Silva L, Martins IS, Vercesi AE. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by  $\text{Ca}^{2+}$  plus prooxidants. *J Biol Chem*. 1990 Nov 15;265(32):19955-60.
65. Valle VG, Fagian MM, Parentoni LS, Meinicke AR, Vercesi AE. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Nov 15;307(1):1-7.
66. Castilho RF, Kowaltowski AJ, Meinicke AR, Bechara EJ, Vercesi AE. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by  $\text{Ca}^{2+}$  ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 1995 Mar;18(3):479-86.
67. Castilho RF, Kowaltowski AJ, Vercesi AE. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by  $\text{Ca}^{2+}$  plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. *J Bioenerg Biomembr*. 1996 Dec;28(6):523-9.
68. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Grijalba MT, Bechara EJ, Vercesi AE. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by  $\text{Ca}^{2+}$  ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1996 Feb 9;271(6):2929-34.

69. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 1996 Jan 8;378(2):150-2.
70. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 1997 Aug 15;272(33):20313-6.
71. Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 1995 Jul 17;1241(2):139-76.
72. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep.* 1997 Feb;17(1):43-52.
73. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J.* 1988 Oct 1;255(1):357-60.
74. Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1989 May 15;264(14):7826-30.
75. Connern CP, Halestrap AP. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochem J.* 1994 Sep 1;302 ( Pt 2):321-4.
76. Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem.* 1996 Jan 26;271(4):2185-92.
77. Ramachandran A, Lebofsky M, Baines CP, Lemasters JJ, Jaeschke H. Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury. *Free Radic Res.* Feb;45(2):156-64. 2011.
78. Hunter DR, Haworth RA. The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* 1979 Jul;195(2):453-9.
79. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):333-43.

80. Kowaltowski AJ, Castilho RF.  $\text{Ca}^{2+}$  acting at the external side of the inner mitochondrial membrane can stimulate mitochondrial permeability transition induced by phenylarsine oxide. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Dec 15;1322(2-3):221-9.
81. Lehninger A, Vercesi AE, Bababumni EA. Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc Nat Acad Sci*. 1978;75:1690-4.
82. Klingenberg M. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1989 Apr;270(1):1-14.
83. Vercesi AE. Dissociation of  $\text{NAD(P)}^{+}$ -stimulated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from swelling and membrane damage. *Arch Biochem Biophys*. 1984 Jul;232(1):86-91.
84. Novgorodov SA, Gudz TI, Brierley GP, Pfeiffer DR. Magnesium ion modulates the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore to cyclosporin A and ADP. *Arch Biochem Biophys*. 1994 Jun;311(2):219-28.
85. Wiederkehr A, Szanda G, Akhmedov D, Matakı C, Heizmann CW, Schoonjans K, et al. Mitochondrial matrix calcium is an activating signal for hormone secretion. *Cell metabolism*. May 4;13(5):601-11. 2011.
86. Davidson SM, Duchen MR. Imaging mitochondrial calcium signalling with fluorescent probes and single or two photon confocal microscopy. *Methods Mol Biol*. 810:219-34. 2011.
87. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*. 2001 Oct;92(1):57-70.
88. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Lakey JR, Rajotte RV. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Sep;81(9):3197-202.
89. Delmastro MM, Piganelli JD. Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol*. 2011:593863.
90. Augstein P, Elefanty AG, Allison J, Harrison LC. Apoptosis and beta-cell destruction in pancreatic islets of NOD mice with spontaneous and cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Diabetologia*. 1998 Nov;41(11):1381-8.

91. Barthson J, Germano CM, Moore F, Maida A, Drucker DJ, Marchetti P, et al. Cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma induce pancreatic beta-cell apoptosis through STAT1-mediated Bim protein activation. *The Journal of biological chemistry*. Nov 11;286(45):39632-43. 2011.
92. Cardozo AK, Kruhoffer M, Leeman R, Orntoft T, Eizirik DL. Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes*. 2001 May;50(5):909-20.
93. Thomas HE, McKenzie MD, Angstetra E, Campbell PD, Kay TW. Beta cell apoptosis in diabetes. *Apoptosis*. 2009 Dec;14(12):1389-404.
94. Vercesi AE, Castilho RF, Kowaltowski AJ, Oliveira HC. Mitochondrial energy metabolism and redox state in dyslipidemias. *IUBMB Life*. 2007 Apr-May;59(4-5):263-8.
95. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1999 Feb;26(3-4):463-71.
96. Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS letters*. 1998 Feb 27;423(3):275-80.
97. Oliveira HC, Cosso RG, Alberici LC, Maciel EN, Salerno AG, Dorigheo GG, et al. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. *FASEB J*. 2005 Feb;19(2):278-80.
98. Alberici LC, Oliveira HC, Bighetti EJ, de Faria EC, Degaspari GR, Souza CT, et al. Hypertriglyceridemia increases mitochondrial resting respiration and susceptibility to permeability transition. *J Bioenerg Biomembr*. 2003 Oct;35(5):451-7.
99. Alberici LC, Oliveira HC, Paim BA, Mantello CC, Augusto AC, Zecchin KG, et al. Mitochondrial ATP-sensitive K(+) channels as redox signals to liver mitochondria in response to hypertriglyceridemia. *Free radical biology & medicine*. 2009 Nov 15;47(10):1432-9.
100. Paim BA, Velho JA, Castilho RF, Oliveira HC, Vercesi AE. Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. *Free Radic Biol Med*. 2008 Feb 1;44(3):444-51.
101. Figueira TR, Castilho RF, Saito A, Oliveira HC, Vercesi AE. The higher susceptibility of congenital analbuminemic rats to Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial

permeability transition is associated with the increased expression of cyclophilin D and nitrosothiol depletion. *Mol Genet Metab.* Dec;104(4):521-8. 2011.

102. Ventura-Oliveira D, Vilella CA, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner RL. Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Nov;35(11):1347-55.

103. Vilella CA. Estudo dos efeitos imuno moduladores de gangliosídeos na inflamação/expressão de diabetes autoimune em camundongos NOD-Uni. [Tese de Doutorado]. Campinas (SP). Universidade Estadual de Campinas. . 2005.

104. Itoh N, Imagawa A, Hanafusa T, Waguri M, Yamamoto K, Iwahashi H, et al. Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 1997 Aug 18;186(4):613-8.

105. Jun HS, Yoon CS, Zbytnuik L, van Rooijen N, Yoon JW. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 1999 Jan 18;189(2):347-58.

106. Hogeboom GH, Schneider WC. Proteins of liver and hepatoma mitochondria. *Science.* 1951 Mar 30;113(2935):355-8.

107. Moskalewski S. Isolation And Culture Of The Islets Of Langerhans Of The Guinea Pig. *Gen Comp Endocrinol.* 1965 Jun;44:342-53.

108. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.* 1967 Jan;16(1):35-9.

109. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* 1949 Feb;177(2):751-66.

110. Kaplan RS, Pedersen PL. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. *Biochem J.* 1983 May 15;212(2):279-88.

111. Robinson J, Cooper JM. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem.* 1970 Feb;33(2):390-9.

112. Nicholls D, Akerman K. Mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta.* 1982 Sep 1;683(1):57-88.

113. Vercesi AE, Ferraz VL, Macedo DV, Fiskum G. Ca<sup>2+</sup>-dependent NAD(P)<sup>+</sup>-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Aug 15;154(3):934-41.

114. Murphy AN, Bredesen DE, Cortopassi G, Wang E, Fiskum G. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Sep 3;93(18):9893-8.
115. Ferranti R, da Silva MM, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening decreases reactive oxygen species generation. *FEBS Lett*. 2003 Feb 11;536(1-3):51-5.
116. Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem*. 1997 Nov 15;253(2):162-8.
117. Ali SF, LeBel CP, Bondy SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1992 Fall;13(3):637-48.
118. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Apr 25;272(17):11369-77.
119. Payne CM, Weber C, Crowley-Skillicorn C, Dvorak K, Bernstein H, Bernstein C, et al. Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells. *Carcinogenesis*. 2007 Jan;28(1):215-22.
120. Shepherd D, Garland PB. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J*. 1969 Sep;114(3):597-610.
121. Kumar S, Patel S, Jyoti A, Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, et al. Nitric oxide-mediated augmentation of neutrophil reactive oxygen and nitrogen species formation: Critical use of probes. *Cytometry A*. Nov;77(11):1038-48. 2011.
122. Karlsson M, Kurz T, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson CI. What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem J*. Jun 1;428(2):183-90. 2011.
123. Degasperi GR, Denis RG, Morari J, Solon C, Geloneze B, Stabe C, et al. Reactive oxygen species production is increased in the peripheral blood monocytes of obese patients. *Metabolism*. 2009 Aug;58(8):1087-95.

124. Papaccio G, De Luca B, Pisanti FA. Macrophages and antioxidant status in the NOD mouse pancreas. *Journal of cellular biochemistry*. 1998 Dec 15;71(4):479-90.
125. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003 Nov 15;102(10):3483-93.
126. Robinson KM, Janes MS, Beckman JS. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat Protoc*. 2008;3(6):941-7.
127. Zielonka J, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nat Protoc*. 2008;3(1):8-21.
128. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin MA, Morio B, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008 Feb;118(2):789-800.
129. Herlein JA, Fink BD, Sivitz WI. Superoxide production by mitochondria of insulin-sensitive tissues: mechanistic differences and effect of early diabetes. *Metabolism*. Feb;59(2):247-57. 2011.
130. Kim CH, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Integrin expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in circulating and splenic leukocytes of obese rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Sep;15(9):2209-16.
131. Herlein JA, Fink BD, O'Malley Y, Sivitz WI. Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats. *Endocrinology*. 2009 Jan;150(1):46-55.
132. Gauss KA, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, Gao Y, DeLeo FR, Quinn MT. Role of NF-kappaB in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol*. 2007 Sep;82(3):729-41.
133. Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)*. Jul;121(2):43-55. 2011.