UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FERNANDA MENEZES CERQUEIRA

Efeitos da restrição calórica nas vias de sinalização por insulina e óxido nítrico: Implicações para biogênese, morfologia e função mitocondriais

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 20/12/2011

FERNANDA MENEZES CERQUEIRA

Efeitos da restrição calórica nas vias de sinalização por insulina e óxido nítrico: Implicações para biogênese, morfologia e função mitocondriais

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Alicia Juliana Kowaltowski

São Paulo

Fernanda Menezes Cerqueira

Efeitos da restrição calórica nas vias de sinalização por insulina e óxido nítrico: Implicações para biogênese, morfologia e função mitocondriais.

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovada em:
Banca examinadora
Prof(a). Dr (a)
înstituição:
Assinatura:
Prof(a). Dr (a)
înstituição:
Assinatura:
Prof(a). Dr (a)
instituição:
Assinatura:
Prof(a). Dr (a)
instituição:
Assinatura:
Prof(a). Dr (a)
nstituição:
Assinatura:
Prof(a). Dr (a)
instituição:
Assinatura:

Ficha catalográfica

Às minhas irmãs, Elvira Menezes Cerqueira e Livia Menezes Cerqueira, pela confiança, cumplicidade e amor, sempre.

Agradecimentos

À FAPESP pela bolsa de doutorado concedida (07/53455-4). À CAPES, programa PDEE, pela bolsa de doutorado sanduíche (431010-1). Às agências financiadoras do laboratório: CNPq (INCT e NAP Redoxoma); Guggenheim e FAPESP.

À Profa Alicia J. Kowaltowski, pela orientação ímpar, que envolveu vários ensinamentos científicos e não-científicos, muita paciência, apoio e estímulos profissionais e pessoais. Também, pela amizade, a qual prezo e sou muito grata.

Ao Prof. Orian Shirihai, pela orientação divertida durante o doutorado sanduíche, por todo o suporte necessário para o desenvolvimento de meu projeto e minha estadia nos USA. Também agradeço às suas idéias geniais, à sua cordialidade única e à sua preocupação com o bem-estar de todos.

Aos Profs. Francisco Laurindo, Marisa Medeiros e Pio Colepicolo pela colaboração neste trabalho, por terem permitido o uso de seus laboratórios e por todas as idéias e auxílios para que o trabalho ficasse o melhor possível.

À Profa. Ohara Augusto, minha orientadora do mestrado, por ter despertado meu interesse pela ciência, e por ser o exemplo máximo de cientista e profissional.

À Prof. Nadja Souza-Pinto, pelas idéias e críticas, sempre muito valiosas.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, Cibele, Emiliano, Milton e Marcelo, pelo excelente trabalho.

Agradeço ao Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelo extremo cuidado com os animais, pelo treinamento adequado e ambiente propício para a realização do projeto.

Aos meus amigos de laboratório, que foram minha família nos últimos anos:

Ariel Cardoso, o gênio da ironia, entre outras genialidades. Até nossas brigas foram engraçadas.

Bruno Chaussê, o porcariazinha arretado, que tem um coração gigante e uma mente traquina muito sabida;

Bruno Queliconi, por todo apoio com as culturas primárias e experimentos no geral, pelas longas conversas e dicas sobre restaurantes;

Camille Caldeira, por todos os conselhos nos mais diversos assuntos, paciência, ajuda, gargalhadas (né Ciana?), dicas de lojas e muito, muito mais (e ainda tem a Malu de bônus);

Erich Tahara, pela disposição em ouvir e aconselhar sempre que preciso; Edson Santos, por todo o apoio com as culturas primárias, pela cantoria sempre agradável e alegria e disposição diárias;

Fabiana Dutra, por ser tão gentil, amiga e humilde (apesar de toda a inteligência) e por ter me dado a oportunidade de conhecer sua família maravilhosa;

Felipe Navarete, um exemplo de como um *hard-worker* pode ser divertido e alegre (ô loco, meu!);

Fernanda Cunha, fêssora-pós-doc; super *partner*, querida, inteligente e elegante. Obrigada pelo carinho e por todas as lições Fefe;

Graciele de Oliveira, pelo bom humor, por sempre ter uma palavra positiva, e por ser aquela figura diplomática e otimista, sempre necessária.

Agradeço aos meus amigos não-laboratoriais, fundamentais para minha sanidade mental (ou pela ausência desta quando necessário):

Daniela Soltys, que no início era só minha irmã-música, mas agora é irmã pra tudo mesmo! Obrigada querida, pela amizade e carinho, pelas opiniões sempre ponderadas e equilibradas, além das observações genuinamente perspicazes. E obrigada também por ter me adotado nos natais, anos-novos, páscoas, alta-hospitalar e afins. Sobrou até para a sua família e pro Gabriel Moura Silva, a quem agradeço muito também!

Liliana Massis que, apesar do improvável, tornou-se uma grande amiga, daquelas que a gente grita por socorro ou para contar em primeira mão uma boa notícia! Obrigada por todo o incentivo, e pela sinceridade ímpar.

Leonora Vassao, pelos momentos balada, gargalhada, chororô, enfim, por ser um ombro amigo para todas as horas.

Clarisse Jeker Marchi, a salaminha querida, pelos momentos memoráveis de descontração na dança ou na tua casa, que sempre – sempre – terminam com você preparando alguma coisa para a gente comer às tantas da manhã.

Priscilla Vassão Aliberti, que apesar de ficar mais na dela, é sempre disponível quando a gente mais precisa e foi de grande apoio num momento bem peculiar e difícil. Obrigada.

Érica Melo que, apesar da distância, é uma amiga para sempre. Muito do que sou hoje devo à nossa amizade.

Heloísa Melo, pela acolhida em São Paulo quando cheguei e sempre que necessário. Pelas conversas infinitas sobre todos — todos — os assuntos possíveis, pela confiança e carinho.

Lucas Offenbecker Guerra, meu "pápis" forever. Sinto muitas saudades de você.

Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes (vulgo Pedroca), pelo carinho, pelos momentos de muita alegria, por ter me introduzido à Vipassana e por ter me permitido conhecer seus pais, as pessoas mais fantásticas do mundo.

Beatriz Burin, uma grande amiga, por todas as trocas, de energia, questionamentos, respostas, diferenças e mais.

Alexandre Sigolo, pela cerveja maravilhosa, por todas as conversas científico-filosóficas, pelas noites de poker e por ser casado com a Zanith Cook, a quem também agradeço por ser esta figura zen única que me recebeu tão bem na casa (e na vida) de vocês.

Lívea Fujita, minha amiga bailarina, pelo incentivo e exemplo de como é sempre possível mudar o curso da vida em busca da felicidade.

Camila Carrião, pela colaboração científica, amizade e por todos os momentos impagáveis de diversão mundo a fora.

Juliana Luz, Jaqueline Salotti, Renata Ogusucu, Cláudica Brochini e Gisele Cerchiaro, amigas queridas do IQ desde o mestrado que, embora distantes, são sempre lembradas com muito carinho.

Helder Nakaya, Lucas Blanes, Paulo Zaini e Antero Macedo, amigos bonitões, inteligentes e divertidos que tornaram minha vida no IQ e em SP muuuiiitooo mais legal.

A todos os outros PDBs e Lesonários que são lembrados com muito carinho. "Qual a parte de passamos os melhores momentos das nossas vidas juntos vocês não entenderam?????"

Aos amigos do Sambozo, que trouxeram alegria, samba e jovialidade a tantas gerações de biólogos e aos amantes da Bio.

E, por último, porém o mais importante, a imensurável gratidão aos meus pais, Manoel Cerqueira e Regina Menezes, por todo o apoio, amor e educação. Eu tenho certeza que vocês fizeram o máximo que puderam, e o máximo de vocês foi o melhor que poderia ter acontecido na minha vida.

Acknowledgements

Prof. Alicia Kowaltowski, for being my mentor at Universidade de São Paulo. You introduced me to the fabulous mitochondrial world. Without her encouragement over the years, all of this would not have been possible.

Prof. Orian Shirihai for being my mentor during the last year of my PhD at Boston University. You taught me many different things about mitochondria, microscopy, brown adipocytes and life. I admire how friendly and supportive you are for all your fellows.

Abigail Newby-Kew, for being such a good friend, who I enjoy being with to do many different things, from beer to yoga.

Andrew Ferree, the nicest person in the world. Thank you for the great ideas and suggestions in my letters and projects. I am looking forward to strengthening our collaboration in the next year.

Dr. Anthony Molina, for the microscopy lessons and the scientific discussions.

Dr. Guy Las, for the new perspective you always bring to any subject, with your intelligence to see what nobody else sees. Thank you also for the opportunity you gave me to get close to your family, whom I completely love, especially the wonderful Tal.

Dr. Joan Monteiro, my handsome roommate, for all the help in finding a job and for the amazing life in Brookline. Oh, I miss you.

Prof. Jude Denney, for all the advices and lessons about islets and INS1 cells.

Kiana Mahdaviani, the best friend someone can wish for. Thank you, my Iranian sister, for your support, life lessons, but most of all, your friendship.

Kyle Trudeau, the most serious person in the lab, who has always been a good example of how focus greatly improves productivity.

Dr. Lakshmi Kannan, for all the amazing sharing we did when we lived together and for the friendship that will last forever. I miss you, especially your amazing food.

Dr. Linsey Stiles, for being that great and beautiful friend, who helped me so much in science, projects, dramas and for sharing ice-cream with me many times.

Dr. Marc Liesa, for the critical scientific discussions, for knowing everything about mitochondria, and for the patience regarding all the questions everybody asks.

Samuel Sereda, our awesome Sam, for being so awesome, fun, hilarious. Also, thank you for all the good scientific advice and friendship.

Dr. Vered Levy, for teaching me the firsts steps in microscopy and the tricky Seahorse.

Wei Qui, the funniest person in the lab. You bring a smile to everybody's face.

Finally, Jaime Stern, for all the love, patience, support, humor, and patience again – and I know you are not patient, for that reason I thank you twice.

Poema a la clase medía - Marío Benedettí

Clase medía medío rica medío culta entre lo que cree ser y lo que es medía una distancia medío grande.

> Desde el medío míra medío mal a los negrítos, a los rícos, a los sabíos, a los locos, a los pobres.

> > Sí escucha a un Hítler medío le gusta, y sí habla un Che medío tambíén.

En el medío de la nada medío duda como todo le atrae (a medías) analíza hasta la mítad todos los hechos y (medío confundída) sale a la calle con medía cacerola entonces medío llega a ímportar a los que mandan (medío en las sombras).

A veces, solo a veces, se da cuenta (medío tarde) que la usaron de peón en un ajedrez que no comprende y que nunca la convierte en Reína.

> Así, medio rabiosa se lamenta (a medias) de ser el medio del que comen otros a quienes no alcanza a entender ní medio.

Resumo

Cerqueira, F.M. Efeitos da restrição calórica nas vias de sinalização por insulina e óxido nítrico: Implicações para biogênese, morfologia e função mitocondriais. 2011. 102 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A restrição calórica (RC) estende a expectativa de vida de muitos organismos por mecanismos ainda em estudo. Entre os vários efeitos fisiológicos da RC encontra-se o aumento na biogênese mitocondrial, dependente de óxido nítrico (NO°), sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Um dos indutores fisiológicos mais potentes da eNOS é a insulina, cujos níveis plasmáticos são consideravelmente reduzidos nos organismos em RC. O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos associados ao aumento da sinalização por NO^o durante a RC *in vivo* e *in vitro*, e as conseqüências celulares do aumento de massa mitocondrial no que diz respeito à longevidade e capacidade respiratória celulares. Submetemos camundongos Swiss fêmeas à RC de 40% e observamos um considerável aumento tecido-específico na fosforilação basal de Akt e eNOS em músculo esquelético, tecido adiposo visceral e cérebro, os quais também apresentaram maior massa mitocondrial. A associação entre a sinalização por insulina, NOº e biogênese mitocondrial foi adicionalmente confirmada em um grupo de camundongos tratados com o desacoplador mitocondrial dinitrofenol (DNP), que também reduz a insulinemia e aumenta a longevidade em camundongos. Para o estudo mecanístico deste fenômeno, usamos soros de ratos Sprague-Dawley submetidos à RC de 40% ou alimentados *ad libitum* (AL) em cultura celular de células vasculares da musculatura lisa (VSMC), reproduzindo um protocolo descrito para RC in vitro. O uso do soro RC aumentou a fosforilação do receptor de insulina e Akt, a expressão de eNOS e nNOS (forma neural da NOS) e a fosforilação de eNOS, o que se refletiu em maior liberação de nitrito (NO₂) no meio de cultura. Inibindose a Akt, todos os efeitos promovidos pela RC na sinalização por NOº foram revertidos. Ao se imunoprecipitar do soro a adiponectina, citocina conhecida por aumentar a sensibilidade à insulina, aumentada durante a RC, os efeitos do soro RC na via de sinalização de insulina foram abolidos e, consequentemente, os efeitos na sinalização por 'NO foram prevenidos. Neurônios de células granulosas de cerebelo, que não expressam eNOS, apenas nNOS, foram cultivados com os soros AL ou RC, e também apresentaram considerável aumento na sinalização por 'NO. Estas alterações induziram a biogênese mitocondrial e capacidade respiratória, e foram associadas à maior longevidade celular. Os mesmos efeitos mitocondriais foram observados em células secretoras de insulina, INS1, entretanto a secreção de insulina em resposta à glicose tornou-se inibida, por um mecanismo desconhecido, porém associado a

reduzidos níveis intracelulares de espécies oxidantes, moléculas-chave para a secreção de insulina; e à alteração da morfologia mitocondrial, provavelmente devido à maior expressão de mitofusina-2 (Mfn-2). Ao se nocautear a Mfn-2, houve um aumento na geração de EROs e as células em RC passaram a secretar insulina a níveis comparáveis aos das células controle. Concluímos que durante a RC a maior sensibilidade à insulina aumenta a atividade de eNOS, via Akt, associada à maior biogênese mitocondrial. A adiponectina é uma moléculacentral nestes eventos. A expressão de nNOS também é afetada, por mecanismos desconhecidos. O aumento de biogênese mitocondrial eleva a capacidade respiratória celular e impacta positivamente a longevidade *in vitro*. A alteração da morfologia mitocondrial associa-se a alterações na produção de oxidantes intracelulares e mudanças na secreção de insulina.

Palavras-chave: adiponectina, biogênese mitocondrial, mitofusina, óxido nítrico, restrição calórica, sinalização por insulina.

Abstract

Cerqueira, F.M. Calorie restriction effects on insulin and nitric oxide signaling: Implications to mitochondrial biogenesis, morphology and function. 2011. 102 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Calorie restriction (RC) is known to extend the lifespan in many organisms, and its mechanisms of action are still under investigation. Enhanced mitochondrial biogenesis driven by nitric oxide (*NO), synthesized by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS), is proposed to be a CR central effect. Insulin is one of the most potent physiological activators of eNOS. However, plasmatic insulin levels are dramatically reduced in organisms under CR. The goal of this work was uncover the mechanisms associated with enhanced 'NO signaling during CR, in vivo and in vitro, as well as the cellular consequences of increased mitochondrial mass, regarding lifespan and reserve respiratory capability. Female Swiss mice were submitted to 40% of CR. A tissue-specific (skeletal muscle, abdominal adipose tissue and brain) increment in basal Akt and eNOS phosphorylation, which was related to enhanced mitochondrial biogenesis, was observed. Indeed, this association was also verified in tissues from mice treated with low doses of a mitochondrial uncoupler, dinitrophenol (DNP). To unveil the mechanism behind the insulin signaling effects on 'NO levels, serum from Sprague-Dawley rats submmitted to 40% of CR was used to culture in VSMC cells, an in vitro CR protocol. CR sera enhanced insulin receptor (IR) and Akt phosphorylation, as well as nitrite (NO₂) accumulation in the culture media, the expression of eNOS and nNOS (neural NOS isoform) and eNOS phosphorylation. by Akt inhibition. of CR sera were reversed immunoprecipitation of serum adiponectin, a cytokine known to improve peripheral insulin sensitivity, also reversed the CR serum effects on insulin and NO signaling. Cerebellar neurons, which do not express eNOS, just nNOS, were also cultured with CR or AL serum and also presented striking increments in NO signaling, associated with mitochondrial biogenesis, increased reserve respiratory capability and lifespan extension. The mitochondrial effects promoted by CR were also observed in insulin secreting cells (INS1). However, under the CR condition, insulin secretion stimulated by glucose was impaired. The likely explanations are reduced mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation, or the alteration in mitochondrial morphology, associated, in our model, with enhanced mitofusin-2 expression (Mfn-2). In cells which the Mfn-2 was knocked down, insulin secretion in CR and AL groups was responsive to glucose at the same level, and the intracellular oxidants levels were much higher. Overall, CR improves 'NO signaling due to enhanced insulin sensitivity, through Akt, and results in mitochondrial biogenesis. Adiponectin is a key molecule in this phenomenon. Increments in mitochondrial mass enhance the cellular reserve respiratory capability and lifespan. Mitochondrial morphology alterations are associated with possible decreases in ROS generation and impaired insulin release, maintained the low levels of plasmatic insulin.

Keywords: adiponectin, mitochondrial biogenesis, mitofusin, nitric oxide, caloric restriction, insulin signaling

Abreviaturas e siglas

ψ_m Potencial elétrico transmembranas mitocondrial

Akt Proteína quinase B

AL Ad libitum

AIN American Institution of Nutrition
Ara-c 1-β-D-arabinofuranosilcitosina

ATP Adenosine tri-fosfato

DCF-DA Diclorofluoresceína di-acetato
DMEM Meio Eagle Dulbeco modificado

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido deoxiribonucléico

DNP 2,4-dinitrofenol

DRP Proteína relacionada à dinamina

DNTB Ácido nitro-benzóico
DsRed Red fluorescent protein

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético **EROs** Espécies reativas de oxigênio Fis Proteína de fissão mitocondrial **GFP** Green fluorescent protein GH Hormônio do crescimento Guanosina tri-fosfato **GTP** Peroxido de hidrogênio H_2O_2 **iNOS** Óxido nitrico sintase indutível IGF-1 insulin-like growth factor 1

IRS Receptor do substrato de insulina

KRB Krebs-Ringer bicarbonato

Mfn Mitofusina

m.o.i Multiplicidade de infecção
NIH National Institutes of Health
NIA National Institute on Aging
nNOS Óxido nitrico sintase neuronal

NO₂ nitrito NO Óxido nítrico

NOS Óxido nitrico sintases

NTD naftiridinona ONOO peroxinitrito

O₂-• Ânion radical superóxido OPA Proteína da atrofia óptica PAGE Gel de poliacrilamida

PGC1-alfa PPAR-gamma co-activator 1

PPAR-gama Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

RC Restrição calórica
RI Receptor de insulina
SDS Dodecil sulfato de sódio

Ser Serina

SNAP S-nitroso-N-acetil-penicilamina

TBS Tampão Tris salino

TBST Tampão tris salino com detergente tween

Tyr Tirosina

UCPs Proteínas desacopladoras UI Unidade internacional

VSMC Células da musculatura vascular lisa

Sumário

1	Restrição calorica	18
	1.1 Conceito de restrição calórica: protocolo para roedores	19
	1.2 Espécies reativas de oxigênio (EROs), envelhecimento e restrição calórica	20
	1.3 Alterações metabólicas promovidas pela restrição calórica	26
	1.4 Restrição calórica e a dependência de *NO para o aumento na	28
	biogênese mitocondrial	
	1.5 A morfologia mitocondrial	34
2	Objetivos	36
	2.1 Geral	36
	2.2 Específicos	36
3	Metodologia	37
	3.1 Estudos in vivo	37
	3.1.1 Experimentos em camundongos Swiss fêmeas	37
	3.1.1.1 Restrição calórica e desacoplamento mitocondrial	37
	3.1.1.2 Análises sorológicas de glicose e insulina	38
	3.1.1.3 Análise de nitrito (NO2) plasmático	38
	3.1.1.4 Western Blot	38
	3.1.1.5 Atividade citrato sintase	39
	3.1.2 Experimentos em ratos Sprague-Dawley machos	41
	3.1.2.1 Restrição Calórica	41
	3.1.2.2 Preparo de soro para uso em cultura de células	41
	3.1.2.3 Análises sorológicas	41
	3.2 Estudos <i>in vitro</i>	42
	3.2.1 Experimentos em VSMC	42
	3.2.1.1 Cultivo celular	42
	3.2.1.2 Análise de NO ₂ no meio de cultura celular	43
	3.2.1.3 Imunoprecipitação de adiponectina do soro	43
	3.2.1.5 Western Blot	44
	3.2.2 Experimentos em neurônios de células granulosas de cerebelo	44

3.2.2.1 Cultivo celular	44
3.2.2.2 Viabilidade celular	45
3.2.2.3 Análise de NO2 no meio de cultura celular	46
3.2.2.4 Atividade citrato sintase	46
3.2.2.5 Respiração celular	46
3.2.2.6 Western Blot	46
3.2.3 Experimentos em células INS1	47
3.2.3.1 Cultivo celular	47
3.2.3.2. Nocaute de Mitofusina-2	48
3.2.3.3 Secreção de insulina	48
3.2.3.4 Geração de EROs	49
3.2.3.5 Western Blot	49
3.2.3.6 Massa e morfologia mitocondriais	50
3.2.3.7 Respiração	50
4 RESULTADOS	
4.1 In vivo	51
4.1.1 Efeitos da RC e DNP na biogênese mitocondrial, sinalização por	51
insulina e *NO	
4.2 In vitro	60
4.2.1 Efeitos do soro de ratos caloricamente restritos na sinalização por	60
insulina e *NO em VSMC	
4.2.2 Efeitos do soro de ratos caloricamente restritos em neurônios de	65
células granulosas de cerebelo	
4.2.3 Efeitos do soro de ratos caloricamente restritos em células INS1	71
5 Discussão	80
6 Conclusões	89
7 Referências	90
8 Lista de anexos	102

1 RESTRIÇÃO CALÓRICA

A RC tornou-se, nas últimas décadas, uma ferramenta importante no estudo dos complexos mecanismos envolvidos no envelhecimento (Colman & Anderson, 2011). Por ser capaz de prolongar a longevidade em muitas espécies, de leveduras a roedores (Sohal & Weindruch, 1996; Partridge & Gems, 2002; Speakman, 2007), busca-se compreender seus mecanismos de ação. Muitos estudos no campo da RC trouxeram à tona vias, alteradas no envelhecimento e preservadas durante a RC, cruciais para a progressão da perda funcional celular característica do envelhecimento que, portanto, se tornaram alvo de atenção para o desenvolvimento de miméticos de RC (reviewed in Ingram *et al.*, 2006; Ingram & Roth, 2011).

Algumas alterações bioquímicas causais para o envelhecimento se sobrepõem às verificadas em várias doenças degenerativas. Por exemplo, a instabilidade dos genomas nuclear e mitocondrial, disfunções neuroendócrinas, mudanças na homeostase de cálcio, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondriais e lesões neurais de origem inflamatória são comuns ao envelhecimento, doenças neurodegenerativas como Parskinson e Alzheimer (revisado em Lee *et al.*, 2000) e neuromotoras, como Esclerose Lateral Amiotrófica (revisado em Finkel & Holbrook, 2000).

As EROs, consideradas causais para o processo de envelhecimento, de acordo com a "*Free Radical Theory of Aging*" (Harman, 1956), são também relacionadas à etiologia de diabetes, obesidade e síndrome metabólica (revisado em Houstis *et al.*, 2000), sendo associadas aos fenótipos de resistência periférica à insulina, complicações cardiovasculares e disfunção hepática que comprometem o metabolismo de lipídios, observados tanto no envelhecimento quanto nas doenças citadas (Houstis *et al.*, 2006;Finkel & Holbrook, 2000; Petersen *et al.*, 2003).

Muito do que se sabe sobre a relação entre a geração de EROs e taxas metabólicas deve-se aos estudos de organismos em RC (Masoro *et al.*, 1982). Vários achados sobre o funcionamento mitocondrial foram possíveis utilizando-

se a RC como modelo (Gredilla *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2004, Lambert & Merry *et al.*, 2004). Neste sentido, o papel da RC em estimular a biogênese mitocondrial durante o envelhecimento trouxe à tona a importância deste processo para a saúde (revisado em López-Lluch *et al.*, 2006).

O estudo de moléculas denominadas sensores de nutrientes, por exemplo, as sirtuínas e TOR (do inglês, *target of rapamycin*), na fisiologia celular foi encorajado após os achados de que a RC modula a atividade destas proteínas, especialmente sirtuínas, as mais estudadas. A atividade de sensores celulares tem inúmeras conseqüências fisiológicas (Sharp,2011; Wei *et al.*, 2008; Fontana *et al.*, 2010), que estão sendo adicionalmente investigadas em diabetes, obesidade e doenças hepáticas (Li *et al.*, 2011^a; Westphal *et al.*, 2007).

Finalmente, as vias moduladas pela RC são de interesse para a redução na progressão do envelhecimento, e também para o tratamento de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, obesidade, síndrome metabólica e doenças neurodegenerativas (Varady & Hellerstein, 2008; Weiss & Fontana, 2011; Omodei & Fontana, 2011; Minor *et al.*, 2010; Moore *et al.*, 2011; Hardingham & Lipton, 2011). Neste sentido, a RC tornou-se um modelo para o estudo das complexas vias bioquímicas celulares e, por ser uma intervenção que favorece a homeostase celular, seus mecanismos de ação, não completamente compreendidos, vêm sendo amplamente estudados.

1.1 Conceito de restrição calórica: protocolo para roedores

A restrição calórica (RC), a priori, é uma intervenção dietética por meio da qual se reduz o consumo de calorias, mantendo-se a proporção entre os macronutrientes e evitando-se a desnutrição. Para tal recomenda-se o ajuste dos níveis de vitaminas e minerais, o que significa a suplementação de micronutrientes na dieta a ser restringida, de forma que os organismos em RC consumam a mesma quantidade de micronutrientes que os controles (revisado

em Cerqueira & Kowaltowski, 2010; Pugh *et al.*, 1999). A RC de 40% foi testada em 1935 por McCay *et al.*, e aumentou significativamente a sobrevida de ratos. Desde McCay, os protocolos de RC para roedores divergiram muito, variando de restrição de 25 a 60% de calorias. A idéia original de se manter os níveis de micronutrientes não é seguida restritamente (Masoro, 2005; Cerqueira & Kowaltowski, 2010). A restrição alimentar (em que não se corrige os micronutrientes) é a estratégia mais usada atualmente, e é empregada como sinônima à RC. Outras estratégias alimentares também classificadas como RC surgiram, como, por exemplo, o jejum intermitente, também chamado *every other day*, segundo o qual os animais são submetidos a ciclos alternados (24 h) de livre acesso e não-acesso à ração (Cerqueira & Kowaltowski, 2010).

Enquanto os efeitos da RC na longevidade são muito bem estabelecidos, o efeito de outras intervenções dietéticas usadas como sinônimas, não é (revisado em Cerqueira & Kowaltowski, 2010). Além disso, a restrição alimentar pode provocar desnutrição em roedores (Cerqueira & Kowaltowski, 2010), e o jejum intermitente não reduz o consumo de calorias na maioria dos estudos em que foi empregado, além de provocar o estresse de 24 h de jejum seguido de um período de hiper-alimentação compensatória (Cerqueira *et al.*, 2011^a).

1·2 Espécies reativas de oxigênio (EROs), envelhecimento e restrição calórica

EROs são formadas normalmente durante o metabolismo celular. O principal sítio de formação das EROs, em condições fisiológicas, na maioria das células, é a mitocôndria. Durante a respiração mitocondrial, uma pequena porcentagem dos elétrons que é transportada na cadeia respiratória escapa, e, reagirem monoeletronicamente com o O₂ presente em concentrações na matriz mitocondrial, form o ânion radical superóxido (O₂-•). O 02rapidamente dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) , espontaneamente ou devido à ação das enzimas Cu,Zn-superóxido-dismutase e Mn-superóxido-dismutase, presentes no espaço intermembranas e matriz mitocondrial, respectivamente (revisado em Halliwell & Gutteridge, 2007). O H_2O_2 , por sua vez, é eliminado por redundantes sistemas de defesa antioxidante, o que é compreensível dado sua reatividade com proteínas, lipídios e DNA na presença de metais de transição, ao originar o radical hidroxila (*OH). *OH é a espécie de maior reatividade entre as EROs conhecidas, altamente reativa com lipídios, proteínas e bases nitrogenadas do DNA. Embora se questione a presença intracelular de metais de transição livres, os danos oxidativos verificados em biomoléculas justificam sua existência (Mello Fillo & Meneghini, 1984; Gutteridge *et al.*, 1995). O $O_2^{-\bullet}$ também participa da formação de outra espécie de elevada reatividade química, o peroxinitrito (ONOO⁻), ao reagir com o óxido nítrico (*NO). Embora a dismutação do $O_2^{-\bullet}$ a H_2O_2 ocorra com um K*cat* próximo ao da constante de colisão de moléculas, a existência de resíduos de proteínas, lipídios e bases nitrogenadas de DNA nitrados em ambientes intracelulares evidencia a existência da formação de $ONOO^{-}$ *in vivo* (revisado em Halliwell & Gutteridge, 2007).

O acúmulo de biomoléculas oxidadas durante o envelhecimento foi proposto como causal para a senescência celular (Pearl, 1928; Harman, 1956). Proteínas oxidadas perdem a estrutura terciária, tornando-se agregados de difícil eliminação, não-funcionais (Davies, 1987; Johnston et al., 1998). Bases oxidadas do DNA nuclear, quando não eliminadas, podem, potencialmente, incorrer em mutações e quebras da fita dupla do DNA (Ronsein et al., 2011; Barbosa et al. 2009) ou iniciar sinalização para apoptose celular (Van den Dobbelsteen, 1996; Marnett et al., 2000). Lesões oxidativas no DNA mitocondrial, mais comuns que no DNA nuclear devido à localização deste próximo ao sítio de geração de EROs e, também, porque não são circundados por histonas protetoras, prejudicam a síntese de componentes da cadeia respiratória, codificados parcialmente neste DNA (Miquel et al., 1980; Wallace, 1992). Ácidos graxos insaturados componentes de membranas perdem a estrutura ao serem oxidados, afetando o tráfego de moléculas, fluidez e função de plasticidade e proteção das membranas (Gutteridge, 1995; Lee et al., 1999^b), além de originarem aldeídos de elevada reatividade química. Lipoperóxidos estão entre as biomoléculas oxidadas mais abundantes, capazes

de propagar a lesão oxidativa e são conhecidos por atacarem os DNAs mitocondrial e nuclear (Marnett, 1999).

Uma das primeiras teorias que surgiu para explicar o porquê se envelhece foi a "Rate of living hypothesis", proposta por Pearl (1928), a qual afirmava que o tempo de vida máximo de um organismo é inversamente proporcional à sua taxa metalólica. A partir das observações de Pearl, Harman (1956) estabeleceu uma ligação entre o metabolismo e o envelhecimento, ao propor que EROs geradas durante o metabolismo celular poderiam resultar no acúmulo de lesões oxidativas em biomoléculas com o passar dos anos. Esta teoria tornou-se amplamente aceita no fim década de 60, quando se descobriu a existência intracelular da enzima superóxido dismutase (McCord & Fridovich, 1969), o que fez cessar os questionamentos sobre a geração celular de EROs (revisado em Finkel & Holbrook, 2000).

Estudos subseqüentes demonstraram que a "Rate of living hypothesis" não é correta, incluindo estudos em organismos em RC, que apresentam elevadas taxas metabólicas, em alguns casos (revisado em Sinclair et al., 2005). Já a "Free Radical Theory of Aging" ainda é uma teoria considerada, e vem sendo corroborada por estudos de organismos em RC, os quais apresentam menor geração intracelular de EROs, com conseqüente redução nos marcadores de biomoléculas oxidadas (Hagopian et al., 2011; Merry, 2004; Sohal & Weindruch, 1996; Pamplona & Barja, 2006; Ramsey et al., 2004). Estes achados, embora de natureza correlativa, deram suporte à teoria pela qual EROs seriam causais para o envelhecimento (Haman, 1956; Yu, 1996; Barja, 2002).

Há ao menos 3 diferentes e não-excludentes hipóteses que explicam a reduzida geração de EROs mitocondriais durante a RC, e todas se baseiam em mudanças no metabolismo energético, como por exemplo a escassez de calorias, que afeta a atividade da oxidação de substratos energéticos (Lambert & Merry, 2004); o uso predominante de ácidos graxos como fonte de energia a despeito da glicose (Rodgers *et al.*, 2005; Guarente, 2008); e alterações no acoplamento mitocondrial (Lambert & Merry, 2004; Gredilla *et al.*, 2001).

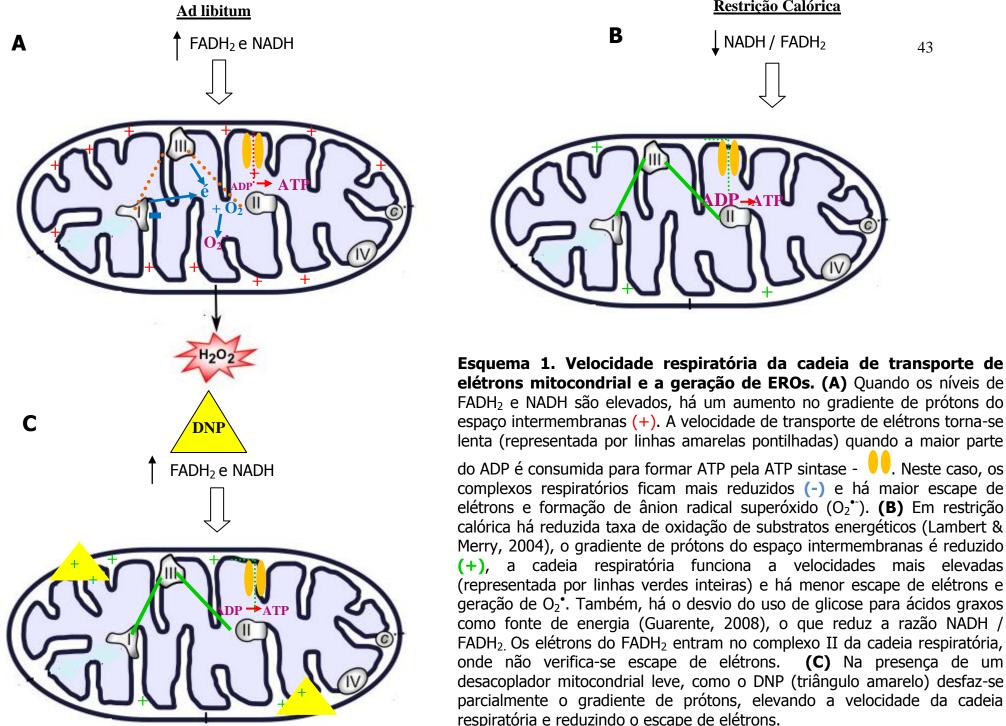
Os elétrons provenientes da oxidação de substratos energéticos são transportados ao longo da cadeia respiratória em um processo acoplado ao bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranas. A diferença na concentração de prótons entre estes dois compartimentos mitocondriais constitui a força próton-motriz (Δp) necessária para a síntese de ATP, e é um fator determinante para a velocidade da cadeia respiratória. Quando a Δp encontra-se elevada, a velocidade do transporte de elétrons torna-se lenta e, neste caso, os complexos ficam reduzidos por mais tempo, propiciando o escape de elétrons dos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons. Ao reagirem monoeletronicamente com o O_2 , estes elétrons originam $O_2^{\bullet-}$ (Brand *et al.*, 1994).

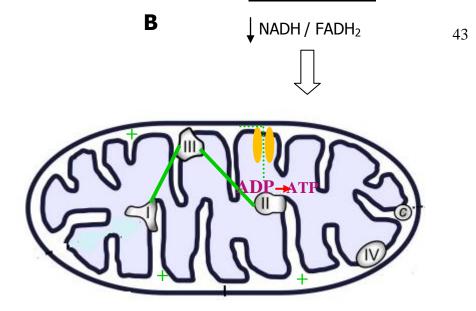
A oxidação de ácidos graxos origina elevadas quantidades de FADH₂, enquanto no metabolismo de glicose forma-se proporcionalmente mais NADH. Enquanto os elétrons deste último entram na cadeia de transporte de elétrons através do Complexo I, sítio de escape de elétrons, os provenientes de FADH₂ entram no Complexo II, e esta mudança no tipo predominante de coenzima reduzida que chega à cadeia respiratória é sugerida como uma das responsáveis pela reduzida formação de EROs (Guarente, 2008).

A RC diminui a Δp por meio da reduzida atividade de oxidação de substratos energéticos (Lambert & Merry, 2004), o que faz sentido, considerando-se a escassez de calorias dietéticas. Já o excesso de substratos oxidáveis, oriundos de uma alimentação *ad libitum*, ou excessiva, reduz a velocidade do transporte de elétrons, pois neste caso ADP é limitante para a velocidade da cadeia respiratória (Esquema 1). O retorno de prótons à matriz mitocondrial também reduz a Δp. Isto ocorre por meio da ATP sintase, durante a fosforilação oxidativa, mas também pode ocorrer por vias de desacoplamento, as quais dissociam o bombeamento de prótons da síntese de ATP (Skulachev, 1998). As vias de desacoplamento parecem ser reguladas de acordo com necessidades fisiológicas, e as proteínas e os mecanismos envolvidos neste fenômeno ainda são objetos de estudo (Brand *et al.*, 1994; Brand *et al.*, 2004). Evidências sugerem que a RC estimula o desacoplamento mitocondrial e, desta forma, a geração de EROs (Lambert & Merry, 2004; Gredilla *et al.*, 2001).

A baixa conversão energética (ATPs formados / alimento consumido) promovida pelo desacoplamento mitocondrial incentivou, na década de 30, o uso do desacoplador mitocondrial exógeno, 2,4-dinitrofenol (DNP) como estratégia emagrecedora em seres humanos (Tainter *et al.*, 1933). Contudo, o excesso em seu consumo resultou em algumas mortes e este foi proibido para uso humano. Entretanto, considerando-se seu potencial efeito na geração de EROs, o uso do DNP foi revisitado no meio científico. Em *S. cerevisiae* e em camundongos baixas doses de DNP elevaram as taxas respiratórias e reduziram a geração de EROs, impactando positivamente a longevidade em ambos os modelos (Barros *et al.*, 2004; Caldeira da Silva *et al.*, 2008).

A super-expressão de catalase especificamente nas mitocôndrias das células também prolongou a longevidade de camundongos (Schriner *et al.*, 2005), ao contrário de outras tentativas de se super-expressar enzimas antioxidantes no corpo celular (Seto *et al.*, 1990; Orr *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2000). O uso de antioxidantes dietéticos também foi falho neste sentido (Magwere *et al.*, 2006), o que resultou em um atual questionamento sobre o papel central de oxidantes no envelhecimento (Pérez *et al.*, 2009; Van Remmen & Jones, 2009). O conjunto de trabalhos sugere que a redução de EROs em seu sítio de geração afeta consideravelmente mais a longevidade que o estado redox celular como um todo.





Restrição Calórica

elétrons mitocondrial e a geração de EROs. (A) Quando os níveis de FADH₂ e NADH são elevados, há um aumento no gradiente de prótons do espaço intermembranas (+). A velocidade de transporte de elétrons torna-se lenta (representada por linhas amarelas pontilhadas) quando a maior parte do ADP é consumida para formar ATP pela ATP sintase - V. Neste caso, os complexos respiratórios ficam mais reduzidos (-) e há maior escape de elétrons e formação de ânion radical superóxido (O2°). (B) Em restrição calórica há reduzida taxa de oxidação de substratos energéticos (Lambert & Merry, 2004), o gradiente de prótons do espaço intermembranas é reduzido (+), a cadeia respiratória funciona a velocidades mais elevadas (representada por linhas verdes inteiras) e há menor escape de elétrons e geração de O₂°. Também, há o desvio do uso de glicose para ácidos graxos como fonte de energia (Guarente, 2008), o que reduz a razão NADH / FADH₂. Os elétrons do FADH₂ entram no complexo II da cadeia respiratória, onde não verifica-se escape de elétrons. (C) Na presença de um desacoplador mitocondrial leve, como o DNP (triângulo amarelo) desfaz-se parcialmente o gradiente de prótons, elevando a velocidade da cadeia respiratória e reduzindo o escape de elétrons.

1.3 Alterações metabólicas promovidas pela restrição calórica

Outros efeitos não redox foram evidenciados como centrais para os efeitos da RC. Os níveis séricos reduzidos de insulina, IGF-1 (do inglês, *insulin-like growth factor 1*) e hormônio do crescimento (GH, do inglês *growth hormone*) em mamíferos em RC despontaram como essenciais para o fenótipo apresentado por estes modelos (Dunn *et al.*, 1997). A partir destes achados, estudos genéticos foram iniciados para a melhor compreensão dos papéis de IGF-1/insulina e GH no envelhecimento. Modelos animais experimentais que apresentam deficiência genética na síntese de GH, como os camundongos *Snell, Ames* e *Laron*, são conhecidos por viverem muito mais (Laron, 2005). A atenuação nas vias de IGF-1 e insulina impacta positivamente a longevidade em camundongos (Kurosu *et al.*, 2005) e o nocauteamento genético do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1, do inglês *insulin receptor substrate 1*) prolongou a longevidade em camundongos fêmeas (Selman *et al.*, 2008).

Entre os efeitos mais conhecidos da atenuada sinalização por insulina / IGF1 encontram-se reduzidos peso corpóreo e depósito de gordura nestes modelos maior resistência ao estresse oxidativo e térmico e modulação da atividade de moléculas sensoras de nutrientes, como Sch9, Ras/AMPK, TOR (do inglês *target of rapamycin*) e sirtuinas (Avogaro *et al.*, 2010; Sharp, 2011; Wei *et al.*, 2008; Fontana *et al.*, 2010).

O menor consumo de calorias reduz os níveis plasmáticos de glicose (Kalant *et al.*, 1998; Cerqueira *et al.*, 2011^a), o que também é reflexo de uma maior sensibilidade periférica à insulina devido à maior atividade de seus receptores (Kemnitz *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997; Al-Regaiey *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2011^a).

A aparente contradição apresentada por diferentes estudos sobre os efeitos da RC na sinalização por insulina: a atenuação nas vias de sinalização de insulina e IGF1 ou a maior ativação dos receptores de insulina ainda não foi investigada diretamente. Os defensores da atenuação das vias de sinalização por insulina como meio de se prolongar a longevidade demonstraram que os camundongos com alguma deficiência genética nesta via apresentam reduzida tolerância à glicose, hiper-insulininemia e resistência à insulina, apesar de viverem significativamente mais que os camundongos controle, alimentados *ad libitum* (Selman *et al.*, 2008). Por outro lado, a RC melhora significativamente a curva glicêmica de animais e reduz o tempo de ação de insulina exógena, o que reflete uma maior sinalização após a ligação da insulina ao seu receptor. O impacto da RC na sensibilidade periférica à insulina está entre os efeitos mais reprodutíveis desta intervenção (Masoro *et al.*, 1992; Lane *et al.*, 1995; Cerqueira *et al.*, 2011^a).

A redução de massa corpórea e adiposidade em resposta à RC afeta os níveis circulantes de outros hormônios e, além de IGF-1/ insulina e GH, como por exemplo, adiponectina, hormônios tireoidianos, melatonina, e leptina (Spaulding *et al.*, 1997; Kinzig *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2004). Também se acredita que estes organismos apresentem uma maior sensação de fome, dados os níveis elevados de grelina e neuropeptídeo-Y (revisado in Speakman & Hambly, 2007). Todas estas alterações são capazes de desencadear profundas alterações celulares em nível de transcrição gênica (Lee *et al.*, 1999³; Weindruch *et al.*, 2001) além de desencadearem alterações hormonais secundárias, como alteração nos níveis hormonais relacionados ao estresse, por exemplo citocinas, corticoesteróides e fatores complemento, e redução de hormônios sexuais (Ottinger *et al.*, 2005). A presença sorológica dos substratos glicerol, ácidos graxos e corpos cetônicos é profundamente alterada em decorrência destas mudanças metabólicas (Barzilai & Gupta, 1998).

Análises de expressão gênica mostram que a RC previne muitas das mudanças metabólicas que ocorrem durante o envelhecimento. Genes envolvidos no metabolismo energético, como, por exemplo, enzimas da gliconeogênese, vias da pentose fosfato, síntese e degradação de lipídios e aminoácidos são abundantemente expressas durante a RC, enquanto verifica-se repressão de enzimas que participam da glicogênese (Lee *et al.*,1999^a).

A restrição de calorias da dieta afeta o uso das fontes de energia disponíveis. Em situações de consumo excessivo de calorias, os carboidratos são usados como fonte de energia e estoca-se gordura. Em RC, todas as fontes disponíveis de energia (aminoácidos, ácidos graxos e glicose) são utilizadas, entretanto o uso de ácidos graxos e aminoácidos é preponderante, tendo em vista a manutenção da glicemia, que é fundamental para o cérebro que apenas usa glicose como substrato energético (Guarente, 2008; Barzilai & Gupta, 1998). Em tecidos de elevada demanda energética, como o músculo, observa-se um desvio do uso de glicose para o uso de ácidos graxos via β-oxidação (Guarente, 2008). Em *S. cerevisiae* e *C. elegans* a obtenção de energia por meio da respiração mitocondrial a despeito da glicólise foi descrita entre os efeitos da RC (Lin *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2007), sendo que em *S. cerevisiae* este desvio metabólico foi crucial para o aumento na longevidade (Lin *et al.*, 2002).

1.4 Restrição calórica, 'NO E biogênese mitocondrial

A RC promove aumento na massa mitocondrial em tecidos de animais, embora não se saiba se esta é uma resposta adaptativa ou se este fenômeno tem outros significados fisiológicos (Guarente, 2008).

Novas mitocôndrias surgem a partir de mitocôndrias pré-existentes. Sabe-se que a divisão mitocondrial não está totalmente interligada à divisão celular. Por exemplo, mitocôndrias de tecido muscular se proliferam após exercício físico, após a exposição a substâncias como benzodiazepínicos, inibidores de fosforilação oxidativa e do influxo de cálcio e hormônios tireoidianos (Vorobjev & Zorov, 1983; Muller-Hocker *et al.*, 1986). A exposição de mamíferos a reduzidas temperatura por períodos longos também induz o aumento da massa mitocondrial em tecidos termogênicos como o adiposo marrom e o esquelético (Klaus *et al.*, 1991). Este aumento no número de mitocôndrias em reposta a mudanças ambientais reflete a

capacidade celular de se preparar para situações de maior demanda energética e de calor.

mitocondrial é formado por um DNA circular de genoma aproximadamente 16,5 kb bem como de enzimas necessárias para sua transcrição e replicação e de maquinaria para a tradução dos 13 mRNAs mitocondriais. O DNA mitocondrial codifica algumas das subunidades essenciais dos complexos I, III, IV e V da cadeia respiratória e também 2 RNAs ribossomais e 22 RNAs de transferência, necessários para a tradução protéica dentro da matriz. Contudo, a função e biogênese mitocondrial só são possíveis graças ao DNA genômico, o qual codifica mais de 100 subunidades da cadeia respiratória, bem como proteínas chaves para replicação e transcrição (para revisão Garesse & Vallejo, 2001) e cerca de outras 2000 proteínas mitocondriais envolvidas em transporte e diferentes vias metabólicas

O controle da biogênese mitocondrial envolve uma rede complexa de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes nucleares e mitocondriais. Os fatores centrais e mais estudados são os coativadores PGC1 (do inglês, *PPAR-gamma co-activator 1*), que foram identificados como co-ativadores de PPAR-gama (do inglês, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), um receptor nuclear adipogênico (Puigserver *et al.*, 1998; Uldry *et al.*, 2006). Os PGC1s são capazes de ativar muitos fatores de transcrição por interação proteína-proteína, sendo que a expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial parece envolver o recrutamento de co-ativadores com atividade de histona deacetilase, que reduzem a afinidade das histonas pelo DNA, propiciando o acesso de genes pela maquinaria de transcrição (Puigserver *et al.*, 1999), além de sua capacidade de interagir com e processar o RNA mensageiro (Monsalve *et al.*, 2000).

Nos estudos realizados em RC, o PGC1-alfa é o co-ativador mais estudado. Este é expresso diferentemente entre os tecidos, se concentrando mais naqueles cujas atividades mitocondriais são mais intensas, como o tecido adiposo marrom, fibras musculares lentas e rim (Puigserver *et al.* 1998; Puigserver & Spiegelman,

2003). Também é altamente estimulado por condições que resultam em maior demanda energética ou de calor, como a exposição ao frio, exercícios de curta duração e jejum (Puigserver *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Baar *et al.*, 2002).

Os benefícios conhecidos em se manter ativamente a biogênese mitocondrial durante o envelhecimento baseiam-se principalmente no fato de que esta via se torna ineficiente durante a senescência celular, resultando no acúmulo de mitocôndrias com alterações oxidativas e pouco funcionais (Navarro & Boveris, 2007). As mitocôndrias são susceptíveis a lesões oxidativas, e tornam-se menos eficientes e mais propícias à geração de EROs. Assim, a reciclagem e regeneração desta organela são importantes para manutenção apropriada de produção de energia e menor formação de EROs (para revisão, Lopez-Lluch *et al.*, 2008).

O equilíbrio entre a síntese de novas mitocôndrias e a e degradação das disfuncionais e oxidativamente alteradas é imprescindível para a manutenção do controle de qualidade mitocondrial. A falha em um destes processos conpromete a homeostase celular. Animais em jejum prolongado apresentam elevadas taxas de autofagia mitocondrial, entretanto, não há estudos provenientes de animais em RC (Hailey *et al.*, 2010). Todavia, a contínua estimulação da biogênese mitocondrial durante a RC auxilia a manutenção da quantidade de mitocôndrias saudáveis, independente da eficiência do processo de degradação (Guarente, 2008).

A biogênese mitocondrial estimulada por RC resulta em maior capacidade respiratória (López-Lluch *et al.,* 2006), o que é conveniente considerando-se o maior uso de ácidos graxos e aminoácidos como fonte de energia à despeito da glicólise (Guarente, 2008).

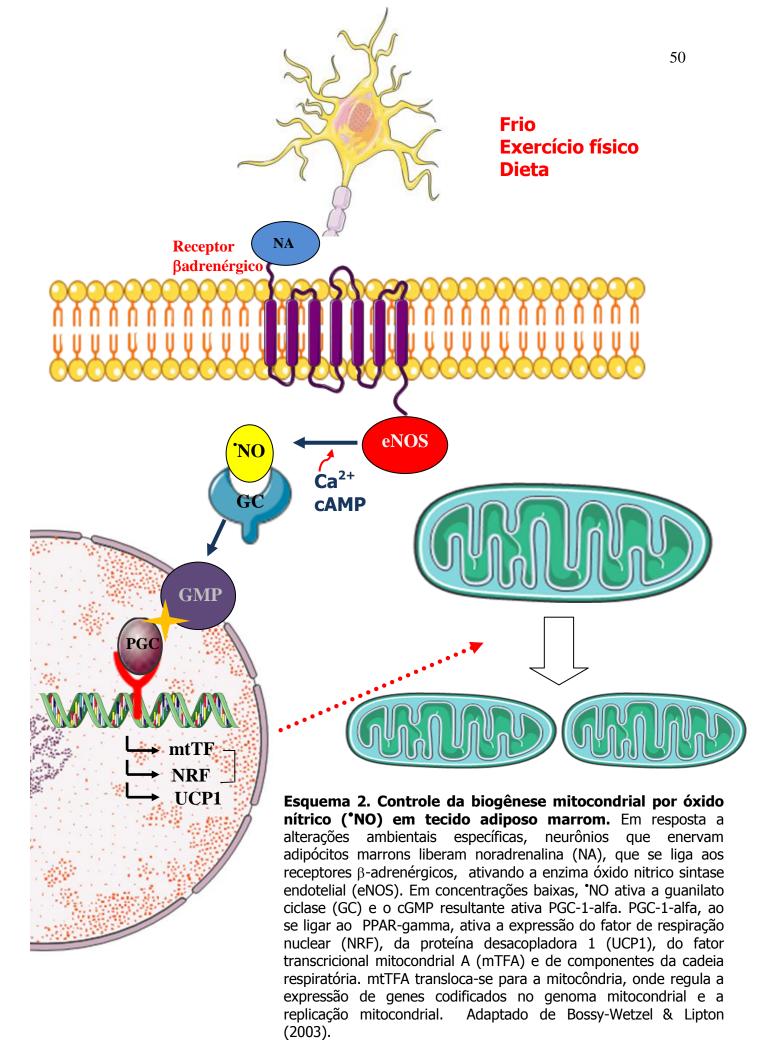
Não se sabe se a biogênese mitocondrial é determinante para a extensão da longevidade promovida pela RC. Entretanto, o aumento no número de mitocôndrias *per se* não significa longevidade, uma vez que outros estímulos que aumentam a biogênese mitocondrial como, por exemplo, o resveratrol (Csiszar *et al.*, 2009; Biala *et al.*, 2010) ou exercício físico (Baar *et al.*, 2002), não impactam positivamente a longevidade em roedores, embora tenham efeitos benéficos incontestáveis na homeostase celular, principalmente no que diz respeito à maior

sensibilidade à insulina, glicemia abaixo dos valores apresentados pelos camundongos controle e prevenção de obesidade e diabetes (Pearson *et al.*, 2008; Samorajski *et al.*, 1985).

O fato intrigante na biogênese mitocondrial promovida pela RC é a dependência de óxido nítrico (*NO) para que este efeito se manifeste. O *NO, um radical livre de baixa reatividade química conhecido por suas propriedades vasodilatadoras (Moncada *et al.*, 1991) é capaz de aumentar a expressão de PGC-1-alfa via GMP cíclico (Esquema 2, Nisoli *et al.*, 2003; Nisoli *et al.*, 2005).

O envolvimento do *NO na biogênese mitocondrial foi evidenciado pela observação de que *NO exógeno ou gerado intracelularmente participa da diferenciação do tecido adiposo marrom (Esquema 2, Puigserver *et al.*, 1998; Nisoli *et al.*, 1998), induzindo a expressão de proteínas desacopladoras, sendo este tecido o principal responsável pela geração termoregulatória de calor, justamente por dissipar energia por meio das UCPs mitocondriais (Lowell & Spiegelman, 2000). Posteriormente descobriu-se que o aumento na respiração promovida pelo *NO não era apenas devido ao aumento na expressão de UCPs, mas também pelo aumento na massa mitocondrial (Esquema 2, Nisoli *et al.*, 1998; Nisoli *et al.*, 2003).

Desde então doadores de *NO são utilizados em estudaos da diferenciação de tecido adiposo marrom e na biogênese mitocondrial em diferentes tipos celulares. A biogênese mitocondrial estimulada por *NO resulta em mitocôndrias funcionalmente ativas, capazes de manter respiração acoplada e levar à geração de ATP via fosforilação oxidativa (Nisoli *et al.*, 2004). Estes eventos ocorrem em vários tipos celulares e não apenas em células do tecido adiposo marrom (Nisoli *et al.*, 2004).



O *NO intracelular é sintetizado a partir de L-arginina, NADPH e oxigênio pelas óxido nítrico sintases (NOS, do inglês *nitric oxide synthases*), presentes em quase todas as células de mamíferos. Há 3 isoformas de NOS identificadas, duas reguladas por segundos mensageiros, a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), e uma induzida por citocinas e produtos bacterianos (iNOS). As três isoformas respondem a diferentes estímulos e estão constitutivamente presentes em muitos tecidos (Moncada *et al.*, 1991). Dentre estas, a eNOS foi caracterizada como enzima-chave no processo de biogênese miotocondrial. Camundongos eNOS^{-/-} apresentam tecido adiposo marrom funcionalmente inativo e massa mitocondrial reduzida em diversos tecidos, mesmo naqueles que apresentam as outras formas de NOS. Adicionalmente, as mitocôndrias nos camundongos eNOS^{-/-} apresentam deficiência na beta-oxidação de ácidos graxos, baixa velocidade respiratória e reduzidos níveis de produção de ATP e alterações morfológicas (Nisoli *et al.*, 2003; Nisoli *et al.*, 2004; Le Gouill *et al.*, 2007).

Camundongos eNOS^{-/-} submetidos à restrição dietética não apresentaram aumento na expressão de PGC 1-alfa, tampouco nos outros fatores regulados por este (Nisoli *et al.*, 2005). Se a eNOS traduz as alterações metabólicas em incrementos na massa de mitocôndrias durante a RC, supõe-se que esta enzima esteja mais ativa nesta condição, pois apenas o aumento na expressão reportado (Nisoli *et al.*, 2005) não significa necessariamente maior atividade. Todavia, não se elucidou se isto é um fato e, caso seja, se a maior atividade é basal ou oscila de acordo com outros estímulos, por exemplo, jejum, alimentação, atividade física, variação térmica ou outros.

A insulina é um ativador hormonal da eNOS (Zeng & Quon, 1996). Na RC, como já mencionado, os níveis de insulina são reduzidos, embora seu receptor esteja mais fosforilado (Kemnitz *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1997; Al-Regaiey *et al.*, 2007; Cerqueira *et al.*, 2011^a). IRS1 e 2 são os primeiros substratos da atividade quinase do receptor de insulina (IR, do inglês *insulin receptor*). A atividade do IR resulta em fosforilação dos sítios de tirosina dos IRS1 e 2. Akt é um dos alvos de IRS1 e normalmente medeia várias ações da insulina, pois possui diversos alvos

intracelulares. A eNOS é fosforilada por Akt no resíduo de serina 1177, sendo este um sítio de ativação desta enzima (Dimmeler *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999).

Uma citocina cujas concentrações são elevadas durante a RC é a adiponectina (Zhu *et al.*, 2004). Ao se ligar no receptor de adiponectina, essa citocina leva à fosforilação de AMPK (Yamauchi *et al.*, 2002) que, por sua vez, fosforila Akt, estimulando a produção de *NO pela eNOS (Chen *et al.*, 2003). A adiponectina também resulta em maior fosforilação do IR, convergindo para a fosforilação de Akt em sítios de ativação (Stefan *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2004).

Embora o conjunto de trabalhos sugira que o aumento na sensibilidade à insulina promovido pela RC pode resultar em biogênese mitocondrial via maior atividade de eNOS, esta hipótese nunca foi testada. Pelo contrário, a RC sempre foi defendida como uma estratégia que reduz espécies oxidantes / radicais livres. O possível aumento na sinalização por *NO durante a RC abre novas perspectivas sobre o papel do balanço redox na saúde e no envelhecimento / doença.

1.5 A morfologia mitocondrial

As mitocôndrias dentro de uma célula estão em constante comunicação, sendo capazes de se unirem e se separarem em eventos coordenados de fusão e fissão, dando origem a uma rede de mitocôndrias em constante movimento (revisado em Stiles *et al.*, 2011).

Proteínas GTPases de fusão e fissão estão presentes nas membranas mitocondriais externas e espaço intermembranas. Em mamíferos, mitofusinas -1 e -2 (Mfn-1 e Mfn-2) e proteína da atrofia ótica 1 (OPA-1) agem como âncoras que ligam a membrana externa de diferentes mitocôndrias. Proteína de fissão mitocondrial 1 (Fis-1) e proteína relacionada à dinamina (DRP-1) participam da clivagem da membrana mitocondrial externa, permitindo a fissão. A dinâmica das mitocôndrias é determinante na morfologia desta organela, que pode se apresentar mais alongada e tubular ou curta e vesicular, no caso da predominância

dos eventos de fusão ou fissão, respectivamente (para revisão, Karbowski & Youle, 2003; Stiles *et al.*, 2011).

Em uma mesma célula co-existem populações de mitocôndrias com morfologias heterogêneas (Wikstrom *et al.*, 2007), normalmente afetadas por estímulos *in loci*, como o $\Delta\psi_m$ e níveis de seqüestro de cálcio (para revisão, Karbowski & Youle, 2003; Yu *et al.*, 2008).

Os eventos de dinâmica mitocondrial são responsáveis pela exclusão de organelas não-funcionais. Estas são direcionadas à degradação pois apresentam perda do $\Delta \psi_m$ e a fusão é dependente deste. Também, ciclos de fusão e fissão propiciam o processo de complementaridade, ao permitir a troca de DNA, solutos e ψ_m , permitindo a recuperação de uma organela danificada (para revisão, Stiles *et al.*, 2011).

Embora os mecanismos não sejam bem conhecidos, organelas mais alongadas são associadas à menor formação de EROs e à maior eficiência na distribuição de ATP e cálcio intracelulares (Yu *et al.*, 2008; De Giorgi *et al.*, 2000; Skulachev, 2001), enquanto as vesiculares são associadas à maior geração de EROs e apoptose (Yu *et al.*, 2006).

Além dos estímulos *in loci*, pouco se sabe sobre estímulos externos que regulam a morfologia mitocondrial. Sabe-se que o metabolismo energético afeta a fusão ao alterar a disponibilidade de GTP e o processamento de OPA-1 por proteases dependente de ATP (para revisão Hyde *et al.*, 2010). Hiperglicemia ou glicolipotoxicidade elevam a fragmentação mitocondrial (Yu *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2009). PGC-1-alfa e beta induzem a expressão de Mfn-2 (Cartoni *et al.*, 2005; Liesa *et al.*, 2008), sugerindo que os fatores que regulam a biogênese mitocondrial se somam àqueles que regulam a dinâmica desta organela. Neste sentido, a redução na atividade de PGC-1-alfa verificada durante o envelhecimento (Ling *et al.*, 2004) pode justificar a existência de mitocôndrias mais fragmentadas neste processo (Bossy-Wetzel *et al.*, 2003).

Em contrapartida, a redução na fissão mitocondrial por meio de deleção do gene DRP1 prolongou a longevidade dos fungos *Podospora anserina* e

Saccharomyces cerevisiae (Scheckhuber et al., 2006) e a RC aumentou a fusão de mitocôndrias em *Podospora anserina* (van Diepeningen et al., 2010), contudo estudos do efeito da RC na dinâmica e morfologia mitocondriais em mamíferos são escassos.

2 Objetivos

2.1 Geral

Compreender a associação entre as vias de sinalização por insulina e os níveis intracelulares de *NO durante a RC, buscando-se o mecanismo pelo qual há maior biogênese mitocondrial induzida por *NO nesta condição dietética, bem como verificar os efeitos de maior massa mitocondrial na viabilidade e função celulares.

2.2 Específicos

Comparar os efeitos do desacoplamento mitocondrial leve e RC na biogênese mitocondrial e vias de ativação de insulina e *NO *in vivo*;

Elucidar, *in vitro*, os mecanismos pelos quais a RC estimula a sinalização por *NO;

Estudar, in vitro, os efeitos da RC na dinâmica mitocondrial;

Observar, *in vitro*, a relevância funcional de maiores massa e dinâmica mitocondriais.

3. METODOLOGIA

3.1 Estudos in vivo

3-1-1 Experimentos em camundongos Swiss fêmeas

3.1.1.1 Restrição calórica e desacoplamento mitocondrial

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Cuidados e Uso Animal. Camundongos *Swiss* fêmeas foram obtidos e mantidos no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química, Universidade de São Paulo, em condições controladas de temperatura (22°C), umidade, luz (ciclos de 12 h claro/escuro) e pressão e ar filtrado com filtro HEPA. Após o desmame, os camundongos tiveram acesso livre à dieta padrão para roedores (Rhoster), semi-purificada, AIN-93, irradiada, contendo 21,6% de proteína e 4,0% de lipídios.

Após 2 meses de vida, os camundongos *Swiss* fêmeas foram divididas em 3 grupos: 1) *Ad libitum* (AL)— alimentado com ração padrão *ad libitum* (AIN-93, Rhoster, Campinas); 2) DNP: alimentado com ração comercial *ad libitum* (AIN-93, Rhoster) e tratados com dinitrofenol (1 mg/L) (Sigma) adicionado à água oferecida *ad libitum*; *3)* RC: alimentado diariamente com 40% menos calorias que o grupo controle. Para tal, diariamente ofereceu-se o equivalente a 60% (g/g) do que foi consumido pelos animais do grupo controle de uma ração isocalórica e enriquecida em 40% com vitaminas e minerais (AIN-93, Rhoster).

Após 6 meses de tratamento os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. O sacrifício foi realizado em duas condições distintas. Um grupo a ser sacrificado foi colocado em jejum no dia anterior ao do sacrifício. No dia do sacrifício, após 12 horas de jejum, os camundongos foram alimentados com a ração comercial *ad libitum* e após 2 horas realizou-se o sacrifício. Outro lote de animais foi sacrificado em jejum de 8 h. Em ambos os casos o sangue foi retirado

por punção cardíaca, recolhido em micro-tubo com heparina (500 UI), centrifugado a 300 g e o soro guardado em freezer -80° C para posterior análise de nitrito (NO_2^-). O cérebro, fígado, coração, tecido adiposo visceral e músculo esqulético obtidos das patas traseiras foram extraídos.

Todos os animais foram pesados semanalmente. A ração consumida pelo grupo controle foi estimada semanalmente, e a partir do consumo do grupo controle calculou-se 60% de ração para os animais do grupo RC.

3.1.1.2 Análises sorológicas de glicose e insulina

Os materiais para todas as análises sorológicas foram obtidos por punção cardíaca após 12 horas de jejum. A glicose foi mensurada no sangue fresco usando um analisador digital de glicose (Accu Check $^{(8)}$ Performal). Insulina foi mensurada no soro com o auxílio do kit Linco Research ELISA. O soro foi obtido após coagulação do sangue à temperatura ambiente por 30 min, seguido de centrifugação a 300 g por 20 min.

3.1.1.3 Análise de nitrito (NO2) plasmático

O sangue fresco obtido após 12h de jejum foi acrescido de heparina e centrifugado imediatamente a 300 *g* por 20 min. O plasma foi estocado a -80°C e transportado em gelo seco até o laboratório do professor Francisco Laurindo (INCOR, USP, SP). Os níveis de NO₂-, um marcador amplamente usado dos níveis de NO (Reynolds *et al.*, 1998), foram avaliados no equipamento *NO analyzer* (Model 208A; Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA) por meio de detecção quiomioluminescente na presença de iodeto de potássio e ácido acético (Baylis *et al.*, 1998).

3.1.1.4 Western Blot

A expressão dos seguintes marcadores de biogênese e dinâmica mitocondrial foi avaliada por *Western Blot*: PGC-1-alfa, mitofusina-2, citocromo c oxidase. Para eNOS, foram avaliados a expressão da enzima total e sua forma ativa fosforilada no resíduo de serina 1177. A a Akt foi avaliada pela expressão da proteína total e sua forma ativa fosforilada no resíduo de serina 473.

Fígado, coração, cérebro, músculo e tecido adiposo foram lisados com auxílio de homogeneizador manual em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0), acrescido de 10% de glicerol, 0,5% de Igepal, coquetel de inibidores de protease (Sigma, 10% v/v) e inibidores de fosfatase (fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM e ortovanadato de sódio 20 mM). Os homogenatos obtidos foram centrifugados a 9.000 g por 20 min a 4°C . Os sobrenadantes foram aliquotados em volumes de $30 \text{ }\mu\text{L}$ e guardados em freezer -80°C até o momento do uso. Estes ensaios foram realizados com os órgãos dos animais sacrificados durante o jejum ou no período pós-prandial.

A expressão de eNOS e fosfo-eNOS, Akt e fosfo-Akt foi avaliada nos tecidos fígado, coração, cérebro, músculo e tecido adiposo. 20 μg de proteína de cada homogenato foram diluídos em tampão de amostra Laemmli (100 mM Tris.HCl, 2% g/v SDS, 10% v/v glycerol, 0.1% azul de bromofenol p/v) acrescido de 100 mM de dithiothreitol, exceto nas amostras preparadas para análise de eNOS e fosfo-eNOS, e em seguida aquecidas a 95°C por 5 min. As amostram foram aplicadas em SDS-PAGE (4% gel de empacotamento e 12% gel de resolução). A expressão de mitofusina-2, PGC1-alfa e citocromo c oxidase foi quantificada em músculo e tecido adiposo visceral, aplicando-se 40 μg de proteína de cada homogenato diluídos em tampão de amostra Laemmli com 100 mM de dithiothreitol, aquecidos a 95°C por 5 min e então aplicados em SDS-PAGE (4% gel de empacotamento e 12% gel de resolução).

Após a eletroforese as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose. A transferência foi realizada em aparelho semi-seco (*Semi-dry*,

Biorad), com auxílio do tampão de transferência (Tris base 48 mM pH 8,3; glicina 39 mM; SDS 0,037% p/v e metanol 20% v/v). Fixou-se a voltagem em 10 V, e a transferência foi realizada por 1 hora.

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau para visualização das bandas e em seguida lavadas 3 vezes com TBS (Tris.HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM), bloqueadas com 5% de leite desnatado (p/v) em TBS acrescido de 0,05% (v/v) de detergente tween (TBST) por 2 h, lavadas 3 vezes com TBST e incubadas com os anticorpos primários, diluídos em TBST acrescido de 0,01% (p/v) de leite. Os anticorpos anti-eNOS (Sigma), fosfoeNOS^{Ser1177} (Cell Signaling, clone C9C3), Akt (Calbiochem), fosfo-Akt^{Ser473} (Cell Signaling), mitofusina-2 (Cell Signaling), PGC1-alfa (Cell Signaling), citocromo c oxidase (Sigma) e gamma-actina (Sigma) foram diluídos 1:3000, 1:1000, 1:2000, 1:1000, 1:2.000, 1:1000, 1:2000 e 1:2.000, respectivamente. Após incubação overnight com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes em TBST por 5 min, e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho (1:10000), exceto as membranas incubadas previamente com o anti gamma-actina, nas quais se utilizou o anticorpo secundário anti-ovelha (1:15000). A revelação foi realizada por meio de quimioluminescência utilizando-se o kit ECL (Pierce). As intensidades das bandas foram analisadas no programa Image J.

A intensidade das bandas foi corrigida pela intensidade de gama-actina. Os valores foram expressos relativos às amostras controle, consideradas sempre 100%.

3.1.1.5 Atividade de citrato sintase

Homogenatos de tecido adiposo visceral, musculo esquelético, coração, cérebro e fígado obtidos como descrito no item 3.1.1.4 foram usados para medidas de atividade citrato sintase, uma enzima do ciclo do ácido cítrico presente na matriz mitocondrial, cuja atividade correlaciona-se com a massa de mitocôndrias (Rooyackers *et al.*, 1996; Civitarese *et al.*, 2007). 20 µg de proteína de cada lisado

foram incubados em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, acetil coenzima A 0,42 mM e 5',5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,1 mM a 37°C por 5 min. A reação foi iniciada adicionando-se o substrato da enzima, oxaloacetato 0,5 mM. A redução de DTNB por citrato foi mensurada espectrofotometricamente por 5 min a 412 nm [coeficiente de extinsão do DTNB = 13,6 mM $^{-1}$ · cm $^{-1}$; Silverstein, 1975]. As atividades são expressas como nmols de citrato · min $^{-1}$ · mg $^{-1}$ de proteína.

3.1.2 Experimentos em ratos Sprague-Dawley machos

3.1.2.1 Restrição Calórica

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Cuidados e Uso Animal e os ratos foram mantidos nas mesmas condições especificadas para os camundongos *Swiss* fêmeas (item 3.1.1.1).

Após 3 meses de vida os ratos *Sprague-Dawley* foram divididos em 2 grupos: 1) *Ad libitum* (AL): alimentado com ração comercial AIN-93 *ad libitum* (Rhoster) e 2) Restrição calórica (RC): diariamente ofereceu-se o equivalente a 60% do que foi consumido pelos animais controle da ração AIN-93 isocalórica e enriquecida em 40% com vitaminas e minerais (Rhoster).

Entre o 6° e o 8° mês de tratamento o sangue dos ratos dos grupos AL e RC foi retirado periodicamente da porção terminal da cauda. Após 8 meses de tratamento os ratos foram sacrificados em câmara de CO₂. Neste caso retirou-se a quantidade máxima de sangue por punção cardíaca.

Todos os animais foram pesados semanalmente. A ração consumida pelo grupo AL foi estimada semanalmente, e a partir do consumo do grupo controle calculou-se 60% de ração para o grupo RC.

3.1.2.2 Preparo de soro para uso em cultura de células

O sangue retirado dos ratos Sprague-Dawley foi recolhido em microtubos de 1,5 mL, coagulado em temperatura ambiente por 30 min e centrifugado por 20 min a 300 *g*. Os soros obtidos foram coletados, congelados a –20°C e inativados a 56°C por 30 min em banho-maria antes do uso em cultura de células (de Cabo *et al.*, 2003).

3.1.2.3 Análises serológicas

Glicose e insulina foram determinadas conforme descrito no item 3.1.1.2. Adiponectina foi determinada por *Western Blot*, cujo protocolo está descrito no item 3.1.2.5. O anticorpo anti-adiponectina policional produzido em coelho (Abcam) foi usado na concentração 1:1000 e o anticorpo secundário anti-coelho, 1:10000.

3.2 Estudos in vitro

3.2.1 Experimentos em VSMC

3.2.1.1 Cultivo celular

Células da musculatura vascular lisa (VSMC, do inglês *vascular smooth muscle cells*) foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Nadja Souza Pinto (IQ-USP). VSMC obtidas da ATCC (CRL-2797TM) na 6^a passagem foram cultivadas em meio DMEM (do ingles *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) acrescido de glicose 25 mM, bicarbonato de sódio 18 mM, glutamina 4 mM, geneticina (G-418) 0,3 mM, estreptomicina 100 μ g . mL⁻¹, penicilina 100 U . mL⁻¹ e soro fetal bovino 10% v/v em estufa de CO₂ (5%), a 37°C, com umidade constante. As células foram tripsinizadas com solução de tripsina 0,25% (Cultilab[®]) a cada 3 dias e mantidas em frascos de cultura de 75 cm² (Corning[®]). Após a 8ª passagem, as células foram

plaqueadas em poços de placas para cultivo celular de 6-poços (Corning[®]) e o mesmo meio de cultivo foi usado, exceto pelo fato de que o soro fetal bovino foi substituído pelo soro dos ratos AL. Após duas passagens adicionais no meio contendo o soro AL, as células foram lavadas com PBS e cultivadas em DMEM adicionado de soro dos ratos caloricamente restritos (RC).

Para o estudo da via de sinalização de insulina, realizou-se a inibição de Akt ou a imunoprecipitação da adiponectina dos soros. A inibição de Akt foi realizada pela adição de naftiridinona 17 (NTD) 1 μ M no meio AL ou RC e tratamento das células por 24 h. Como controle usou-se o solvente, DSMO, na mesma quantidade usada para adicionar a NTD. As células também foram cultivadas por 24 h com meio cujos soros foram previamente submetidos à imunoprecipitação de adiponectina, descrita no item (3.2.1.3).

Após 6, 12 ou 24 h de tratamento, os meios de cultura foram removidos e estocados a -80° C para posterior análise de NO_2^- . As células foram homogeneizadas em tampão de lise (3.1.1.4) e os homogenatos resultantes foram aliquotados e estocado a -80° C.

3.2.1.2 Análise de NO2 no meio de cultura celular

Os meios de cultura foram usados diretamente para análise de níveis de NO₂⁻ no equipamento *NO analyzer* (Model 208A; Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA) por meio de detecção quiomiluminescente na presença de iodeto de potássio e ácido acético (Baylis *et al.*, 1998).

3.2.1.3 Imunoprecipitação de adiponectina do soro

Cada mL de soro dos grupos controle ou RC foi incubado com $80~\mu\text{L}$ de proteína A-agarose 50% (v/v) (Sigma) sob agitação orbital a 4°C. Após 2 h, a suspensão foi centrifugada a 13.000 g por 5 min e o sobrenadante incubado com o anticorpo policlonal anti-adiponectina (Abcam) 50 μ g . mL⁻¹ sob agitação orbital a

 4° C. Após 12 h adicionou-se 200 μL de proteína A-agarose 50% (v/v) (Sigma) e a incubação foi continuada por mais 2 h. As suspensões foram centrifugadas a 13.000 g por 1 min, a 4°C. Os soros foram estocados ao final do processo para posterior uso em cultura de células e as *beads* de proteína A-agarose lavadas 5 vezes em tampão de lise e suspendidas em tampão de amostra Laemmli para avaliação da eficiência e pureza da imunoprecipitação por meio de eletroforese seguida de *Western Blot* (descrito no item 3.1.1.4 / 3.1.2.3).

3.2.1.4 Imunoprecipitação do receptor de insulina (IR)

Células (10^7) cultivadas por 24 h com os meios AL e RC antes ou após a imunoprecipitação da adiponectina foram lisadas em tampão de lise (descrito no item 3.1.1.4). Os lisados resultantes foram incubados a 4°C com o anticorpo antisubunidade beta do RI (Cell Signaling, 4 μ g · mL⁻¹). Após 12 h adicionou-se proteína A-agarose 50% (80 μ L . mL⁻¹) e a incubação foi continuada por 2 h a 4°C. As *beads* de proteína A-agarose foram lavadas 5 vezes em tampão de lise e suspendidas em tampão de amostra Laemmli posterior eletroforese seguida de *Western Blot*.

3.2.1.5 Western Blot

Os homogenatos de VSMC foram usados para análise da expressão de eNOS, nNOS, Akt. As formas ativas de eNOS e Akt foram avaliadas por meio da quantificação da fosforilação destas nos resíduos Ser¹¹⁷⁷ e Ser⁴⁷³, respectivamente. Os IRs imunoprecipitados dos homogenatos também foram submetidos à eletroforese para avaliação da expressão e fosforilação de tirosinas deste receptor. As condições dos *Westerns Blots* e suas análises foram as mesmas descritas no item 3.1.1.4. Os anticorpos produzidos em coelho anti- nNOS (Abcam), antisubunidade beta do RI (Cell Signaling) e anti fosfo-tirosina (Cell Signaling) foram diluídos 1:1.000, 1:1.000 e 1:2.000, respectivamente.

3.2.2.1 Cultivo celular

Ratos Sprague-Dawley machos neonatos (6-8 dias), obtidos do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química, Universidade de São Paulo, foram decapitados e os cerebelos extraídos e cortados em pequenos pedaços com tesoura cirúrgica em PBS suplementado com glicose 20 mM e tripsina 0,0125% (v/v). A suspensão resultante foi incubada a 37°C sob agitação. Após 40 min, adicionou-se inibidor de tripsina de soja (Sigma) 0,1% (v/v), e as células foram dispersas manualmente com auxílio do pipetador de 1 mL (adaptado de Courtney et al., 1990). A solução foi centrifugada a 300 g por 5 min e as células suspensas em DMEM-F12 (Gibco, glicose 25 mM) contendo 25 mM de bicarbonato de sódio, 25 mM de Hepes e 2% (v/v) de soro B27 (Gibco). As células foram contadas em hemocitômetro e adicionadas a placas de cultivo celular previamente acrescidas de poli-lisina (Sigma). Para testes de viabilidade as células foram plaqueadas em placas de 24 pocos (5 x 10^4 células / poco). 1 x 10^7 células foram plaqueadas em frascos de 75 cm² para ensaios de respiração e obtenção de homogenato para Western Blot. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa de CO₂ (5%) e umidade constante. Após 24 h, adicionou-se 1 μ M de 1- β -Darabinofuranosilcitosina (Ara-C, Merck) para prevenir o crescimento de células da glia. Ara-C foi removida após 72 h. No sétimo dia em cultura, o soro B27 foi substituído por 10% de soro obtido dos ratos dos grupos AL ou RC. Em alguns experimentos, 10 nM do doador de 'NO S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP), ou igual volume do solvente DMSO (0,001%), foram adicionados junto aos soros provenientes dos ratos. Os meios foram trocados a cada 3 dias e SNAP ou DMSO foram re-adicionados a cada troca de meio.

3.2.2.2 Viabilidade celular

Células viáveis, determinadas pelo fato de estarem anexas ao fundo da placa de cultura e por apresentarem morfologia característica de neurônio, foram contadas no sétimo dia de cultura celular, antes da troca do meio regular por meio contendo 10% de soro dos ratos AL ou RC, em microscópio (Photometrics Cool) acoplado à câmera Snap HQ Roper Scientific, utilizando-se a lente objetiva de aumento de 20 vezes e o filtro correspondente à luz branca. Cinco regiões de cada poço foram randomicamente escolhidas e fotografadas e as imagens posteriormente analisadas no programa do NIH, Image J. O mesmo procedimento foi realizado após o início dos tratamentos, ao longo de 12 dias. Não houve diferença significativa entre as regiões de um mesmo poço. Os dados foram coletados em triplicatas e os experimentos foram repetidos ao menos 3 vezes com diferentes preparações de células.

3.2.2.3 Análise de NO2 no meio de cultura celular

Após 48 h do início do tratamento com os soros dos ratos e SNAP, o meio de cultura foi recolhido e armazenado a -80° C para posterior análise de NO_2^- , descrita no item 3.2.1.2.

3.2.2.4 Atividade citrato sintase

Após 48 h de tratamento, os neurônios foram lisados em tampão de lise (descrito no item 3.1.1.4) e 50 μg de proteína foram utilizados para a avaliação de atividade citrato sintase dos homogenatos de acordo com o método descrito no item 3.1.1.5.

3.2.2.5 Respiração celular

Após 48 h de tratamento, os neurônios foram tripsinizados com solução de tripsina-EDTA 0,05% (v/v) (Cultilab) e contados em hemocitômetro. A tripsina foi inibida com inibidor de tripsina de soja (Sigma) 0,1% (v/v). Os neurônios foram adicionados à solução de PBS acrescido de 10 mM de glicose (1 x 10^6 células / mL). 2 mLs da suspensão de células foram adicionados à câmara de detecção de O_2 (Oroboros), onde avaliou-se a respiração basal, seguida da respiração na presença de oligomicina 0,5 μ g \cdot mL $^{-1}$ (inibidora da ATP sintase). A capacidade respiratória máxima foi avaliada na presença no agente desacoplador FCCP 2 μ M.

3.2.2.6 Western Blot

Após 48 h nos diferentes tratamentos, os neurônios foram lisados em tampão de lise (descrito no item 3.1.1.4) e submetidos à eletroforese seguida de *Western Blot* para análise da expressão de citocromo c oxidase, eNOS e nNOS. A forma ativa de eNOS foi determinada por *Western Blot* da forma fosforilada no resíduo de serina 1177. As condições das eletroforeses e dos *Westerns Blots* foram as mesmas descritas nos itens 3.1.1.4 e 3.2.1.5.

3.2.3 Experimentos em células INSI

3.2.3.1 Cultivo celular

Todos os experimentos foram realizados no laboratório do Dr. Orian Shirihai (Boston University), dentro do programa de doutorado sanduíche (PDEE-CAPES).

As células foram cultivadas em meio RPMI (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute)*-1640 (Gibco) contendo 4 ou 12 mM de glicose, 2 mM de glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 0,5 mM de β -mercaptoetanol, 100 μ g . mL⁻¹ de streptomicina, 100 UI de penicilina, e 10% (v/v) de soro fetal bovino, em estufa de CO₂ (5%) a 37°C e umidade constante. Células na 70ª passagem foram

tripsinizadas em solução de tripsina-EDTA 0,125% (v/v), contadas em hemocitômetro e plaqueadas em poços de placas de 48 poços (1,5 x 10^5 células / poço) para análise de secreção de insulina, viabilidade e geração de EROs, em placas de 6 poços (5 x 10^5 células / poço) para *Western Blot*, e em placas para respirometria celular (Seahorse), (0,7 x 10^5 células / poço).

Vinte e quatro horas após o plaqueamento das células, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura no qual o soro fetal bovino foi substituído por soro dos ratos controle ou RC (10%, v/v).

3.2.3.2. Nocaute de mitofusina-2

As células foram infectadas com lentivírus que expressa RNA de interferência para a Mfn-2 ou com lentivírus controle. Ambos os genomas virais codificam a GFP (do inglês, *green fluorescence protein*). Os lentivírus foram produzidos pelo Dr. Marc Liesa Roig (Boston University) e foram adicionados às células com m.o.i. (do inglês, *multiplicity of infection*) de 100 partículas virais / célula. Após 48 h, a infecção foi confirmada por expressão de GFP avaliada em microscópio confocal de fluorescência (Zeiss). A eficiência de infecção foi normalmente 100%. Após a confirmação da infecção, os soros dos ratos AL ou RC foram usados em substituição ao soro fetal bovino.

3.2.3.3 Secreção de insulina

Após 24 h de cultivo celular com os soros AL ou RC, o meio de cultura foi substituído por um similar, exceto pelo fato de que a concentração de glicose foi 2 mM e não se adicionou soro. Após 2 h, trocou-se o meio de cultura por tampão Krebs-ringer-bicarbonato (KRB, NaCl 115 mM; KCl 4,7 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgSO₄ 1,2 mM; NaHCO₃ 24 mM; albumina bovina 0,5% - p/v; pH 7,4) acrescido de glicose 2 mM. Após 30 min, o tampão foi removido e as soluções experimentais foram adicionadas: 1) Basal (tampão KRB adicionado de 2 mM de glicose);

estimulação por glicose (tampão KRB adicionado de 12 mM de glicose) e estimulação por glicose e KCl (tampão KRB adicionado de 12 mM de glicose e 30 mM de KCl) (Heart *et al.*, 2006). Após 1 h, os tampões foram removidos e diluídos 5 vezes em KRB (2 mM de glicose). 10 µL de cada amostra foram usados para o ensaio de concentração de insulina utilizando-se kit para radioimunoensaio (Linco Research) e insulina de rato como padrão. As leituras de absorbância foram realizadas no leitor de placa Tecan M1000. Os valores obtidos foram normalizados pelo número de células (Cunningham *et al.*, 1996).

3.2.3.4 Fluorescência de DCF

Após 24 h de cultivo celular com os soros AL ou RC, o meio de cultura foi substituído por um similar, exceto pelo fato de que a concentração de glicose foi 2 mM e não se adicionou soro. Após 2 h, trocou-se o meio de cultura por tampão KRB acrescido de diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA, 10 μM). Após 30 min, o tampão foi removido, as células lavadas 1 vez com tampão KRB e a fluorescência avaliada em leitor de placa de fluorescência (Tecan M1000) (excitação = 488 nm; emissão 530 nm). Em seguida as soluções experimentais foram adicionadas: 1) Basal (tampão KRB adicionado de 2 mM de glicose); estimulação por glicose (tampão KRB adicionado de 12 mM de glicose) e estimulação por glicose e KCl (tampão KRB adicionado de 12 mM de glicose e 30 mM de KCl) e leituras adicionais da fluorescência foram realizadas a cada 10 min.

3.2.3.5 Western Blot

Após 24 h de cultivo celular com os soros AL ou RC, as células foram lisadas em tampão RIPA (Tris.HCl 50 mM; NaCl 150 mM; NP-40 1% v/v; 0,5% deoxicolato de sódio v/v; SDS 0,1% p/v; pH 7,4) acrescido de 10% (v/v) de coquetel de inibidores de protease (Sigma). Os homogenatos obtidos foram centrifugados a 9.000~q por 20 min a 4° C e as concentrações de proteína mensuradas pelo método

desenvolvido por Bradford (1976). 30 µg de proteína de cada homogenato foram submetidas à eletroforese e posterior *Western Blot* (condições descritas no item 3.1.1.4). Avaliou-se a expressão de Mfn-2, OPA-1 e DRP-1 utilizando-se anticorpos produzidos em camundongo (Abcam) na proporção 1:1.000, 1:750 e 1:1.000, respectivamente. Porina foi usada como controle, e sua expressão foi avaliada usando-se o anticorpo produzido em coelho (Abcam) na diluição 1:1.000. A revelação foi realizada por meio de quimioluminescência utilizando-se o kit ECL (Pierce) no equipamento Imager LAS-4000 (Fuji). As intensidades das bandas foram analisadas no programa Image J e corrigidas pela intensidade de porina. Os valores foram expressos relativos às amostras controle, consideradas sempre 100%.

3.2.3.6 Massa e morfologia mitocondriais

As células foram previamente infectadas com o vírus que contem o vetor que codifica a proteína DsRed (do inglês, red fluorescent proteín), direcionada à mitocôndria graças a uma seqüência específica adicionada à terminação 5` do vetor desta proteína (Clontech). Após serem plaqueadas em placa para microscopia confocal (35 mm – Corning), as células INS1 foram cultivadas por 24 h com os soros AL ou RC e então analisadas no microscópio Zeiss LSM-510 de 2 fótons. A DsRed foi excitada a 543 nm por um laser de hélio e neon e a emissão foi obtida por meio do filtro BP 650-710 nm. A propriedade geométrica das redes foi determinada utilizando-se a opção análise de partículas do programa Image J (NIH). Uma única rede mitocondrial foi definida como aglomerados de pixels positivos para DsRed. Para cada rede determinou-se o comprimento; o aspecto (aspecto máximo dividido pelo mínimo), que é um indicativo de alongamento das estruturas; e a forma fatorial (FF = $[P^2]/[4\pi A]$), onde P é o comprimento e A a área da estrutura mitocondrial. FF é uma medida grau de ramificação da rede identificada (Twig *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008).

3.2.3.7 Respiração

Células aderidas na placa XF24 (Seahorse Bioscience) foram incubadas com meio RPMI modificado (sem bicarbonato de sódio, 3 mM de glicose) a 37°C por 45 min para se permitir que a temperatura e pH do meio atingissem o equilíbrio antes da primeira medida. O consumo basal de oxigênio foi mensurado por um sensor acoplado aos cartuchos imergidos dentro de cada poço da placa no equipamento XFAnalyzer (Seahorse Bioscience). Antes do início do experimento, células de 1 poço de cada fileira da placa foram tripzinizadas e contadas em homocitômetro. O poço vazio foi preenchido com tampão e usado como controle de temperatura. O consumo de O₂ foi normalizado por 10⁶ células. Após 30 min de avaliação da respiração basal, o equipamento foi programado para fazer adições seqüenciais de glicose, oligomicina e antimicina, nas concentrações finais de 12 mM; 0,5 µM; 2 μM e 1 μM, respectivamente, em intervalos de 10 min. O consumo de O₂ mitocondrial em cada condição foi considerado aquele descontado do consumo de O₂ na presença de antimicina. Os valores foram analisados no *Software* da Seahorse para o XF24 Analyzer.

4 RESULTADOS

4.1 In vivo

4·1·1 Efeitos da RC e DNP na biogênese mitocondrial, sinalização por insulina e `NO

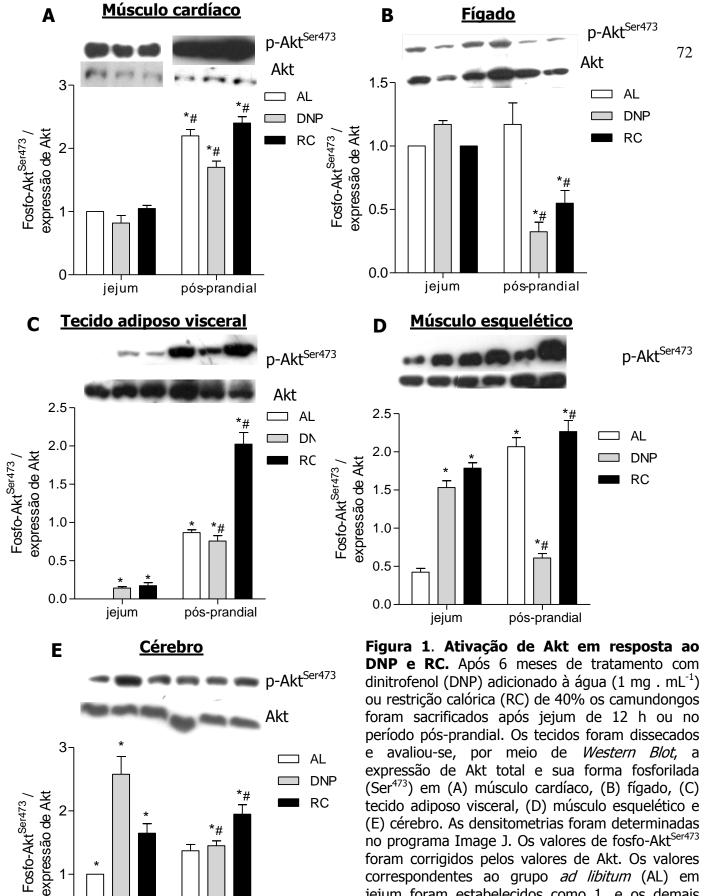
O uso de baixas doses de DNP proposto como mimético de RC (Caldeira da Silva *et al.*, 2008) baseou-se no fato de que ao promover o desacoplamento mitocondrial leve, reduz o aproveitamento energético, o que afeta a taxa de ganho de peso e leva a alterações metabólicas similares às vistas em RC, como reduzidos níveis de glicose e insulina circulantes (Tabela I). O DNP também apresenta efeitos redox. O desacoplamento eleva a velocidade da cadeia respiratória, o que reduz a geração de mitocondrial de EROs e os níveis de biomoléculas oxidadas. Os efeitos metabólicos e redox do DNP foram associados ao aumento na longevidade de camundongos *Swiss* fêmeas (Caldeira da Silva,2008), o que anos antes já havia sido observado, mas não discutido, em ratos (Tainter, 1937).

Tabela 1. Efeitos metabólicos da RC e DNP em camundongos *Swiss* fêmeas após 6 meses de tratamento. *p < 0,05 comparado ao grupo AL.

Medidas metabólicas após 6 meses de tratamento				
	AL	DNP	RC	
Massa corpórea (g)	44,8 ± 4,80	$38,6 \pm 3,80^*$	35,3 ± 4,40*	
Massa de tecido adiposo visceral (g)	$5,3 \pm 1,40$	$2.8 \pm 1.30^*$	$1,86 \pm 0,56^*$	
Insulina sérica (ng . mL ⁻¹)	0.6 ± 0.04	$0.5 \pm 0.02^*$	$0.30 \pm 0.02^*$	
Glicose sérica (mg . dL ⁻¹)	$150 \pm 8,40$	$120 \pm 7,90^*$	$108 \pm 3,50^*$	
Nitrito sérico (μM)	$0,11 \pm 0,13^*$	$0.37 \pm 0.22^*$	$0,51 \pm 0,18^*$	

As alterações metabólicas promovidas por ambos os tratamentos resultaram em modulações tecido-específicas da via de sinalização de insulina, avaliada pela expressão e fosforilação de Akt, proteína-chave em mediar os efeitos da fosforilação do receptor de insulina (Brazil & Hemmings, 2001), que diferiram se os camundongos foram sacrificados em jejum ou no período pós-prandial (Figura 1).

Em músculo cardíaco e fígado não houve diferença entre os tratamentos e o controle, AL, no período de jejum (Figura 1 A e B). No período pós-prandial, a fosforilação de Akt no músculo cardíaco foi aumentada em todos os grupos da mesma forma (Figura 1 A). Em fígado, ambos os tratamentos, DNP e RC, resultaram em uma acentuada redução na fosforilação da Akt após a alimentação (Figura 1 B). Em tecido adiposo visceral e músculo esquelético, os níveis basais, em jejum, de fosforilação da Akt foram consideravelmente elevados nos grupos DNP e RC, os quais foram adicionalmente elevados pós-prandialmente, exceto no músculo esquelético do grupo DNP, no qual houve uma redução da atividade de Akt (Figura 1 C e D). Nestes dois tecidos, a alimentação resultou em acentuada fosforilação de Akt no grupo AL, equiparando-se aos grupos DNP e RC (Figura 1 C e D). Em cérebro, DNP e RC também propiciaram maior atividade basal de Akt e a alimentação não afetou os grupos AL e RC. Entretanto, assim como verificado em músculo esquelético, o DNP reduziu a atividade de Akt em resposta à alimentação (1 Figura E).



RC

Fosfo-Akt^{Ser473} /

2

0

jejum

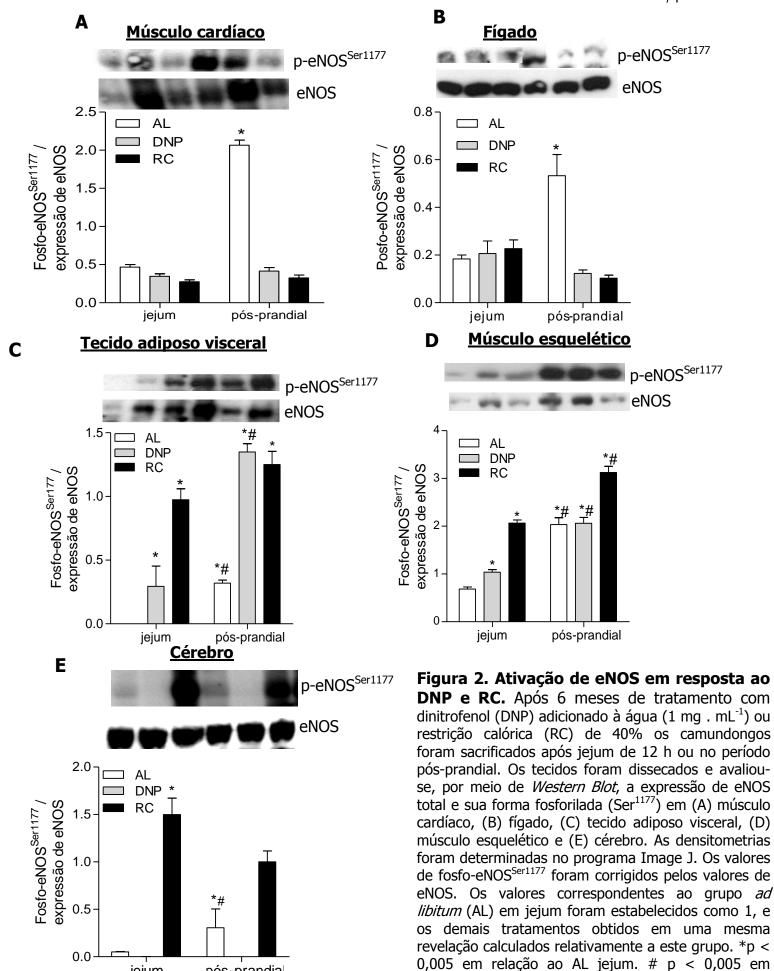
pós-prandial

(Ser⁴⁷³) em (A) músculo cardíaco, (B) fígado, (C) tecido adiposo visceral, (D) músculo esquelético e (E) cérebro. As densitometrias foram determinadas no programa Image J. Os valores de fosfo-Akt^{Ser473} foram corrigidos pelos valores de Akt. Os valores correspondentes ao grupo ad libitum (AL) em jejum foram estabelecidos como 1, e os demais tratamentos obtidos em uma mesma revelação calculados relativamente a este grupo. *p < 0,005 em relação ao AL jejum. # p <0 ,005 em relação ao mesmo tratamento em jejum.

A Akt, quando ativa, tem como alvo, entre vários outros, a enzima eNOS (Dimmiler *et al.*, 1999), que tornou-se de grande interesse na área de RC devido ao envolvimento do *NO na biogênese mitocondrial (Nisoli *et al.*, 2004; Nisoli *et al.*, 2003).

Em tecido adiposo visceral e músculo esquelético a fosforilação de eNOS no resíduo de serina 1177 refletiu a atividade de Akt, ou seja, DNP e RC elevaram a atividade basal de eNOS e no período pós-prandial o aumento na fosforilação da eNOS ocorreu em todos os grupos (Figura 2 C e D).

Em músculo cardíaco e fígado, os tratamentos não afetaram a fosforilação basal de eNOS, contudo preveniram a fosforilação desta no período pós-prandial (Figura 2 A e B). Curiosamente, em cérebro, o DNP reduziu a níveis quase indetectáveis por Western Blot a fosforilação de eNOS e a RC resultou em valores consideravelmente elevados de fosfo-eNOS^{Ser1177} em ambas as condições, jejum e pós-prandial (Figura 2 E).



relação ao mesmo tratamento em jejum.

jejum

pós-prandia

A atividade citrato sintase dos homogenatos obtidos dos tecidos dos camundongos foi medida como parâmetro de avaliação de biogênese mitocondrial. Em músculo cardíaco e fígado a atividade citrato sintase foi reduzida após RC ou DNP (Figura 3 A e B). Em tecido adiposo visceral e músculo esquelético a atividade citrato sintase foi significativamente elevada por ambos os tratamentos (Figura 3 C e D) e em cérebro apenas a RC aumentou a atividade desta enzima (Figura 3 E).

Os efeitos da RC e DNP em promover maior biogênese mitocondrial foram adicionalmente confirmados por meio da quantificação das expressões de PGC-1-alfa e citocromo c oxidase, elevadas nestes tecidos em resposta aos dois tratamentos (Figura 4).

Além do aumento na massa mitocondrial, RC e DNP elevaram a expressão de Mfn-2 em tecido adiposo visceral e músculo esquelético (Figura 5 A e B) e a RC aumentou drasticamente a expressão de Mfn-1 em cérebro (Cerqueira *et al.*, 2012).

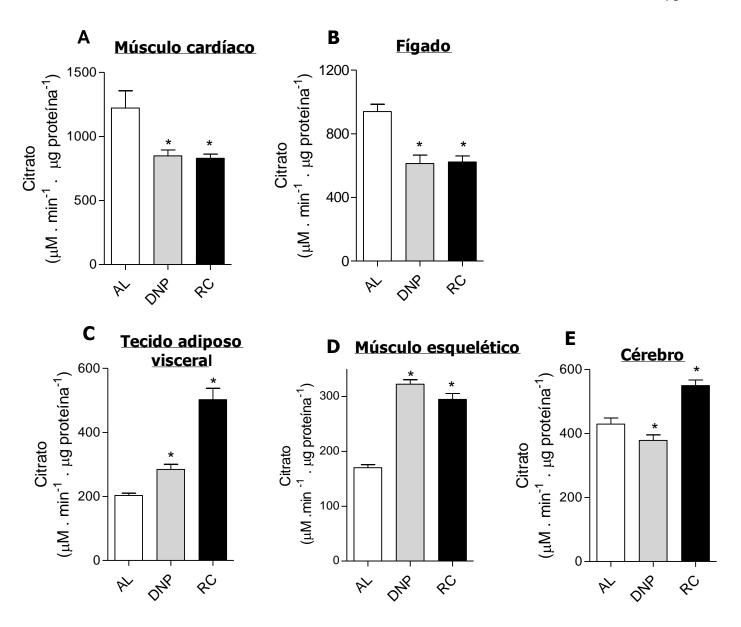


Figura 3. Efeitos do DNP e da RC na atividade de citrato sintase. Após 6 meses de tratamento com dinitrofenol (DNP) adicionado à água (1 mg . mL⁻¹) ou restrição calórica (RC) de 40%, os camundongos foram sacrificados após jejum de 12 h. Os tecidos foram dissecados e avaliou-se a atividade de citrato sintase em (A) músculo cardíaco, (B) fígado, (C) tecido adiposo visceral, (D) músculo esquelético e (E) cérebro. *p<0,005 em relação ao grupo AL.

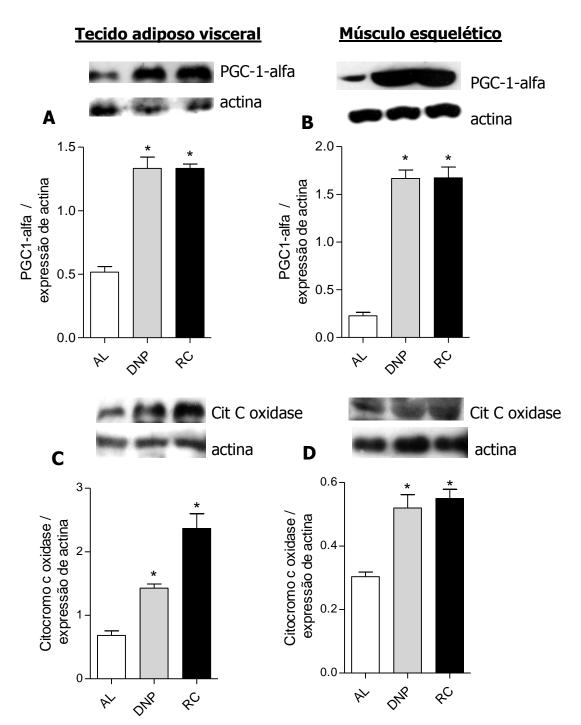


Figura 4. DNP e RC aumentam a expressão de PGC-1-alfa e citocromo c oxidase em tecido adiposo viceral e músculo esquelético. Após 6 meses de tratamento com dinitrofenol (DNP) adicionado à água (1 mg . mL⁻¹) ou restrição calórica (RC) de 40% os camundongos foram sacrificados após jejum de 12 h. Os tecidos foram dissecados e os homogenatos submetidos à eletroforese e posterior avaliação da expressão de (A e B) PGC-1-alfa e (C e D) citocromo c oxidase por meio de *Western Blot*. *p<0,005 em relação ao grupo AL.

4.2.1 Efeitos do soro dos ratos caloricamente restritos na sinalização por insulina e NO em VSMC

Para o estudo mecanístico dos efeitos da RC na via de sinalização de insulina e *NO, usamos soros de ratos caloricamente restritos em cultura de VSMC, capazes de produzir *NO e sensíveis à insulina (Sherrer *et al.*, 1994). Algumas alterações sorológicas promovidas pela RC podem estar associadas à maior sensibilidade desta via como, por exemplo, os níveis reduzidos de insulina e glicose e níveis elevados de adiponectina (Tabela 2).

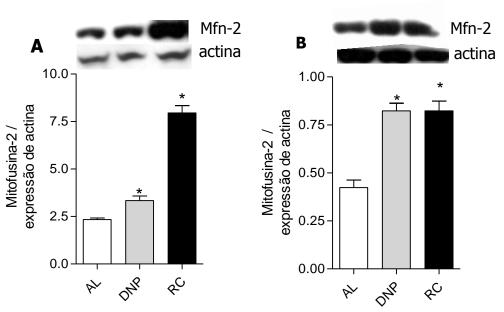


Figura 5. DNP e RC aumentam a expressão de mitofusinas em tecido adiposo viceral e músculo esquelético. Após 6 meses de tratamento com dinitrofenol (DNP) adicionado à água (1 mg . mL⁻¹) ou restrição calórica (RC) de 40% os camundongos foram sacrificados após jejum de 12 h. Os tecidos foram dissecados e os homogenatos submetidos à eletroforese e posterior avaliação da expressão de Mitofusina-2 em (A) tecido adiposo visceral e (B) músculo esquelético *p < 0,005 em relação ao grupo AL.

Tabela 2. Alterações sorológicas da RC em ratos *Sprague-Dawley* machos após 8 meses de intervenção.

Componente do soro	CR vs. AL Média ± (DP)	Р
Glicose (mg . dL ⁻¹)	85.8 (3.7) <i>vs.</i> 115.1 (6.6)	0.0008
Insulina (ng . mL ⁻¹)	0.58 (0.29) vs. 1.98 (0.85)	< 0.0001
Grelina (expressão por WB)	Aumento de 10 x (1.2)	< 0.0001
Adiponectina (expressão por WB)	Aumento de 3 x (0.67)	< 0.0001
Triglicérides (mg . dL ⁻¹)	108.9 (52.5) vs. 159 (20.9)	0.1356
HDL (mg . dL ⁻¹)	34.4 (8.6) vs. 36.6 (9.8)	0.607
Colesterol total (mg . dL ⁻¹)	102.4 (17.6) vs. 98.5 (15)	0.3417

Os valores de NO₂ nos meios de cultura das células VSMC nos quais o soro fetal bovino foi substituído por soro de ratos calóricamente-restritos (RC) foram significamente superiores aos verificados nos meios de cultura cujo soro usado foi o dos ratos alimentados *ad libitum* (AL) (Figura 6A). Estes achados foram condizentes com os aumentos significativos na expressão das enzimas eNOS e nNOS e na fosforilação da eNOS^{Ser1177} após a troca do meio AL, no qual as células estavam adaptadas há pelo menos 1 passagem, pelo soro RC (Figura 6B e C). O meio acrescido do soro RC, comparado ao soro AL, elevou consideravelmente a fosforilação das tirosinas do receptor de insulina (Figura 7A) e, também, verificouse umaumento tem dependente na fosforilação de Akt (serina 473) após a troca do meio AL por RC (Figura 6).

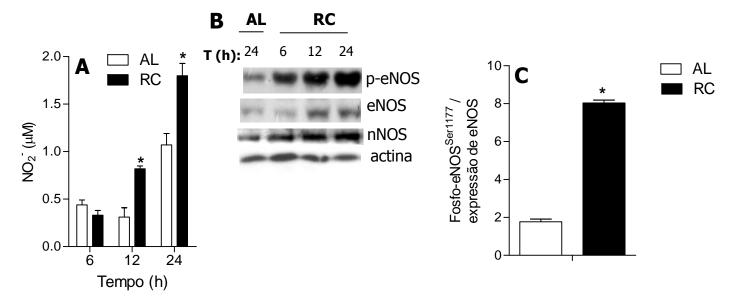


Figura 6. Soro de ratos caloricamente restritos aumenta a sinalização por 'NO em VSMC. (A) Acúmulo de NO₂⁻ em meio de cultura após 24 h da troca do meio. Os níveis de NO₂⁻ dos meios de cultura preparados com o soro dos ratos em restrição calórica (RC) ou alimentados ad libitum (AL) foram descontados dos valores obtidos após o cultivo celular. (B) *Western Blot* de nNOS e eNOS total e p-eNOS (Serina¹¹⁷⁷) antes e depois da troca do meio AL por RC Após a troca do meio AL por RC, obteve-se homogenatos para *Western Blot* em diferentes tempos (T), de 6 a 24h. (C) Razão entre fosfo-eNOS^{Ser1177} e eNOS nas células cultivadas por 24 h com o soro AL ou RC. * p < 0.05.

O meio acrescido do soro RC, comparado ao soro AL, elevou consideravelmente a fosforilação das tirosinas do receptor de insulina (Figura 7 A) e, também, verificou-se um aumento tempo-dependente na fosforilação de Akt (Serina 473) após a troca do meio AL por RC (Figura 7 B).

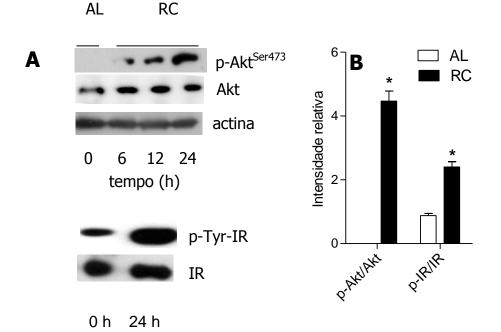


Figura 7. O soro de ratos caloricamente restritos eleva a fosforilação dos receptores de insulina e de Akt em VSMC. (A) *Western Blot* da Akt e fosfo-Akt (Ser473), e dos receptores de insulina (IR) imunoprecipitados dos homogenatos obtidos de VSMC após a troca do meio preparado com o soro de ratos alimentados *ad libitum* (AL) pelo meio com o soro dos ratos em restrição calórica. (B) Razão entre fosfo-Akt^{Ser473} e Akt e IR e fosfo-Tyr-IR nas células cultivadas por 24 h com o soro AL ou RC. * p < 0.05.

O papel da maior atividade da via de sinalização de insulina na produção de *NO foi investigado inibindo-se esta via, por meio do uso de um inibidor de Akt, NTD. O uso de NTD reverteu os efeitos do soro RC no acúmulo de NO₂ no meio de cultura e maior atividade de eNOS (Figura 8A e B).

A contribuição dos elevados níveis de adiponectina presentes no soro RC para a maior sensibilidade à insulina conferida por este soro e, conseqüentemente, para a maior produção de *NO, foi investigada por meio da imunoprecipitação da adiponectina dos soros antes do uso destes na cultura de células. A imunoprecipitação foi eficiente, reduzindo a níveis quase indetectáveis por *Western Blot* os níveis de adiponectina em ambos os soros, AL e RC (Figura 9A). A deficiência de adiponectina reverteu os efeitos do soro RC na fosforilação do receptor de insulina e eNOS e no acúmulo de NO₂- no meio de cultura (Fugura 9B, C e D).

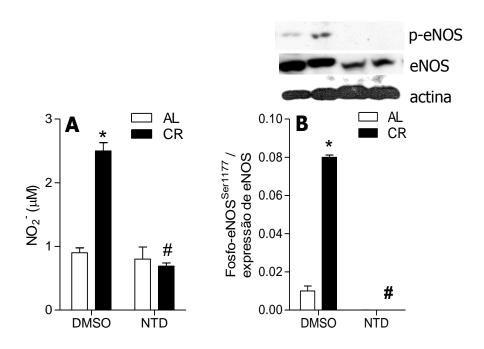


Figura 8. A inibição da Akt reverte os efeitos do soro dos ratos calóricamente restritos na produção de $^{\circ}$ NO. As células VSMC foram cultivadas por 24 h com meio de cultura acrescido de soro dos ratos alimentados *ad libitum* (AL) ou em restrição calórica de 40% (RC), na presença do inibidor de Akt, NTD 1 μ M, ou do veículo (DMSO, 0,001%). (A) Acúmulo de NO $_{2}^{-}$ em 24 h no meio de cultura de células cultivadas com o meio AL ou RC. Os níveis de NO $_{2}^{-}$ dos meios de cultura preparados com o soro dos ratos foram descontados dos valores obtidos após o cultivo celular. (B) *Western Blot* de eNOS total e sua forma fosforilada (Serina¹¹⁷⁷). * p < 0,05, RC versus AL; # p < 0,05, NTD versus DMSO.

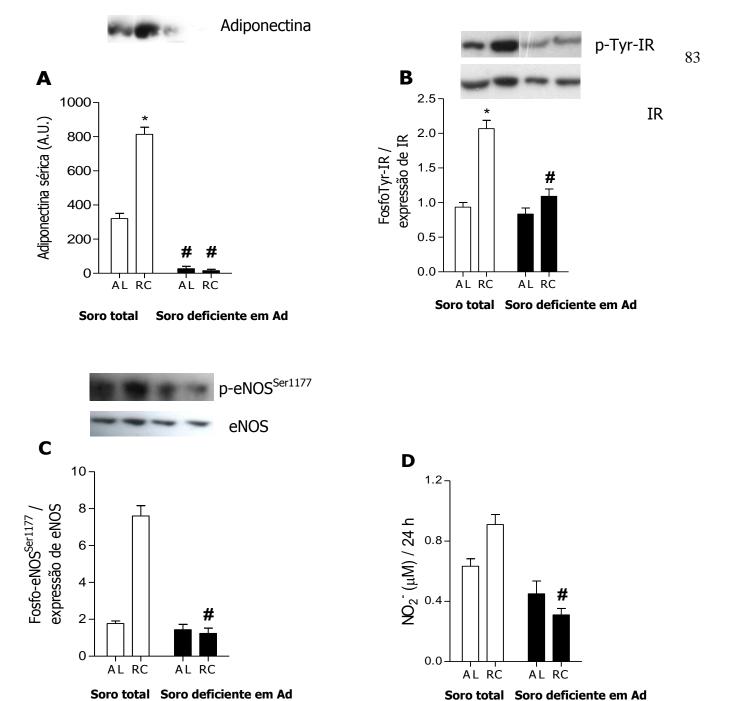


Figura 9. Adiponectina do soro RC promove fosforilação do receptor de insulina e da eNOS, resultando em liberação de *NO. (A) Níveis de adiponectina nos soros dos ratos alimentados ad libitum (AL) ou em restrição calórica de 40% (RC) antes e depois da imunoprecipitação da adiponectina. (B) Fosforilação de Tyr nos receptores de insulina (IR) imunoprecipitados de homogenatos das células VSMC cultivadas por 24 h na presença dos soros AL ou RC, com ou sem a imunoprecipitação da adiponectina (Ad). (C) *Western Blot* das formas total e fosforilada da eNOS de homogenatos das células VSMC cultivadas por 24 h na presença dos soros AL ou RC, com ou sem a imunoprecipitação da adiponectina (Ad). (D) Acúmulo de NO_2^- em 24 h no meio de cultura de células cultivadas com o meio AL ou RC, cou sem a imunoprecipitação da adiponectina. Os níveis de NO_2^- dos meios de cultura preparados com o soro dos ratos foram descontados dos valores obtidos após o cultivo celular. *p < 0.05 versus AL; *p < 0.05 versus soro total.

Os efeitos do soro RC na expressão de nNOS e sinalização por 'NO foram adicionalmente verificados em neurônios de células granulosas de cerebelo, pois estes apresentam apenas a isoforma neuronal dentre as NOS como fonte de 'NO (Contestabile, 2010), além de sobrevida limitada *in vitro*.

Assim como nas células VSMC, o soro RC aumentou consideravelmente a expressão de nNOS nos neurônios (Figura 10A), o que se refletiu no acúmulo de NO_2^- no meio de cultura (Figura 10B).

Os parâmetros de biogênese mitocondrial avaliados, expressão de citocromo c oxidase e atividade citrato sintase, demonstraram inequivocamente que o soro RC elevou a massa mitocondrial nos neurônios (Figura 11A e B).

O aumento na massa mitocondrial se refletiu na respiração celular, significativamente elevada nos neurônios cultivados com o soro RC, tanto em presença de glicose 10~mM como na presença do desacoplador mitocondrial FCCP, o que confirma a maior capacidade respiratória destes neurônios (Figura 11C). A respiração na presença do inibidor da ATP sintase, oligomicina, foi idêntica entre os neurônios dos grupos AL e RC. As taxas respiratórias na presença de FCCP normalizadas pelas taxas na presença de oligomicina (uma medida celular similar ao controle respiratório, o qual é empregado como índice de acoplamento mitocondrial), foram $4,0~\pm~0.41$ (RC) versus 2,2~0.06 (AL), indicando que neste modelo celular as alterações sorológicas promovidas pela RC resultam em maior acoplamento mitocondrial.

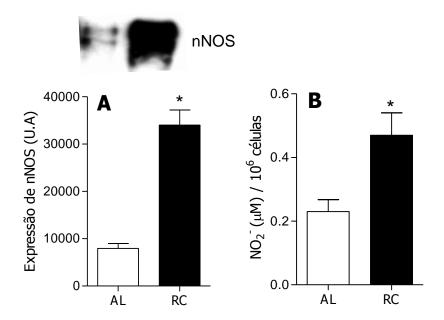


Figura 10. Soro de ratos caloricamente restritos aumenta expressão de nNOS e o acúmulo de NO2 no meio de cultura. Células granulosas de cerebelo obtidos de ratos *Sprague-Dawley* machos com 7 dias de vida foram cultivados por 24 h com 10% de soro obtidos de ratos alimentados *ad libitum* (AL) ou em restrição calórica (RC). Homogenatos celulares foram submetidos à eletroforese e posterior análise da (A) expressão de nNOS por meio de *Western Blot*. (B) O meio de cultura foi removido após 24 h da adição do meio de cultura com os soros dos ratos e foram usados para análise de NO2 no *NO analyzer*. * p < 0.05 versus AL.

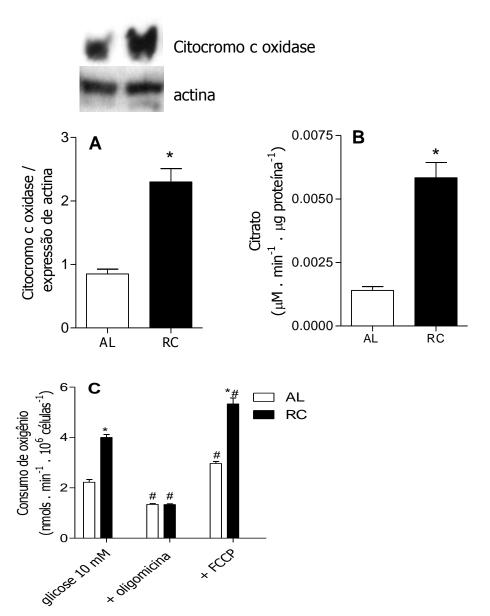


Figura 11. Soro de ratos caloricamente restritos aumenta a massa mitocondrial e respiração em células granulosas de cerebelo. Células granulosas de cerebelo obtidos de ratos *Sprague-Dawley* machos com 7 dias de vida foram cultivados por 24 h com 10% de soro obtidos de ratos alimentados *ad libitum* (AL) ou em restrição calórica (RC). Homogenatos celulares foram submetidos à eletroforese e posterior análise da (A) expressão de citocromo c oxidase por meio de *Western Blot* e (B) medida da atividade de citrato sintase. (C) 1 x 10⁶ células . mL⁻¹ foram usadas para medidas de consumo de oxigênio utilizando-se câmaras isoladas do detector de oxigênio Oroboros. Os neurônios foram ressuspendidos em PBS acrescido de glicose 10 mM e após 4 min de avaliação do consumo de O_2 , oligomicina (5 μM) e FCCP (2 μM) foram seqüencialmente adicionados em intervalos de 3 min. * p < 0.05 versus AL. * p < 0.05 versus PBS + glicose.

A importância da sinalização por *NO no aumento de biogênese mitocondrial e capacidade respiratória foi avaliada pelo uso de baixas doses do doador de *NO, SNAP, adicionado às culturas de neurônios cultivados com o soro AL. O uso de 10 nM de SNAP elevou a expressão de citocromo c oxidase e a atividade citrato sintase dos homogenatos (Figura 12A e B).

Assim como no cultivo celular com o soro RC, os efeitos de SNAP na massa mitocondrial refletiram em maior respiração em glicose 10 mM e em maior capacidade respiratória avaliada na presença do desacoplador mitocondrial FCCP (Figura 12C). Corrigindo-se as taxas respiratórias obtidas na presença de FCCP pelas obtidas na presença de oligomicina, obtém se as razões de 2.20 ± 0.06 (DMSO) e 1.90 ± 0.19 , (SNAP), indicando que SNAP não afetou o acoplamento mitocondrial.

As alterações promovidas pelo soro RC e mimetizadas pelo uso de um doador de *NO foram suficientes para prolongar a longevidade dos neurônios em cultura celular. Estes achados fortemente sugerem que a maior capacidade respiratória resultante da sinalização por *NO em ambos os modelos é importante o bastante para impactar positivamente a longevidade destes neurônios em condições normais de cultivo celular, não neurotóxicas (Figura 13A e B).

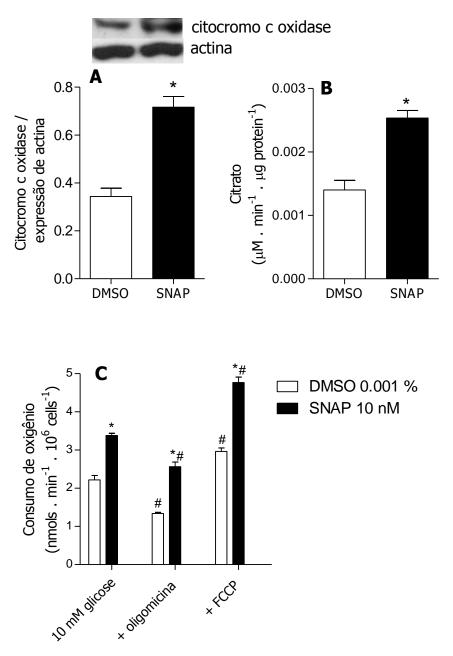


Figura 12. Doses baixas do doador de $^{\circ}$ NO, SNAP, mimetizaram os efeitos do soro de ratos caloricamente restritos na biogênese mitocondrial e respiração celular. Células granulosas de cerebelo obtidos de ratos Sprague-Dawley machos com 7 dias de vida foram cultivados por 24 h com 10% de soro obtidos de ratos alimentados *ad libitum* (AL) acrescido de DMSO (0,001%) ou SNAP (10 nM). Os homogenatos celulares foram submetidos à eletroforese para posterior avaliação da (A) expressão de citocromo c oxidase por meio de *Western Blot* e (B) atividade de citrato sintase em espectrofotômetro. (C) 1 x 10 6 células $^{\circ}$ mL $^{-1}$ foram usadas para medidas de consumo de oxigênio utilizando-se câmaras isoladas do detector de oxigênio Oroboros. Os neurônios foram ressuspendidos em PBS acrescido de glicose 10 mM e após 4 min de avaliação do consumo de O₂, oligomicina (5 μM) e FCCP (2 μM) foram seqüencialmente adicionados em intervalos de 3 min. * p < 0.05 versus AL. $^{\sharp}$ p < 0.05 versus PBS + glicose.

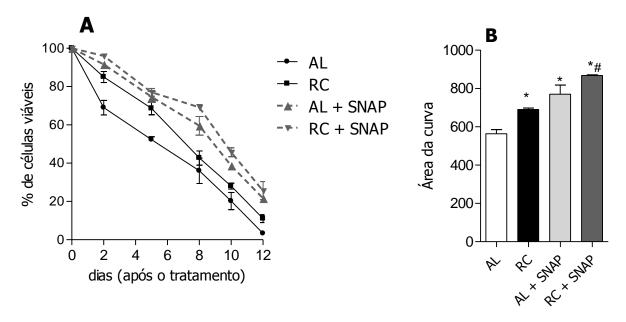


Figura 13. Soro de ratos caloricamente restritos prolonga longevidade de células granulosas de cerebelo em cultura e este efeito é mimetizado por baixas doses de SNAP. Células granulosas de cerebelo obtidos de ratos *Sprague-Dawley* machos com 7 dias de vida foram plaqueadas em poços de placas de 24 poços (1 x 10^5 células / poço) e mantidas por 3 dias em meio de cultura regular suplementado com o soro B-27 2% e Ara-C (1 μ M). Após o sétimo dia de cultura, substituiu-se o meio de cultura por um suplementado com 10% de soro de ratos alimentados *ad libitum* (AL) ou em restrição calórica (RC). Os grupos AL e RC foram divididos em 2 grupos, controle, no qual se adicionou DMSO (0,001%) ou SNAP (2 nM). A cada 2 dias as células foram fotografadas no campo branco do microscópio (Photometrics Cool) acoplado à câmera Snap HQ Roper Scientific, usando a lente de aumento de 20x, e contadas no programa Image J. *p < 0.05 vs. AL; *p < 0.05 vs. CR.

4.2.3 Efeitos do soro dos ratos caloricamente restritos em células INSI

As células INS1, ao contrário da maioria das células imortalizadas tumorais, usam predominantemente a respiração mitocondrial como fonte de ATP, o que é crucial para a função destas em secretar glicose. Por esta razão, estas células provenientes de insulinoma tornaram-se um modelo conveniente para o estudo da secreção de insulina (Sekine *et al.*, 1994) e foram usadas no presente trabalho para estudos dos efeitos das alterações sorológicas promovidas pela RC na massa mitocondrial e como isto afeta a função celular de células secretoras de insulina. Estes estudos foram realizados no laboratório do Dr. Orian Shirihai (Boston University).

Assim como as células granulosas de cerebelo, após 24 h de cultivo com o soro RC, as células INS1 apresentaram aumento na massa mitocondrial, avaliada por microscopia confocal e por expressão da proteína porina, localizada na membrana externa da mitocôndria (Figura 14A e B).

Nestas células também se avaliou a expressão de proteínas envolvidas na dinâmica e morfologia mitocondriais, DRP-1, OPA-1 e Mfn-2. Houve uma tendência no aumento da expressão das proteínas DRP-1 e OPA-1 em resposta ao soro RC, entretanto este aumento não foi significativo corrigindo-se pelo aumento da massa mitocondrial, realizado por meio da expressão de porina (Figura 15A, B). Verificouse um aumento significativo na expressão de Mfn-2, aproximadamente duas vezes superior ao aumento no número de mitocôndrias (Figura 15C). Vale salientar que esta diferença só foi observada em meio de cultura cuja concentração de glicose era 4 mM, mas não em 12 mM (dados não demonstrados), que é o usualmente empregado na cultura de células.

A maior expressão de Mfn-2 associou-se à alteração na morfologia destas organelas, que se apresentaram 6% mais alongadas e 10% mais ramificadas, de

acordo com os parâmetros *aspecto* e *forma fatorial*, respectivamente (Figura 15D e E).

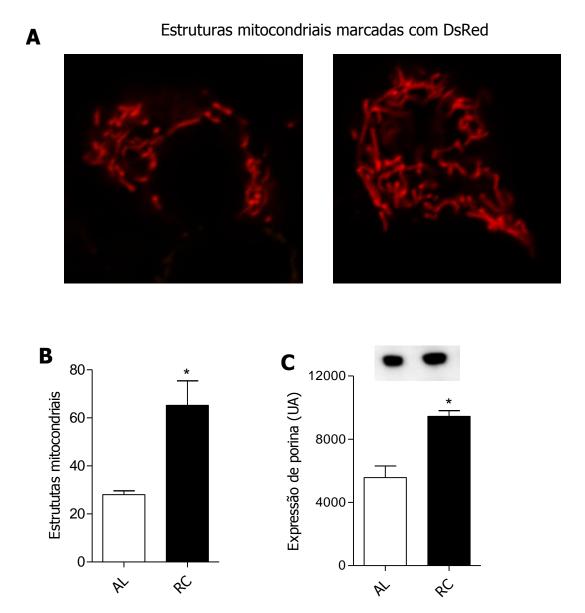


Figura 14. Soro de ratos caloricamente restritos aumentou a massa mitocondrial em células INS1. Células INS1 que expressam DsRed mitocondrial foram cultivadas por 24 h em meio de cultura acrescido de 10% de soro de ratos alimentados *ad libitum* (AL) ou em restrição calórica (RC). (A) estruturas mitocondriais fotografadas em microscópio confocal (Zeiss) utilizandose a lente de aumento de 100x. (B) redes mitocondriais identificadas em cada célula analisadas no Image J. (C) Expressão de porina por *Western Blot.* * p < 0.05 versus AL.

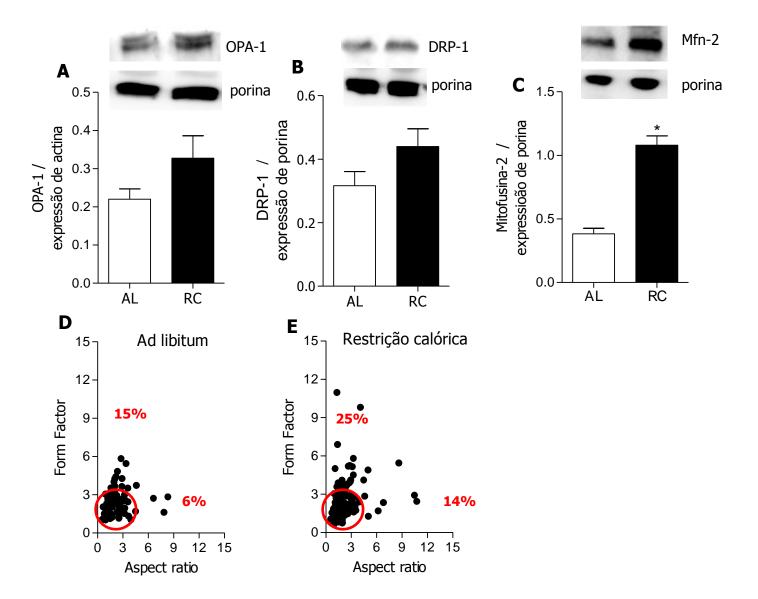


Figura 15. Soro de ratos caloricamente restritos promove maior expressão de mitofusina-2 e mudanças morfológicas em células **INS1.** Células INS1 cultivadas por 24 h em meio de cultura acrescido de 10% de soro de ratos alimentados ad libitum (AL) ou em restrição calórica (RC) foram lisadas e os homogenatos submetidos à eletroforese e posterior análise por Western Blot da (A) expressão de OPA-1; (B) DRP-1 e (C) Mfn-2. Os Westerns Blots foram corrigidos pela expressão de porina. * p < 0.05 versus AL. Células INS1 previamente infectadas com o vírus que permite a expressão de DsRed foram cultivadas em densidade de 2 x 10⁵ células / placa de petri para microscópio confocal e analisadas após 24 h em meio de cultura com glicose 4 mM acrescido de 10% de soro obtidos de ratos alimentados ad libitum (AL) ou em restrição calórica (RC) no microscópio confocal Zeiss, utilizando-se a função z-stack (5 níveis) e a lente de aumento de 100 x. Calculou-se a partir de 5 células do grupo AL (D) ou RC (E), a forma fatorial e aspecto, que são usados como parâmetros de ramificação e alongamento das estruturas mitocondriais, respectivamente. Estruturas mitocondriais cuja forma fatorial e aspecto foram maiores que 3 foram consideradas altamente ramificadas e alongadas, respectivamente.

A maior massa mitocondrial após o cultivo com o soro RC se refletiu na respiração celular, significativamente elevada em 2 e 12 mM de glicose, como também na presença de oligomicina (Figura 16A). Não foi possível estimar controle respiratório celular pois a respiração na presença de FCCP não foi mensurada acuradamente, mas nota-se que a respiração resistente à oligomicina é percentualmente maior no grupo RC, comparando-se com a respiração em 12 mM de glicose, sugerindo um maior desacoplamento mitocondrial (Figura 16 A).

O aumento no desacoplamento mitocondrial normalmente se associa à menor geração de EROs, que foi avaliada por meio da oxidação de DCF. O cultivo com o soro RC atenuou o aumento da fluorescência de DCF após a mudança na concentração de glicose de 2 para 12 mM, que foi de 2 vezes, alimentados AL, versus aproximadamente 4 vezes nas células cultivadas com o soro AL (Figura 16 B). Embora seja fato que o aumento de fluorescência não é linear ao aumento na geração de EROs, as diferenças foram significativas e sugerem para uma diferença no estado redox célula .

Normalmente maiores taxas respiratórias se associam à maior secreção de insulina em células beta. Contudo, os efeitos positivos da RC na capacidade respiratória não afetaram positivamente a secreção de insulina nas células INS1. Pelo contrário, a secreção de insulina estimulada por glicose ou glicose e KCl foi significativamente reduzida, comparada ao verificado nas células cultivadas com o soro dos ratos alimentados AL (Figura 17).

O nocaute da expressão de Mfn-2 aumentou a respiração mitocondrial em 12 mM de glicose em aproximadamente 2 vezes, em ambas as condições, AL e RC (Figura 18 A), contudo os valores de consumo de oxigênio em 2 mM de glicose e na presença de oligomicina não foram alterados, quando comparados com as células infectadas com o vírus vazio. Os valores do consumo de O₂ nos nocautes de Mfn-2 em ambos os grupos, AL e RC, foram similares aos verificados em células infectadas com o vírus vazio cultivadas com o soro RC, exceto no que diz respeito à respiração resistente à oligomicina. O nocaute de Mfn-2 reverteu os efeitos deste soro na respiração resistente à oligomicina, (Figura 18A).

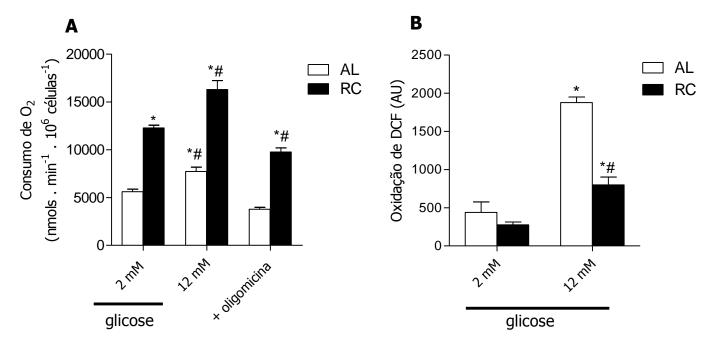
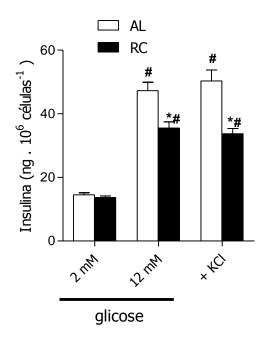


Figura 16. Soro de ratos caloricamente restritos aumenta a respiração e desacoplamento mitocondriais, com concomitante redução da oxidação de DCF em células INS1. Células INS1 foram cultivadas por 24 h com 10% de soro obtido de ratos alimentados *ad libitum* (AL) ou em restrição calórica (RC). (A) 1 x 10⁵ células . mL⁻¹ foram dispersas em placa de cultivo celular próprio para a detecção do consumo de O₂ no equipamento Seahorse XF24. O meio de cultura foi trocado 2 h antes do experimento por meio RPMI modificado (3 mM glicose, sem soro e bicarbonato de sódio). Por 30 min verificou-se a respiração das células nesta condição basal, e em seguida foram adicionados (concentração final) sequencialmente, em intervalos de 15 min, glicose (12 mM), oligomicina (0,5 μM), e antimicina (1 μ M). Os valores de consumo de O_2 na presença de antimicina foram descontados para o cálculo da respiração mitocondrial. (B) 1 x 10⁵ células. mL⁻¹ aderidas em poços de placas de 48 poços foram usadas para a análise de oxidação de DCF (10 µM) induzidas pela mudança na concentração de glicose 2 para 12 mM no tampão KRB. * p < 0,05 versus AL; *p < 0,05 versus tampão com glicose 2 mM.



17. Soro de ratos caloricamente reduz a restritos secreção de estimulada por glicose e KCl. Células INS1 foram cultivadas por 2 4h com 10% de soro obtidos de ratos alimentados ad libitum (AL) ou em restrição calórica (RC). 1 x 10⁵ células . mL⁻¹ aderidas em poços de placas de 48 poços foram usadas para a análise de secreção de insulina induzida pela mudança na concentração de glicose de 2 para 12 mM, ou 12 mM + KCl 30 mM no tampão KRB. Após 2 h de estimulação, os tampões foram recolhidos e usados para avaliação do teor de insulina por meio de radioimunoensaio. * p < 0,05 versus AL; *p < 0.05 versus tampão com glicose 2 mM.

O efeito do nocaute de Mfn-2 no acoplamento mitocondrial, que tornou-se percentualmente maior, pode justificar a maior oxidação de DCF nestas células (Figura 18B), uma vez que esta sonda fluorescente indica um possível aumento na quantidade intracelular de oxidantes.

O nocaute de Mfn-2 afetou a secreção de insulina apenas no grupo RC, cujas células passaram a secretar insulina nos mesmos níveis que as células do grupo AL (Figura 19).

Assim como a respiração mitocondrial e a oxidação de DCF são alteradas pela expressão de Mfn-2, é interessante mencionar que dados preliminares apontam para a regulação na expressão de Mfn-2 por níveis de glicose ou oxidantes (Figura 20A e B).

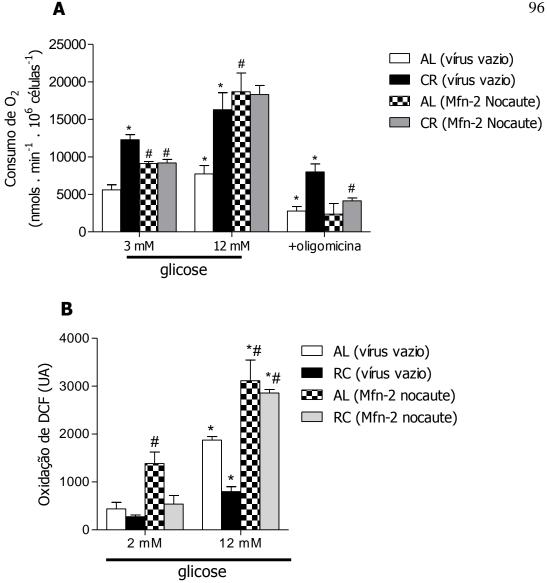


Figura 18. O nocaute de mitofusina-2 aumenta a respiração e a oxidação de DCF em 12 mM de glicose. Células INS1 previamente infectadas com o lentivírus vazio (controle) ou que expressa o RNA de interferência para mitofusina 2 (Mfn-2) foram cultivadas por 24 h com 10% de soro obtidos de ratos alimentados ad libitum (AL) ou em restrição calórica (RC). (A) 1 x 10⁵ células . mL⁻¹ aderidas em placa de cultivo celular próprio para a detecção do consumo de O₂ no equipamento Seahorse XF24 foram incubadas por 2 h antes do experimento em meio RPMI modificado (3 mM de glicose, sem soro e sem bicarbonato). Por 30 min verificou-se a respiração das células nesta condição basal, e em seguida foram adicionados sequencialmente, em intervalos de 15 min, glicose (12 mM); oligomicina (1 μM), e antimicina (0,5 μM). Os valores de consumo de O₂ na presença de antimicina foram descontados para o cálculo da respiração mitocondrial. (B) 1 x 10⁵ células . mL⁻¹ aderidas em poços de placas de 48 poços foram usadas para a análise da oxidaçãod e DCF induzida pela mudança na concentração de glicose 2 para 12 mM em tampão (Krebs), por meio da oxidação de DCF, * p < 0.05 versus AL; *p < 0.05 versus vírus vazio.

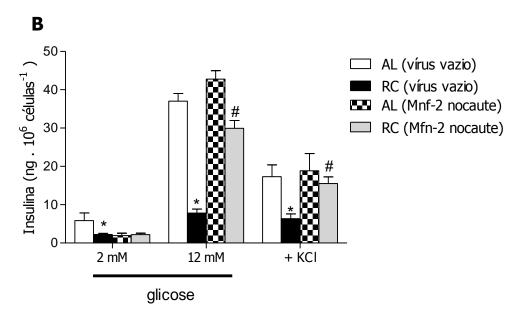


Figura 19. O nocaute de Mitofusina-2 reverte os efeitos do soro dos ratos caloricamente restritos na secreção de insulina. Células INS1 previamente infectadas com o lentivírus vazio (controle) ou que expressa o RNA de interferência para mitofusina 2 (Mfn-2) foram cultivadas por 24 h com 10% de soro obtidos de ratos alimentados ad libitum (AL) ou em restrição calórica (RC). 1 x 10⁵ células . mL⁻¹ aderidas em poços de placas de 48 poços foram usadas para a análise de secreção de insulina induzida pela mudança na concentração de glicose de 2 para 12 mM, ou para 12 mM + KCl 30 mM no tampão KRB. Após 2 h de estimulação, os tampões foram recolhidos e usados para avaliação do teor de insulina por meio da fluorescência dada pela conjugação da insulina com seu anticorpo * p < 0,05 versus AL; *p < 0,05 versus vírus vazio.

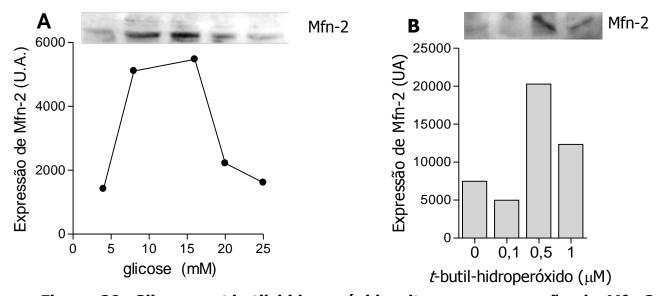


Figura 20. Glicose e *t***-butil hidroperóxido alteram a expressão de Mfn-2** *in vitro***.** Células INS1 cultivadas por 24 h em meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino (A) e diferentes concentrações de glicose (4-25 mM) ou (B) de t-butil-hidroperóxido (0 - 1 μ M em meio de cultura com 4 mM de glicose) foram lisadas e os homogenatos submetidos à eletroforese e posterior análise por *Western Blot* de mitofusina-2 (Mfn-2).

5 Discussão

Os estudos em camundongos *Swiss* fêmeas mostram que ambos, DNP e RC, elevam a fosforilação ativadora do resíduo de serina 473 da Akt em jejum em tecido adiposo visceral, músculo esquelético e cérebro (Figura 1), sugerindo que as modificações sorológicas promovidas por ambos os tratamentos, especialmente tangentes aos níveis de glicose e insulina (Boden *et al.*, 2005; Montagnani *et al.*, 2001), resultam em sensibilidade periférica aumentada à insulina nestes tecidos.

Em fígado e músculo cardíaco, DNP e RC tiveram efeitos nulos na fosforilação de basal da Akt (Figura 1). Estas respostas tecido-específicas podem refletir as diferenças nas atividades de enzimas fosfatases e quinases que ativam sítios inibitórios nas proteínas da via de sinalização por insulina, resultando na atenuação do estímulo inicial – ligação da insulina ao seu receptor (Di Guglielmo *et al.*, 1998; Saltiel & Kahn, 2001), e estudos adicionais são necessários para a elucidação destas diferenças.

A co-relação positiva entre as atividades de Akt e eNOS fortemente sugere a dependência da via de insulina para maior atividade de eNOS nestes modelos, provavelmente devido à habilidade da Akt em fosforilar diretamente a eNOS (Figura 1 e 2, Chen *et al.*, 2003) e ao fato de que a insulina é o mais provável indutor fisiológico desta NOS (Sobrevia *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2002; Symons *et al.*, 2009).

Os efeitos da via da sinalização de insulina na atividade de eNOS foram adicionalmente testados avaliando-se a fosforilação de Akt e eNOS no período pósprandial, o que pode ser considerado um controle positivo onde estimulou-se a via de sinalização por insulina com a alimentação e mensurou-se a fosforilação de ambas, Akt e eNOS.

É interessante notar que, comparados ao grupo AL, RC e DNP preveniram picos de fosforilação de Akt na maioria dos tecidos (Figura 1). A atenuação nas vias de sinalização por insulina é considerada uma estratégia para se prevenir

futuros quadros de insensibilidade a este hormônio (Howard & Flier, 2006; Rodgers *et al.*, 2011) e, neste contexto, prevenir grandes variações na atividade desta via pode ser um outro mecanismo pelo qual a RC mantém sua funcionalidade e a sensibilidade periférica à insulina durante o envelhecimento.

Esta possível atenuação na via de insulina no período pós-prandial se refletiu também na fosforilação da eNOS, que não correspondeu à fosforilação da Akt em muitos tecidos dos camundongos dos grupos DNP e RC, diferente do observado em jejum (Figura 2). Contudo, no grupo AL a fosforilação da eNOS também foi elevada em todos os tecidos, corroborando os achados *in vitro* dos efeitos da insulina na atividade de eNOS (Figura 2, Fisslthaler *et al.*, 2010; Ritchie *et al.*, 2010; Hartell *et al.*, 2005).

Os efeitos de RC e DNP na fosforilação basal da eNOS correlacionam-se com a massa mitocondrial nos tecidos destes camundongos (Figura 3), avaliada por atividade citrato sintase dos homogennatos (Civitarese *et al.*, 2007), reforçando a dependência de *NO para a biogênese mitocondrial, já demonstrada *in vivo* e *in vitro* (Nisoli *et al.*, 2003; Bodkin *et al.*, 1995).

O aumento na massa de mitocôndrias em músculo esquelético e tecido adiposo visceral foi adicionalmente confirmado pelas expressões de citocromo c oxidase e de PGC-1-alfa (Figura 4), um dos co-ativadores mestres deste processo, que e é estimulado por *NO, entre outros (Nisoli *et al.*, 2003; Nisoli *et al.*, 2005; Sidell & O`Brien, 2006).

Para se investigar os efeitos das alterações sorológicas promovidas pela RC na maior sensibilidade periférica à insulina, o soro dos ratos caloricamente restritos foi usado em células da musculatura vascular lisa (VSMC), cuja função de vasodilatação é estimulada por insulina em um mecanismo dependente de *NO (Sherrer *et al.*, 1994). O uso do soro de organismos em RC em cultura de células foi proposto por de Cabo *et al.* (2003) e é interessante pois demonstra que alterações hormonais podem induzir efeitos da RC, independente da oferta de nutrientes energéticos, considerando que a presença de glicose nos meios de cultura é elevada.

Após a troca do meio com o soro AL, no qual as células se adaptaram por 24 h, pelo meio com o soro RC, observou-se um aumento tempo-dependente na liberação de NO₂ no meio de cultura, indicando uma maior produção de *NO, acompanhada pelas maiores expressão de eNOS e nNOS, bem como maior fosforilação do resíduo de Serina 1177 da eNOS (Figura 6).

As fosforilações das tirosinas do receptor de insulina e da serina 473 da Akt foram elevadas após o tratamento com o soro RC (Figura 7) e ao inibir-se a Akt com NTD, um inibidor seletivo desta em baixas doses micromolares (Brazil & Hemmings, 2001), a fosforilação de eNOS estimulada pelo soro RC foi prevenida (Figura 8). Portanto, a maior sinalização da via de insulina é a ativadora de eNOS durante a RC neste modelo e a Akt, ao interagir com a eNOS (Dimmeler *et al.*, 1999), medeia este efeito.

Apesar dos reduzidos níveis de insulina nos soros dos ratos em RC, os níveis de adiponectina, um conhecido ativador do receptor de insulina (Stefan *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007) são elevados (tabela 2, Rogozina *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2007). A adiponectina foi previamente demonstrada ativar a eNOS via Akt (Motoshima *et al.*, 2004; , Xi *et al.*, 2005).

Para elucidar a contribuição da adiponectina do soro RC em mediar a maior atividade de eNOS, esta citocina foi imunoprecipitada dos soros antes do uso destes nas culturas celulares. Sua ausência no soro RC preveniu o aumento da atividade de eNOS e na liberação de NO₂ no meio de cultura, entretanto não afetou células cultivadas com o soro AL (Figura 9).

A partir dos dados obtidos nas células VSMC conclui-se que a adiponectina é um fator sorológico chave no aumento da disponibilidade de *NO durante a RC, apontando para esta citocina como uma possível reguladora fisiológica da biogênese mitocondrial, capaz de integrar a maior sensibilidade à insulina ao aumento de massa mitocondrial. Em suporte a esta premissa, outras intervenções que aumentam a biogênese mitocondrial, como exercício físico e resveratrol, também impactam positivamente os níveis de adiponectina circulantes, o que normalmente é associado à melhor sensibilidade periférica à insulina (Simpson &

Singh, 2008; Wang *et al.*, 2011). Interessantemente, a droga roziglitazona, usada no tratamento do diabetes, também aumenta a adiponectina circulante e resulta em maior biogênese mitocondrial em cérebros de pacientes com Alzheimer (Strum *et al.*, 2007).

Outro dado importante trazido pelo estudo nas células VSMC foi o efeito do soro RC em induzir a expressão da nNOS. Embora o aumento nos níveis de RNAm de nNOS em resposta à restrição dietética tenha sido demonstrado em cérebro de ratos submetidos à restrição dietética de 10 dias (Seidel *et al.*, 2006), os efeitos da RC na expressão de nNOS não foram descritos previamente e também parecem ser regulados por alterações sorológicas.

Para se avaliar os efeitos da RC na expressão da nNOS, e desta na biogênese mitocondrial, sem a sobreposição de efeitos oriundos da eNOS, o mesmo tratamento realizado nas VSMC foi repetido em neurônios de cerebelo, que expressam abundantemente a nNOS e, em contrapartida, não expressam a eNOS (Contestabile, 2010). Além desta vantagem, os neurônios, como células pósmitóticas, não se dividem em cultura, o que os tornam um modelo adequado para o estudo *in vitro* de senescência celular (Mattson *et al.*, 1992; Bambrick *et al.*, 1995).

O efeito do soro RC nos neurônios foi similar ao verificado nas VSCM, considerando-se a liberação de NO₂ e expressão de nNOS, consideravelmente aumentados comparados as células cultivadas com o soro dos ratos AL. A maior sinalização por *NO foi acompanhada de maiores biogênese e respiração mitocondriais (Figura 10 e 11).

Os efeitos do soro RC na massa e respiração mitocondrial foram reproduzidos por doses baixas do doador de *NO, SNAP (Figura 12), cujos efeitos no aumento da massa mitocondrial foram extensamente avaliados em células de tecido adiposo marrom, entre outras (Nisoli *et al.*; 1998; McConell *et al.*, 2008; Carew *et al.*, 2004; Nisoli *et al.*, 2003). Desta forma, os resultados apresentados indicam que a nNOS também tem sua expressão modulada por alterações hormonais e que durante a RC esta pode ser se tornar uma fonte significativa de

*NO no cérebro, o qual apresenta esta isoforma como a mais importante fonte de *NO (Martínez-Lazcano *et al.*, 2007).

Além da respiração basal, a respiração na presença do desacoplador mitocondrial FCCP foi consideravelmente elevada por RC e SNAP, indicando elevada capacidade respiratória máxima (Figuras 11 e 12). Recentemente, a importância de um elevado reservatório respiratório tem sido apontada como fator protetor em condições de estresse celular (Sansbury *et al.*, 2011; Dranka *et al.*, 2010), ao permitir elevadas taxas de fosforilação oxidativa em condições que demandam energia.

O aumento da capacidade respiratória máxima promovida pelo soro RC ou SNAP foi capaz de prolongar a longevidade dos neurônios em cultura (Figura 13). Essas células apresentam elevada demanda energética (revisado em Laughlin *et al.*, 1998), e sua maior sobrevivência *in vitro* correlaciona-se com resistência neural ao estresse e a estímulos degenerativos (Mattson *et al.*, 1992; Bambrick *et al.*, 1995). Recentemente foram identificados fungos cujas maiores longevidades espontâneas foram positivamente associadas ao conteúdo intracelular de °NO e à capacidade de transporte de elétrons mitocondrial (Li *et al.*, 2011^b), corroborando a idéia de que a maior capacidade respiratória pode aumentar a sobrevida em alguns tipos celulares.

Sabe-se que o 'NO, em elevadas doses, inibe a cadeia de transporte de elétrons e leva à fragmentação mitocondrial (Cho *et al.*, 2009). Também, o estresse nitrosativo é observado em doenças neurodegenerativas (Gu *et al.*, 2002; Knott *et al.*, 2009). Entretanto, as doses de SNAP usadas no presente trabalho foram 4-5 ordens de magnitude menores às usadas nos trabalhos em que se estudou o 'NO como agente neurotóxico em neurônios corticais (Yuan *et al.*, 2007) ou granulares (Fatokun *et al.*, 2008). Isto sugere que doses baixas de 'NO são neuroprotetoras, enquanto doses elevadas resultam em estresse oxidativo e nitrosativo, culminando em lesão celular. Também, níveis fisiológicos de 'NO são relacionados à neuromodulação, plasticidade sináptica e outros processos neurológicos fundamentais (Steinert *et al.*, 2010).

A maior biogênese mitocondrial desencadeada por adiponectina / *NO, pode ter conseqüências fisiológicas outras que vão além de aumentar a capacidade respiratória máxima. As células produtoras de insulina, por exemplo, usam a respiração mitocondrial majoritariamente como fonte de ATP. Estas células apresentam baixos níveis da enzima lactato desidrogenase (Dixit & Lazarow, 1964) e dos transportadores de lactato e piruvato (Best *et al.*, 1992), limitando o uso da glicólise.

Neste contexto, o estudo dos efeitos hormonais da RC na biogênese mitocondrial e secreção de insulina em células beta é interessante para se compreender a relação entre aumento de massa e função mitocondriais em um tipo celular que secreta insulina e, portanto, afeta diretamente a sensibilidade periférica a esta (Zhu *et al.*, 2004), regulando a biogênese mitocondrial estimulada por *NO via ativação das vias de insulina.

O soro RC aumentou a massa e respiração mitocondriais nas células INS1 (Figura 14 e 16), entretanto a secreção de insulina estimulada por glicose ou glicose e KCl foi inibida neste modelo (Figura 17). As prováveis razões que podem justificar este fato são a maior porcentagem de desacoplamento mitocondrial (Figura 16), que pode comprometer a síntese de ATP (Chan *et al.*, 2001); a geração reduzida de EROs (Figura 16), que são moléculas sinalizadoras importantes durante a secreção de insulina (Leloup *et al.*, 2009; Pi *et al.*, 2007) e a alteração na morfologia da mitocôndria (Figura 15, Anello *et al.*, 2005).

Dentre as proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial avaliadas, a Mfn-2 foi a única que apresentou significativo aumento de expressão após o cultivo com o soro RC (Figura 15), provavelmente por ser uma proteína cuja expressão também é estimulada por PGC-1-alfa (Cartoni *et al.*, 2005; Liesa *et al.*, 2008) e, portanto, por *NO (Nisoli *et al.*, 2003; Nisoli *et al.*, 2005). Vale lembrar que nos tecidos de camundongos *Swiss* fêmeas tratadas com DNP ou submetidas à RC, a expressão de mitofusinas também foi elevada naqueles cuja expressão e fosforilação de eNOS foram maiores (Figura 5).

Mitocôndrias fragmentadas são associadas à maior geração de EROs em resposta à hiperglicemia e a morfologia mitocondrial parece ser um evento *upstream* à geração de EROs, uma vez que ao se inibir a fissão mitocondrial, previne-se a geração de EROs em resposta à glicose (Yu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008).

Ao nocautear-se a Mfn-2 nas células INS1, verificou-se um considerável aumento na oxidação de DCF em resposta à glicose nas células cultivadas com o soro AL ou RC (Figura 18), sendo que este último grupo passou a secretar insulina em resposta à glicose ou glicose e KCl em níveis similares ao grupo AL (Figura 19). Curiosamente, o nocaute de Mfn-2 elevou a respiração mitocondrial em ambos os grupos, AL e RC, e a porcentagem de respiração desacoplada foi consideravelmente reduzida comparada às células infectadas com o vírus vazio (Figura 18), o que possivelmente explica o provável aumento nos níveis de EROs (Skulachev, 1998).

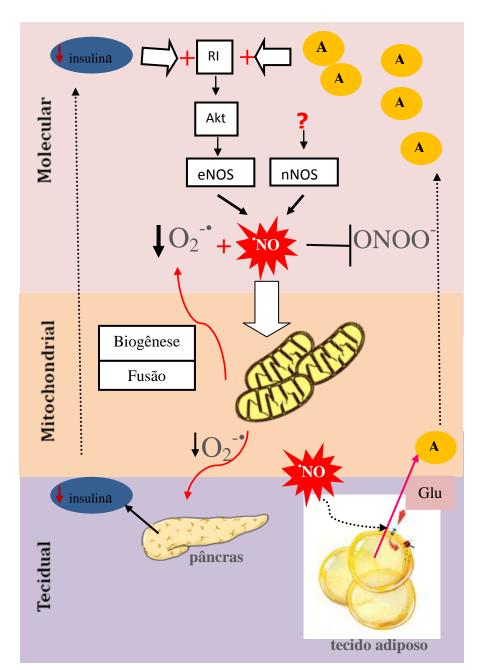
Esta é a primeira evidência de nosso conhecimento de que se os níveis de Mfn-2 regulam a secreção de insulina em células beta. Adicionalmente, este é um mecanismo que também explica a reduzida secreção de insulina em organismos em RC (Esquema 3). O aumento de Mfn-2 em células beta pode ser protetor contra hipersecreção de insulina durante a RC. Este possível efeito protetor da Mfn-2 também é sugerido pelo aumento de sua expressão em resposta à glicose ou agentes oxidantes (Figura 20).

A adiponectina sérica já foi demonstrada como capaz de aumentar a secreção de insulina em células beta (Winzell *et al.*, 2004) e a maior capacidade respiratória das células cultivadas em RC também poderia contribuir para este fenômeno. Contudo, em organismos sadios não é desejável que se hipersecrete insulina, o que poderia promover posterior intolerância periférica a este hormônio.

Finalmente, a maior disponibilidade de *NO nos organismos em RC não resulta em estresse nitrosativo, visto que nos organismos em RC verifica-se redução nos biomarcadores de lesões oxidativas, como já mencionado. Provavelmente, por ser pouco reativo, o *NO torna-se perigoso em situações que

também propiciam aumento de $O_2^{-\bullet}$, devido à formação de ONOO $^-$, agente altamente oxidante, como discutido na introdução, ou quando atinge doses suficientemente elevadas para se inibir a citocromo c oxidase, inibindo a cadeia de transporte de elétrons (Brown & Cooper, 1994).

A RC comprovadamente reduz a geração mitocondrial de $O_2^{-\bullet}$ em muitos modelos celulares e animais (Yu, 1996; Barja, 2002), como sugerido nos experimentos realizados nas células INS1 (Figura 18). O balanço entre $O_2^{-\bullet}$ e *NO na lesão de biomoléculas ficou bem exemplificado em um estudo do nosso grupo em que o jejum intermitente, protocolo usado como sinônimo de RC na literatura (definido na introdução) induziu à sinalização por *NO acompanhada por maior geração intracelular de H_2O_2 , indicativa de $O_2^{-\bullet}$. Após o jejum intermitente os ratos tornaram-se intolerantes à glicose, um efeito associado à nitração do IR. Em contrapartida, o grupo submetido à RC clássica (definida na introdução e descrita em material e métodos), apresentou maior sinalização por *NO, mas reduzida geração de H_2O_2 , e neste grupo observou-se maior sensibilidade à insulina, associada à menor nitração do IR (Cerqueira *et al.*, 2011^a). Portanto, o equilíbrio intracelular entre os diversos oxidantes parece ser mais benéfico para os efeitos da RC que a redução generalizada destas espécies (Esquema 3).



Esquema 3. A comunicação entre adiponectina, *NO e EROs na matutenção da sensibilidade à insulina e biogênese mitocondrial durante a RC. A maior sensibilidade à insulina conferida baixos por níveis circulantes de insulina e elevados níveis de adiponectina (A) eleva a sensiibilidade do receptor de insulina (RI), o que ativa a Akt, resultando na fosforilação da eNOS. A produção de óxido nítrico (*NO) aumenta a biogênese mitocondrial e afeta a morfologia desta organela, o que associa-se a reduzida produção de O2*, prevenindo a geração de peroxinitrito (ONOO) frente ao aumento de *NO intracelular. A reduzida geração de O₂ também pode afetar a secreção de insulina nas células beta. Portanto, em um ciclo vicioso, a maior sinalização por NO indiretamente afeta a sensibilidade à insulina, via produção de adiponectina ou alterações mitocondriais que regulam a secreção de insulina, mantendo maior sensibilidade periférica a este hormônio e, consequentemente, a maior atividade basal da eNOS.

6 CONCLUSÕES

- DNP e RC aumentam a sinalização por insulina e 'NO de forma tecidoespecífica in vivo;
- O aumento na biogênese mitocondrial in vivo ocorre apenas nos tecidos em que há maior sinalização de insulina e NO;
- As mudanças sorológicas promovidas pela RC induzem a síntese de 'NO in vitro, por um mecanismo mediado pela adiponectina e Akt;
- Além da eNOS, a nNOS é outra fonte de NO cuja expressão é regulada por RC;
- A maior sinalização por 'NO aumenta a capacidade respiratória máxima e longevidade em neurônios;
- Os efeitos da RC no acoplamento mitocondrial divergem de um tipo celular para outro;
- A RC aumenta a capacidade respiratória máxima e o desacoplamento mitocondrial em células beta;
- As alterações morfológicas promovidas pela RC em células INS1 foram associadas ao aumento na expressão de Mfn-2, que parece regular a secreção de insulina por um mecanismo desconhecido, mas acompanhado por alterações nos níveis intracelulares de espécies oxidantes.

7 Referências

Al-Regaiey KA, Masternak MM, Bonkowski MS, Panici JA, Kopchick JJ, Bartke A. Effects of caloric restriction and growth hormone resistance on insulin-related intermediates in the skeletal muscle. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 200762(1):18-26.

Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzo AM, Purrello F, Marchetti P. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. Diabetologia. 2005;48(2):282-289.

Avogaro A, de Kreutzenberg S, Fadini G. Insulin signaling and life span. Pflugers Arch. Pflugers Arch. 2010;459(2):301-14459.

Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. FASEB J. 2002;16(14):1879-1886.

Bambrick LL, Yarowsky PJ, Krueger BK. Glutamate as a hippocampal neuron survival factor: an inherited defect in the trisomy 16 mouse. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(21): 9692-9696.

Barja G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction, Ageing Res Rev. 2002;1(3) 397–411.

Barros MH, Bandy B, Tahara EB, Kowaltowski AJ. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2004;279(48):49883-49448.

Barzilai N, Gupta G. Revisiting the role of fat mass in the life extension induced by caloric restriction. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1999;54(3):B89-96.

Baylis C, Vallance P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine--what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? Curr Opin Nephrol Hypertens. 1998;7(1):59-62.

Best L, Trebilcock R, Tomlinson S. Lactate transport in insulin-secreting beta-cells: contrast between rat islets and HIT-T15 insulinoma cells. Mol Cell Endocrinol. 1992;86(1-2):49-56.

Biala A, Tauriainen E, Siltanen A, Shi J, Merasto S, Louhelainen M, Martonen E, Finckenberg P, Muller DN, Mervaala E. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis and ameliorates Ang II-induced cardiac remodeling in transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes. Blood Press. 2010;19(3):196-205.

Boden G, Sargrad K, Homko C, Mozzoli M, Stein TP. Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes. Ann Intern Med. 2005;142(6): 403-411.

Bodkin NL, Ortmeyer HK, Hansen BC. Long-term dietary restriction in olderaged rhesus monkeys: effects on insulin resistance. J Gerontol Biol Sci. 1995;50(3): B142–B147.

Bossy-Wetzel E, Lipton SA. Nitric oxide signaling regulates mitochondrial number and function. Cell Death Differ. 2003;10(7):757-760.

Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. Curr Opin Cell Biol. 2003;15(6):706-716.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-254.

Brand MD, Chien LF, Ainscow EK, Rolfe DF, Porter RK. The causes and functions of mitochondrial proton leak. Biochim Biophys Acta. 1994;1187(2):132-139.

Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. Free Radic Biol Med. 2004;37(6):755-767.

Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. Trends Biochem Sci. 2001;26(11):657-664.

Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. FEBS Lett. 1994;356(2-3):295-298.

Caldeira da Silva CC, Cerqueira FM, Barbosa LF, Medeiros MH, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. Aging Cell. 2008;7(4):552-560.

Carew JS, Nawrocki ST, Xu RH, Dunner K, McConkey DJ, Wierda WG, Keating MJ, Huang P. Increased mitochondrial biogenesis in primary leukemia cells: the role of endogenous nitric oxide and impact on sensitivity to fludarabine. Leukemia. 2004;18(12):1934-1940.

Cartoni R, Léger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Dériaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP. Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. J. Physiol. 2005;567(Pt 1):349-358.

Cerqueira FM, Kowaltowski AJ. Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. Ageing Res Rev. 2010;9(4):424-430.

Cerqueira FM, da Cunha FM, Caldeira da Silva CC, Chausse B, Romano RL, Garcia CC, Colepicolo P, Medeiros MH, Kowaltowski AJ. Long-term intermittent feeding, but not caloric restriction, leads to redox imbalance, insulin receptor nitration, and glucose intolerance. Free Radic Biol Med. 2011^a;51(7):1454-1460.

Cerqueira FM, Laurindo FR, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, akt and mitochondrial biogenesis. PLoS One. 2011^b;6(3):e18433.

Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsushima RG, Pennefather PS, Salapatek AM, Wheeler MB. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. Diabetes. 2001;50(6):1302-1310.

Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. J. Biol. Chem. 2003;278(45):45021–45026.

Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. Science 2009;324(5923): 102-105.

Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, Smith SR, Ravussin E; CALERIE Pennington Team. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. Plos Med. 2007;4(3):e76.

Colman RJ, Anderson RM. Nonhuman primate calorie restriction. Antioxid Redox Signal. 2011;14(2):229-239.

Contestabile A. Role of Nitric Oxide in Cerebellar Development and Function: Focus on Granule Neurons. Cerebellum. 2010 Nov.

Csiszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, Pearson K, de Cabo R, Pacher P, Zhang C, Ungvari Z. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;297(1):H13-20.

Cunningham BA, Deeney JT, Bliss CR, Corkey BE, Tornheim K. Glucose-induced oscillatory insulin secretion in perifused rat pancreatic islets and clonal beta-cells (HIT). Am J Physiol. 1996;271(4 Pt 1):E702-710.

Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals: I. General aspects. J Biol Chem. 1987 Jul;262(20):9895–9901.

De Cabo R, Fürer-Galbán S, Anson RM, Gilman C, Gorospe M, Lane MA An in vitro model of caloric restriction. Exp Gerontol. 2003;38(6):631-639.

De Giorgi F, Lartigue L, Ichas F. Electrical coupling and plasticity of the mitochondrial network. Cell Calcium. 2000;28(5-6):365-370.

Di Guglielmo GM, Drake PG, Baass PC, Authier F, Posner BI, Bergeron J. Insulin receptor internalization and signalling. Mol Cell Biochem. 1998;182(1-2):59-63.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature. 1999;399(6736):601-605.

Dixit PK, Lazarow A. Effect of alloxan on the lactic dehydrogenase (LDH) activity of the microdissected mammalian pancreatic islets. Metabolism. 1964;13:285-9.

Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. Free Radic Biol Med. 2010;48: 905-914.

Dunn SE, Kari FW, French J, Leininger JR, Travlos G, Wilson R, Barrett JC. Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. Cancer Res. 1997;57(21):4667-4672.

Fatokun AA, Stone TW, Smith RA. Prolonged exposures of cerebellar granule neurons to S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) induce neuronal damage independently of peroxynitrite. Brain Res. 2008;1230: 265-272.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000;408(6809):239-247.

FissIthaler B, Benzing T, Busse R, Fleming I. Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1. Nitric Oxide. 2003;8(4):253-261.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. Nature. 1999;399(6736):597-601.

Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. Circulation. 2002;105(12):1497-1502.

Garesse R, Vallejo CG. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. Gene. 2001;263(1-2):1-16.

Guarente L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? Cell. 2008;132(2):171-176.

Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. FASEB J. 2001;15(9):1589-1591.

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. 1995;41(12 Pt 2):1819-1828.

Hagopian K, Chen Y, Simmons Domer K, Soo Hoo R, Bentley T, McDonald RB, Ramsey JJ. Caloric restriction influences hydrogen peroxide generation in mitochondrial sub-populations from mouse liver. J Bioenerg Biomembr. 2011;43(3):227-236.

Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R. Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. Exp Gerontol. 2003;38(3):267-278.

Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. Cell. 2010;141(4):656-667.

Halliwell B., Gutteridge, JMC. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th edition. New York, Oxford University Press Inc, 2007.

Hardingham GE, Lipton SA. Regulation of neuronal oxidative and nitrosative stress by endogenous protective pathways and disease processes. Antioxid Redox Signal. 2011;14(8):1421-1444.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 1956;11(3):298-300.

Hartell NA, Archer HE, Bailey CJ. Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B. Biochem Pharmacol. 2005;69(5):781-790.

Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. Trends Endocrinol Metab. 2006;17(9):365-371.

Huang TT, Carlson EJ, Gillespie AM, Shi Y, Epstein CJ. Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2000;55(1):B5-9.

Hyde BB, Twig G, Shirihai OS. Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics. Semin Cell Dev Biol. 2010;21(6):575-581.

Ingram DK, Zhu M, Mamczarz J, Zou S, Lane MA, Roth GS, deCabo R. Calorie restriction mimetics: an emerging research field. Aging Cell. 2006;5(2):97-108.

Ingram DK, Roth GS. Glycolytic inhibition as a strategy for developing calorie restriction mimetics. Exp Gerontol. 2011;46(2-3):148-154.

Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. J Cell Biol. 1998;143(7):1883-1898.

Kalant N, Stewart J, Kaplan R. Effect of diet restriction on glucose metabolism and insulin responsiveness in aging rats. Mech Ageing Dev. 1988;46(1-3):89-104.

Karbowski M, Youle RJ. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. Cell Death Differ. 2003;10(8):870-880.

Kemnitz JW, Roecker EB, Weindruch R, Elson DF, Baum ST, Bergman RN. Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys. Am J Physiol. 1994;266(4 Pt 1):E540-547.

Kinzig KP, Hargrave SL, Tao EE. Central and peripheral effects of chronic food restriction and weight restoration in the rat. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009;296(2):E282-290.

Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Ricquier D. The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. Int J Biochem. 1991;23(9):791-801.

Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. Antioxid Redox Signal. 2009;11(3):541-554.

Lambert AJ, Merry BJ. Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;286(1):R71-79.

Lane MA, Ball SS, Ingram DK, Cutler RG, Engel J, Read V, Roth GS. Diet restriction in rhesus monkeys lowers fasting and glucose-stimulated glucoregulatory end points. Am J Physiol. 1995;268(5 Pt 1):E941-948.

Laughlin SB, de Ruyter van Steveninck RR, Anderson JC. The metabolic cost of neural information. Nat Neurosci. 1998;1(1):36-41.

Lee J, Yu BP, Herlihy JT. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. Free Radic Biol Med. 1999^a;26(3-4):260-265.

Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. Science. 1999^b Aug;285(5432):1390-1393.

Lee CK, Weindruch R, Prolla TA. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. Nat Genet. 2000 Jul;25(3):294-297.

Le Gouill E, Jimenez M, Binnert C, Jayet PY, Thalmann S, Nicod P, Scherrer U, Vollenweider P. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knockout mice have defective mitochondrial beta-oxidation. Diabetes. 2007;56(11):2690-2696.

Leloup C, Tourrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani AL, Ktorza A, Casteilla L, Pénicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. Diabetes. 2009;58(3):673-681.

Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. Cell Metab. 2011^a;13(4):376-388.

Li B, Skinner C, Castello PR, Kato M, Easlon E, Xie L, Li T, Lu SP, Wang C, Tsang F, Poyton RO, Lin SJ. Identification of potential calorie restriction-mimicking yeast mutants with increased mitochondrial respiratory chain and nitric oxide levels. J Aging Res. 2011^b;673185.

Liesa M, Borda-d'Agua B, Medina-Gómez G, Lelliott CJ, Paz JC, Rojo M, Palacín M, Vidal-Puig A, Zorzano A. Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1beta. PLoS One. 2008;3(10):e3613.

Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GR, Guarente L. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. Nature 2002;418(6895): 344-348.

Ling C, Poulsen P, Carlsson E, et al. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1alpha and PGC-1beta gene expression in twins. J Clin Invest. 2004;114(10):1518–1526.

López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, Cascajo MV, Allard J, Ingram DK, Navas P, de Cabo R. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(6):1768-1773.

Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature. 2000;404(6778):652-660.

Magwere T, West M, Riyahi K, Murphy MP, Smith RA, Partridge L. The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in Drosophila melanogaster. Mech Ageing Dev. 2006;127(4):356-370.

Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. 2000;21(3):361-370.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutation Res. 1999;424(1-2):83-95.

Martínez-Lazcano JC, Pérez-Severiano F, Escalante B, Ramírez-Emiliano J, Vergara P, González RO, Segovia J. Selective protection against oxidative damage in brain of mice with a targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. J Neurosci Res. 2007;85(7):1391-1402.

Martin B, Mattson MP, Maudsley S. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. Ageing Res Rev. 2006;5(3):332-353.

Masoro EJ, Yu BP, Bertrand HA. Action of food restriction in delaying the aging process. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79(13):4239-4241.

Masoro EJ, McCarter RJ, Katz MS, McMahan CA. Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. J Gerontol. 1992;47(6):B202-208.

Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. J Neurosci. 1992;12(2):376-389.

McCay CM. The effect of retarded growth upon the length of life and upon ultimate size. J Nutr. 1935;10:63–79.

McConell GK, Wadley GD. Potential role of nitric oxide in contraction-stimulated glucose uptake and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2008;35(12):1488-1492.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem. 1969;244(22):6049-6055.

Mello Filho AC, Meneghini R. In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. Biochim Biophys Acta. 1984;781(1-2):56-63.

Merry BJ. Oxidative stress and mitochondrial function with aging--the effects of calorie restriction. Aging Cell. 2004;3(1):7-12.

Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. Exp Gerontol. 1980;15(6):575-591

Minor RK, Allard JS, Younts CM, Ward TM, de Cabo R. Dietary interventions to extend life span and health span based on calorie restriction. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2010;65(7):695-703.

Molina AJ, Wikstrom JD, Stiles L, Las G, Mohamed H, Elorza A, Walzer G, Twig G, Katz S, Corkey BE, Shirihai OS. Mitochondrial networking protects betacells from nutrient-induced apoptosis. Diabetes. 2009;58(10):2303-15.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev. 1991;43(2):109-142.

Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, Spiegelman BM. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. Mol Cell. 2000;6(2):307-316.

Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca2+ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). J Biol Chem. 2011;276(32): 30392-30398.

Moore T, Checkley LA, Digiovanni J. Dietary energy balance modulation of epithelial carcinogenesis: a role for IGF-1 receptor signaling and crosstalk. Ann N Y Acad Sci. 2011;1229(1):7-17.

Müller-Höcker J, Pongratz D, Hübner G. Activation of mitochondrial ATPase as evidence of loosely coupled oxidative phosphorylation in various skeletal muscle

disorders. A histochemical fine-structural study. J Neurol Sci. 1986;74(2-3):199-213.

Navarro, A., Boveris, A.,. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2007;292(2):C670–C686.

Nisoli E, Clementi E, Tonello C, Sciorati C, Briscini L, Carruba MO. Effects of nitric oxide on proliferation and differentiation of rat brown adipocytes in primary cultures. Br J Pharmacol. 1998;125(4):888-894.

Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. Science. 2005;310(5746):314-317.

Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. Science. 2003;299(5608):896-899.

Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, Pisconti A, Brunelli S, Cardile A, Francolini M, Cantoni O, Carruba MO, Moncada S, Clementi E. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(47):16507-16512.

Omodei D, Fontana L. Calorie restriction and prevention of age-associated chronic disease. FEBS Lett. 2011;585(11):1537-1542.

Orr WC, Mockett RJ, Benes JJ, Sohal RS. Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in Drosophila melanogaster. J Biol Chem. 2003;278(29):26418-26422.

Pamplona R, Barja G. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. Biochim Biophys Acta. 2006;1757(5-6):496-508.

Partridge L, Gems D. Mechanisms of ageing: public or private? Nat Rev Genet. 2002;3(3):165-175.

Pearl R. The Rate of Living. University of London Press, London, 1928.

Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. Cell Metab. 2008;8(2):157-168.

Pérez VI, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y, Richardson A. Is the oxidative stress theory of aging dead? Biochim Biophys Acta. 2009;1790(10):1005-1014.

Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. Science. 2003;300(5622):1140-1442.

Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. Diabetes. 2007;56(7):1783-1791.

Pugh TD, Klopp RG, Weindruch R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys. Neurobiol Aging. 1999;20(2):157-165.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell. 1998;92(6):829-839.

Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM. Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. Science. 1999;286(5443):1368-1371.

Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev. 2003;24(1):78-90.

Ramsey JJ, Hagopian K, Kenny TM, Koomson EK, Bevilacqua L, Weindruch R, Harper ME. Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004;286(1):E31-40.

Reynolds JD, Zeballos GA, Penning DH, Kimura KA, Atkins B, Brien JF. Nitrate and nitrite anion concentration in the intact cerebral cortex of preterm and nearterm fetal sheep: indirect index of in vivo nitric oxide formation. J Pharmacol Toxicol Methods. 1998;39(3):125-128.

Ritchie SA, Kohlhaas CF, Boyd AR, Yalla KC, Walsh K, Connell JM, Salt IP. Insulin-stimulated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine-615 contributes to nitric oxide synthesis. Biochem J. 2010;426(1):85-90.

Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. Nature. 2005;434(7029):113-118.

Rodgers JT, Vogel RO, Puigserver P. Clk2 and B56 β mediate insulin-regulated assembly of the PP2A phosphatase holoenzyme complex on Akt. Mol Cell. 2011;41(4):471-479.

Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(45):15998-6003.

Rogozina OP, Bonorden MJ, Seppanen CN, Grande JP, Cleary MP. Effect of chronic and intermittent calorie restriction on serum adiponectin and leptin and mammary tumorigenesis. Cancer Prev Res (Phila). 2011;4(4):568-581.

Ronsein GE, de Oliveira MC, Medeiros MH, Miyamoto S, Di Mascio P. DNA strand breaks and base modifications induced by cholesterol hydroperoxides. Free Radic Res. 2011;45(3):266-275.

Rooyackers OE, Kersten AH, Wagenmakers AJ. Mitochondrial protein content and in vivo synthesis rates in skeletal muscle from critically ill rats. Clin Sci (Lond). 1996;91(4):475-481.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 2001;414(6865):799-806.

Samorajski T, Delaney C, Durham L, Ordy JM, Johnson JA, Dunlap WP.Effect of exercise on longevity, body weight, locomotor performance, and passive-avoidance memory of C57BL/6J mice. Neurobiol Aging. 1985;6(1):17-24.

Sansbury BE, Jones SP, Riggs DW, Darley-Usmar VM, Hill BG. Bioenergetic function in cardiovascular cells: the importance of the reserve capacity and its biological regulation. Chem Biol Interact. 2011;191(1-3):288-295.

Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. Biochim Biophys Acta. 2002;1576(1-2):1-14.

Scheckhuber CQ, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nyström T, Osiewacz HD. Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. Nat Cell Biol. 2007;9(1):99-105.

Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. J Clin Invest. 1994;94(6):2511-2515.

Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. Science. 2005;308(5730):1909-1911.

Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose restriction extends Caenorhabditis elegans life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. Cell Metab. 2007;6(4):280-293.

Seidel B, Bigl M, Franke H, Kittner H, Kiess W, Illes P, Krügel U. Expression of purinergic receptors in the hypothalamus of the rat is modified by reduced food availability. Brain Res. 2006;1089(1):143-52.

Sekine N, Cirulli V, Regazzi R, Brown LJ, Gine E, Tamarit-Rodriguez J, Girotti M, Marie S, MacDonald MJ, Wollheim CB. Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. J Biol Chem. 1994;269(7):4895-4902.

Selman C, Lingard S, Choudhury AI, Batterham RL, Claret M, Clements M, Ramadani F, Okkenhaug K, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Al-Qassab H, Speakman JR, Carmignac D, Robinson IC, Thornton JM, Gems D, Partridge L, Withers DJ. Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. FASEB J. 2008;22(3):807-818.

Seto NO, Hayashi S, Tener GM. Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase in Drosophila does not affect life-span. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(11):4270-4274.

Sharp ZD. Aging and TOR: interwoven in the fabric of life. Cell Mol Life Sci. 2011;68(4):587-597.

Sidell BD, O'Brien KM. When bad things happen to good fish: the loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes. J Exp Biol. 2006;209(Pt 10):1791-1802.

Silverstein RM. The determination of the molar extinction coefficient of reduced DTNB. Anal Biochem. 1975;63(1):281-282.

Simpson KA, Singh MA. Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. Obesity (Silver Spring). 2008;16(2):241-256.

Sinclair DA. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. Mech Ageing Dev. 2005;126(9):987-1002.

Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. Biochim Biophys Acta. 1998;1363(2):100-124.

Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. Trends Biochem Sci. 2001;26(1):23-29.

Sobrevia L, Nadal A, Yudilevich DL, Mann GE. Activation of L-arginine transport (system y+) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. J Physiol. 1996;490 (Pt 3):775-781.

Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science. 1996;273(5271):59-63.

Song W, Bossy B, Martin OJ, Hicks A, Lubitz S, Knott AB, Bossy-Wetzel E. Assessing mitochondrial morphology and dynamics using fluorescence wide-field microscopy and 3D image processing. Methods. 2008;46(4):295-303.

Spaulding CC, Walford RL, Effros RB. Calorie restriction inhibits the agerelated dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice. Mech Ageing Dev. 1997;93(1-3):87-94.

Speakman JR, Hambly C. Starving for life: what animal studies can and cannot tell us about the use of caloric restriction to prolong human lifespan. J Nutr. 2007;137(4):1078-1086.

Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JF, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA.Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. Diabetes. 2002;51(6):1884-1888.

Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. Neuroscientist. 2010;16(4):435-452.

Stiles L, Ferree A, Shirihai O. Mitochondrial dynamics and autophagy. In: Mitochondrial dynamics and neurodegeneration. New York: Spreinger. 259p.

Strum JC, Shehee R, Virley D, Richardson J, Mattie M, Selley P, Ghosh S, Nock C, Saunders A, Roses A. Rosiglitazone induces mitochondrial biogenesis in mouse brain. J Alzheimers Dis. 2007;11(1):45-51.

Symons JD, McMillin SL, Riehle C, Tanner J, Palionyte M, Hillas E, Jones D, Cooksey RC, Birnbaum MJ, McClain DA, Zhang QJ, Gale D, Wilson LJ, Abel ED. Contribution of insulin and Akt1 signaling to endothelial nitric oxide synthase in the regulation of endothelial function and blood pressure. Circ Res. 2009;104(9):1085-1094.

Tainter ML, Stockton AB, Cutting WC. "Use of dinitrophenol in obesity and related conditions: a progress report". J Am Med Assoc 1933;101:1472–1475.

Tainter, ML. Growth, life-span and food intake of white rats fed dinitrophenol throughout life. J. Pharmacol Exptl Therap. 1938;63:51-57.

Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. EMBO J. 2008;27(2):433-446.

Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. Cell Metab. 2006;3(5):333-341.

van den Dobbelsteen DJ, Nobel CS, Schlegel J, Cotgreave IA, Orrenius S, Slater AF. Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. J Biol Chem. 1996;271(26):15420-15427.

van Diepeningen AD, Slakhorst SM, Koopmanschap AB, Ikink GJ, Debets AJ, Hoekstra RF. Calorie restriction in the filamentous fungus Podospora anserina. Exp Gerontol. 2010;45(7-8):516-524.

Van Remmen H, Jones DP. Current thoughts on the role of mitochondria and free radicals in the biology of aging. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2009;64(2):171-174.

Varady KA, Hellerstein MK. Do calorie restriction or alternate-day fasting regimens modulate adipose tissue physiology in a way that reduces chronic disease risk? Nutr Rev. 2008;66(6):333-342.

Vorobjev IA, Zorov DB. Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum. FEBS Lett. 1983;163(2):311-314.

Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. Annu Rev Biochem. 1992;61:1175-1212.

Wang C, Mao X, Wang L, Liu M, Wetzel MD, Guan KL, Dong LQ, Liu F. Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1. J Biol Chem. 2007;282(11):7991-7996.

Wang ZQ, Bell-Farrow AD, Sonntag W, Cefalu WT. Effect of age and caloric restriction on insulin receptor binding and glucose transporter levels in aging rats. Exp Gerontol. 1997;32(6):671-684.

Wang A, Liu M, Liu X, Dong LQ, Glickman RD, Slaga TJ, Zhou Z, Liu F. Upregulation of adiponectin by resveratrol: the essential roles of the Akt/FOXO1 and AMP-activated protein kinase signaling pathways and DsbA-L. J Biol Chem. 2011;286(1):60-66.

Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, Li L, Longo VD. Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. PLoS Genet. 2008;4(1):e13.

Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA. Microarray profiling of gene expression in aging and its alteration by caloric restriction in mice. J Nutr. 2001;131(3):918S-923S.

Weiss EP, Fontana L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011;301(4):H1205-1219.

Westphal CH, Dipp MA, Guarente L. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? Trends Biochem Sci. 2007;32(12):555-560.

Wikstrom JD, Twig G, Shirihai OS. What can mitochondrial heterogeneity tell us about mitochondrial dynamics and autophagy? Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(10):1914-1927.

Winzell MS, Nogueiras R, Dieguez C, Ahrén B. Dual action of adiponectin on insulin secretion in insulin-resistant mice. Biochem Biophys Res Commun. 2004;321(1):154-160.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell. 1999;98(1):115-124.

Xi W, Satoh H, Kase H, Suzuki K, Hattori Y. Stimulated HSP90 binding to eNOS and activation of the PI3-Akt pathway contribute to globular adiponectin-induced NO production: vasorelaxation in response to globular adiponectin. Biochem Biophys Res Commun. 2005;332(1):200-205.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med. 2002;8(11):1288-1295.

Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. Free Radic Biol Med. 1996;21(5):651-668.

Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(8):2653-2658.

Yu T, Sheu SS, Robotham JL, Yoon Y. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. Cardiovasc Res. 2008;79(2):341-351.

Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Lipton SA, Ellisman M, Perkins GA, Bossy-Wetzel E. Mitochondrial fission is an upstream and required event for bax foci formation in response to nitric oxide in cortical neurons. Cell Death Differ. 2007;14(3):462-471.

Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. J Clin Invest. 1996;98(4):894-898.

Zhu M, Lee GD, Ding L, Hu J, Qiu G, de Cabo R, Bernier M, Ingram DK, Zou S. Adipogenic signaling in rat white adipose tissue: modulation by aging and calorie restriction. Exp Gerontol. 2007;42(8):733-744.

Zhu M, Miura J, Lu LX, Bernier M, DeCabo R, Lane MA, Roth GS, Ingram DK. Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: the potential for insulin sensitization. Exp Gerontol. 2004;39(7):1049-1059.

Anexo 1 – Súmula curricular

CURRICULUM VITAE

FERNANDA MENEZES CERQUEIRA

PERSONAL DATA

Name: Fernanda Menezes Cerqueira

Birth date: 07/31/1981 Nacionality: Brazil

Position: PhD student in Biochemistry

Business address: Av. Lineu Prestes, 748, Bloco 10 sup, sala 1066, Departamento de

Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil, 05508-

000.

EDUCATION

1999 - 2003 Undergraduate studies in Nutrition, School of Nutrition,

University of Goias, Goiania, Goias, Brazil

2004 – 2007 Master's Degree in Biochemistry, Chemistry Institute,

Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Supervisor: Dra. Ohara Augusto

"Some consequences of SOD1 and G93A mutant expression in neuroblastomas. Implications for amyotrophic lateral sclerosis

(ALS)"

2007 – current PhD in Biochemistry, Chemistry Institute, Universidade de São

Paulo, São Paulo, Brazil

Supervisor: Dr. Alicia J. Kowaltowski

Co-supervisor: Dr. Orian Shirihai

"Effects of calorie restriction and mild mitochondrial uncoupling

on mice metabolism and lifespan"

2011 – current PhD Exchange Program, Molecular Medicine Department,

Boston University Medical School, MA, USA

Supervisor: Dr. Orian Shirihai

"Calorie restriction effects on mitochondrial dynamics and

PUBLICATIONS

- Cerqueira FM, Cunha FM, Caldeira da Silva CC, Garcia CCM, Lahos R, Colepicolo P, Medeiros MHG, Kowaltowski AJ. Intermittent Feeding, but not Caloric Restriction, Leads to Redox Imbalance, Insulin Receptor Modification and Impaired Glucose Metabolism. 2011. Free Radicals in Biology and Medicine. In press.
- Cerqueira FM, Laurindo FRM, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, akt and mitochondrial biogenesis. PLoS One 2011; 6:e18433.
- Cerqueira FM*, Kowaltowski AJ. When Caloric Restriction becomes undernutrition:
 On the need for the standard protocols. Ageing research reviews 2010; 9:424-430.

 * correspondent author
- 4. Cunha FM, Caldeira da Silva CC, **Cerqueira FM**, Kowaltowski AJ. Mild Mitochondrial Uncoupling as a Therapeutic Strategy. *Current Drug Targets* 2011; 12:783-9.
- Cavalheiro RA, Marin RM, Rocco AS, Cerqueira FM, Caldeira da Silva CC, Kowaltowski AJ, Vercesi AE, Franchini GK, Castilho RF. Potent Cardioprotective Effect of the 4-Anilinoquinazoline Derivative PD153035: Involvement of Mitochondrial KATP Channel Activation. Plos One 2010; 5:e10666.
- Barbosa LF, Cerqueira FM, Macedo AFA, Garcia CCM, Angeli JPF, Shumacher I, Sogayar MC, Augusto O, Carrí MT, Mascio PD, Medeiros MHG. Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* 2010; 1802:462-471.
- **7.** Caldeira da Silva CC*, **Cerqueira FM***, Barbosa LF, Medeiros MHG, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell* 2008; 7:552-560. * **equal contribution**.
- 8. **Cerqueira FM**, Medeiros MHG, Augusto O. Dietetic oxidants: controversies and perspectives. *Química Nova* 2007; 30:441-449.
- Almeida FB, Cerqueira FM, Silva RN Ulhoa CJ, Lopes A. Mycoparasitims studies
 of Trichoderma harzianum strains against Rhizoctonia solani: evaluation of coiling
 hydrolitic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 2007 29:1189-1193.

HONORS AND AWARDS

- CAPES scholarship for PhD exchange program in a foreign country. The project is being developed at Boston University Medical School. Supervisor: Dr. Orian Shiriai.
- 2. Travel Award from the Society of Free Radical Biology and Medicine (SFRBM) To: 17th Annual Metting of SFRBM (2009), San Francisco, USA
- 3. Travel Award from the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM)
 - To: VI Meeting of SFRBM South American Group (2009), Santiago, Chile
- Travel Award from the Chemistry Institute, University of São Paulo, Brazil
 To: Keystone Symposia Metabolic pathways of longevity (2008), Copper Mountain,
 Colorado, USA
- 5. Travel Award from the Keystone Symposia
 - To: Keystone Symposia Metabolic pathways of longevity (2008), Copper Mountain, Colorado, USA
- Travel Award from the Chemistry Institute, University of São Paulo, Brazil
 To: Mutant SOD1 and familial ALS: from the molecule to man (2007), Milan, Italy
- 7. Travel Award from Mario Negri Institute di Ricerche Farmacologiche
 To: Mutant SOD1 and familial ALS: from the molecule to man (2007), Milan, Italy
- 8. Best undergraduate Poster, I Scientific Meeting of the Nutrition School, University of Goias (2001), Goiás, Brazil

SUBMITTED PAPERS

- 1. **Cerqueira FM**, Cunha FM, Branzinni L., Laurindo FRM, Kowaltowski AJ. Serum From Calorie-Restricted Rats Activates Vascular Cell eNOS Through Enhanced Insulin Signaling Mediated By Adiponectin. Submitted to Plos One.
- 2. **Cerqueira FM**, Laurindo FRM, Kowaltowski A. Calorie Restriction Increases Cerebral Mitochondrial Respiratory Capacity in an NO-Mediated Mechanism: Impact on Neuronal Survival. Submitted to Free Radicals in Biology and Medicine.

ORAL PRESENTATIONS IN CONFERENCES

2010 "Impact of Different Diets on Energy Metabolism, Redox State and Insulin Resistance". In: X Congress of the Biochemistry Department, Universidade de São Paulo.

2009 "The effect of Caloric restriction (CR) and mild mitochondrial uncoupling on mitochondrial plasticity is directly related to eNOS activity and inversely related to SOD2 expression" In: Free radical and antioxidants in Chile (Santiago, Chile).

2009 "Uso do desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenol (DNP) como mimético de restrição calórica (RC) em camundongos" In: I Graduate Meeting- IQ-USP (USP, São Paulo, Brazil)

2009 "Effects of CR and mild mitochondrial uncoupling on mitochondrial biogenesis and antioxidants enzymes expression" In: II Mito Meeting (Guapé-MG, Brazil)

2008 "Mild mitochondrial uncoupling increases life span and improves redox state in mice:

A new caloric restriction mimetic", In: Bari International Symposium on mitochondrial Physiology and

Pathology (Bari-Italy)

2008 "Mild mitochondrial uncoupling increases life span and improves redox state in mice:

A new caloric restriction mimetic", In: Keystone Symposia Metabolic pathways of longevity (Copper Montain-CO, USA).

2007 Consequências da expressão da SOD1 e sua mutante G93A em neuroblastomas.

Implicações para a Esclerose lateral amiotrófica, In: REDOXOMA (IUSP, São Paulo - Brazil)

SPECIFIC SKILLS

Laboratory

- Techniques for cells transfection and infection (immortalized and primary culture)
- Techniques for mitochondria isolation and respiration in tissues, cells or isolated mitochondria using Oroboros or Seahorse equipment;
- Techniques for cell culture and isolation of primary cells from brown adipocytes, neurons from cerebella and hippocampus, and mesenchymal aortic cells;
- Techniques for islets isolation;
- Animal manipulation. Rodents caloric restriction protocols;
- ⑤ Different enzymatic assays; fluorimetric assays; HPLC determinations; FACS analysis; Western Blot protein analysis; Immunoprecipitation.
- Onfocal microscopy: mitochondria dynamics; mitochondria morphology.

Stanguages

- Portuguese as mother tongue
- English

TRAINING COURSES

- Zeiss Confocal 10 h private course at Boston University April 2011.
- Separation Structure St

REFERENCES

Dr. Alicia J. Kowaltowski (PhD advisor)
 Associate Professor
 Departamento de Bioquímica, IQ, Universidade de São Paulo
 Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Cidade Universitária
 05508-900, São Paulo, SP, Brazil

Fax: +55 11 38155579 Phone: +55 11 30912922 alicia@iq.usp.br http://www.iq.usp.br/alicia/

2) Dr. Orian Shirihai (PhD co-advisor) Associate Professor Department of Medicine, Boston University 650, Albany Street, Room 847, Boston Phone: +00 617 638-7107

shirihai@bu.edu

http://www.shirihai-lab.org

3) Dr. Ohara Augusto (Master Degree advisor)
Departamento de Bioquímica, IQ, Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Cidade Universitária
05508-900, São Paulo, SP, Brazil
Phone: +55 11 30913873

oaugusto@iq.usp.br

http://www.iq.usp.br/oaugusto