

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

**PAPEL DA GLICOSE-6-FOSFATO-DESIDROGENASE E DA NADPH
OXIDASE NA MODULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉREBRO DE
RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HIPERGLICEMIA NEONATAL**

Andrea Pereira Rosa

Orientador
Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Porto Alegre, 2012

*Se alguém, já lhe deu a mão,
E não pediu mais nada em troca,
Pense bem, pois é um dia especial,
Eu sei, que não é sempre,
Que a gente encontra alguém
Que faça bem, e nos leve desse temporal
O amor é maior que tudo, do que todos até a dor
Se vai, quando o olhar é natural...*

Cidadão Quem, Um dia especial.

*Dedico este trabalho aos meus pais
e ao meu segundo pai Álvaro (“In memoriam”),
alicerces do meu caráter.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Severo Dutra Filho, meu pai da pesquisa por ter me aceitado neste grupo, por ter paciência de me orientar e acima de tudo pela amizade adquirida depois de quatro anos como orientada.

À minha amiga Alessandra de tanta afinidade e compreensão por me trazer a oportunidade de conhecer este grupo de pesquisa e conseqüentemente de estar realizando esse sonho de ser mestre em bioquímica. Obrigada pela amizade, compreensão, carinho e ajuda constante em qualquer hora e momento.

Às irmãs, confidentes e amigas preciosas Tarsila e Carol, minhas “xuxus” do coração, pela amizade, por estarem sempre ao meu lado compartilhando de todos os momentos, pelo estímulo constante, por alegrarem os meus dias e principalmente por me ajudarem sempre sem pedir nada em troca.

Além disso, aos colegas pós-graduandos do laboratório 34D, Tarsila, Carol, Priscila, Marcelo e Juliana pela incansável ajuda nos experimentos diariamente. Em colaboração com os excelentes bolsistas de iniciação científica Carlos, Giovana, Melaine, Bruna, Laila e Fernanda, todos fundamentais para a realização deste trabalho, obrigado por torná-lo muito mais divertido.

Aos colegas do laboratório 34, 36 e 38 em especial à Tanise, ao Rodrigo e à Denise, pela amizade, pela parceria em muitas disciplinas e pela boa companhia sempre.

A toda minha família, pelo carinho e apoio constantes. Em especial as minhas tias Fátima e Vânia, por me acolherem como filhas enquanto minha mãe está longe. À minha prima e afilhada Carolina pelo incentivo, positivismo e por torcer por mim sempre.

Ao Augusto, meu companheiro pra todas as horas, que acompanhou minha batalha de perto e por transformar os momentos mais difíceis em uma conquista de um belo sorriso. Obrigada pelo apoio e compreensão.

Aos meus irmãos, Bruno e Danielle por acompanharem meu esforço, por acreditarem em mim desde o início e por me ajudarem a conquistá-lo. Obrigada pelo apoio e pela torcida constante.

E em especial aos meus pais maravilhosos, minhas vidas, pela compreensão e incentivo, pelos exemplos de caráter, honestidade e força, e por terem me ensinado que sonhos foram feitos para serem realizados com muita batalha.

Ao CNPq, a FAPERGS e a PRONEX, pelo apoio financeiro.

Por último, mas não menos importante a Deus por me governar, guiar e orientar.

ÍNDICE

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11

PARTE I.

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 – Diabetes Neonatal.....	13
1.2 – Radicais Livres.....	19
1.3 – Sistema de Defesa Antioxidante.....	22
1.4 – Estresses Oxidativo.....	24
1.5 – Estresses Oxidativo e Hiperglicemia.....	25
2. OBJETIVOS.....	28

PARTE II.

3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS.....	30
3.1. Desenvolvimento do modelo de hiperglicemia neonatal.....	30
3.2. Artigo científico submetido.....	35
Neonatal hyperglycemia induces oxidative stress in rat brain: The role of pentose phosphate pathway enzymes and NADPH oxidase.	

PARTE III.

4. DISCUSSÃO.....	65
5. CONCLUSÃO.....	78
6. REFERÊNCIAS	79

RESUMO

A diabetes é um distúrbio endócrino do metabolismo dos carboidratos clinicamente caracterizado por hiperglicemia, resultante da incapacidade do organismo em secretar insulina, defeitos na sua ação ou ambos. Recentemente, as conseqüências neurológicas da diabetes no sistema nervoso central têm recebido maior atenção, entretanto os mecanismos pelos quais a hiperglicemia é capaz de danificar o tecido nervoso ainda permanecem pouco esclarecidos. Estudos recentes têm demonstrado que a hiperglicemia é capaz de induzir dano oxidativo em cérebro de ratos. Portanto, o presente trabalho objetivou produzir um modelo de hiperglicemia neonatal em ratos e investigar o papel do estresse oxidativo (EO) na neurotoxicidade da hiperglicemia neonatal. Para a indução do modelo de hiperglicemia neonatal foram utilizados ratos Wistar de 5 dias de vida que foram submetidos a administração intraperitoneal de 100 mg/Kg de peso corporal de estreptozotocina (STZ), sendo que 5 dias após a administração de STZ os animais foram sacrificados e a média glicêmica do grupo diabético (222 mg/dL) durante todo tratamento é 82% maior do que a média do grupo controle (121 mg/dL). Os efeitos da hiperglicemia neonatal induzida por STZ foram estudados sobre os seguintes parâmetros de EO em cérebro de ratos: as atividades das enzimas glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), 6-fosfogluconato-desidrogenase (6PGD) e NADPH oxidase (Nox); o conteúdo de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$); as atividades das principais enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSHPx) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Os ratos submetidos ao modelo de hiperglicemia neonatal apresentaram alto conteúdo de $O_2^{\bullet-}$ através da ativação da NADPH oxidase, possivelmente esta ativação dependa do NADPH derivado das enzimas G6PD e 6PGD. Além disso, o aumento dos níveis de $O_2^{\bullet-}$ pode ter promovido um efeito rebote de aumento das atividades das principais enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSHPx) e ter induzido a lipoperoxidação em cérebro de ratos. Portanto, esses resultados sugerem que o EO pode representar um mecanismo envolvido nos efeitos da hiperglicemia no sistema nervoso central de ratos neonatos. No entanto, outros estudos parecem ser necessários a fim

de melhor caracterizar o papel das espécies reativas na neurotoxicidade da hiperglicemia neonatal.

Palavras-Chave: hiperglicemia neonatal; estresse oxidativo; NADPH oxidase; glicose-6-fosfato-desidrogenase.

ABSTRACT

Diabetes is an endocrine disorder of carbohydrate metabolism characterized by hyperglycemia and is the result of body's inability to secrete insulin or a defect of insulin action or both. The neurological consequences of diabetes on the central nervous system have most recently been received greater attention, but the mechanisms by which hyperglycemia can cause brain damage remain poorly understood. Recent studies have shown that hyperglycemia induces oxidative damage in rat brain. Therefore, this study aimed to produce a model neonatal hyperglycemia and investigate the role of oxidative stress (OS) in the neurotoxicity of neonatal hyperglycemia. The neonatal hyperglycemia was induced by one intraperitoneal administration of 100 mg/ kg body weight of streptozotocin (STZ), 5 days after the STZ administration, the animals were killed and the glucose diabetic group mean (222 mg/dL) during all treatment was 82% higher than the control group mean (121 mg/dL). So, the effects of streptozotocin-induced neonatal hyperglycemia were studied on the following oxidative stress parameters from rat brain: the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) and NADPH oxidase (Nox), the content of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), the activities of the main antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSHPx), and thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS). Rats subjected to a model of neonatal hyperglycemia presented high content of $O_2^{\bullet-}$ through activation of NADPH oxidase and it is possible that this activation was dependent of G6PD- and 6PGD-derived NADPH. Also, increased levels on $O_2^{\bullet-}$ may have promoted a rebound effect, through to enhanced antioxidant enzymes activities (SOD, CAT and GSHPx) and led to lipid peroxidation in the brain. So, these results suggest that OS could represent a mechanism to understand the harmful effect of hyperglycemia on the central nervous system. However, further studies appear to be worthwhile in order to better characterize the role of reactive species in the neurotoxicity of neonatal hyperglycemia.

Keywords: neonatal hyperglycemia; oxidative stress; NADPH oxidase; glucose-6-phosphate-dehydrogenase.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
CAT	catalase
DN	diabetes neonatal
DNT	diabetes neonatal transitória
DNP	diabetes neonatal permanente
EO	estresse oxidativo
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
G6PD	glicose-6-fosfato-desidrogenase
6PGD	6-fosfogluconato-desidrogenase
GLUT2	proteína transportadora de glicose
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
SOD	superóxido dismutase
STZ	estreptozotocina
TBA-RS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secreção de insulina em relação ao canal de potássio.....	15
Figura 2. Mutações nos genes KCNJ11 e ABCC8 provocam a abertura dos canais de potássio e a insulina não é excretada.....	17
Figura 3: Efeito da administração i.p. de 55mg/Kg de peso corporal de STZ sobre a glicemia durante 4 dias. Resultados expressos em média \pm DP (n=4). *p<0,05. Não foram encontradas diferenças significativas com relação ao controle (teste t).....	30
Figura 4: Monitoramento glicêmico após injeção de glicose (6 mg/g de peso corporal) em ratos que receberam 55mg/Kg de STZ. Resultados expressos em média (n=3).....	31
Figura 5: Monitoramento da glicemia durante 5 dias de uma curva de dose de STZ. Resultados expressos em média \pm DP (n=3). ***p<0,001 diferenças em relação ao controle (Teste de Tukey).....	32
Figura 6. Resumo do modelo de hiperglicemia neonatal induzido por STZ.....	33
Figura 7: Monitoramento glicêmico diário durante todo tratamento em ratos que receberam 100 mg/Kg de STZ. Resultados expressos em média \pm EP (n=4)..	33
Figura 8: Efeito da administração i.p. de 100 mg/Kg de peso corporal de STZ sobre o peso corporal em ratos neonatos durante 5 dias. Os resultados são expressos em média \pm DP (n = 3). *** p <0.001 comparado ao grupo controle (Teste t).....	34
Figura 9. Produção de EROs pela cadeia mitocondrial de transporte de elétrons.....	74

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Diabetes Neonatal

Diabetes Neonatal (DN) é uma doença rara com incidência de aproximadamente 1:300.000 a 500.000 nascimentos no mundo (Aguilar-Bryan e Bryan, 2008), na qual devido à produção ou liberação inadequada de insulina a terapia exógena é requerida (Fosel, 1995; Polak e Cavé, 2007). Os níveis hiperglicêmicos desses pacientes podem normalizar espontaneamente caracterizando a Diabetes Neonatal Transitória (DNT) que abrange 50 a 60% dos casos de DN ou persistir para o resto da vida na Diabetes Neonatal Permanente (DNP) (Polak e Shield, 2004). Os pacientes com DN apresentam como principais sintomas na maioria dos casos: retardo no crescimento intrauterino, falha no desenvolvimento, baixo peso corporal, febre, desidratação e acidose com cetonúria (Fosel, 1995).

A DN é diagnosticada clinicamente pela presença de hiperglicemia antes dos seis primeiros meses de vida dos pacientes, sendo que o tempo de apresentação da hiperglicemia é variável. Um problema potencial de diagnóstico é a diferenciação entre a diabetes neonatal e a diabetes do tipo 1 com causa auto-imune (Aguilar-Bryan e Bryan, 2008). Vários estudos indicam que a maioria das causas de diabetes identificadas antes dos seis meses de idade são de origem monogênica (Flanagan et al., 2007; Shield et al., 1997) com nenhuma evidência de marcadores de destruição auto-imune das células beta (β) (Edghill et al., 2006; Gach et al., 2007).

Na última década houve uma explosão de trabalhos sobre a múltipla hereditariedade do tipo de diabetes não-imunológica diagnosticada antes dos 6 meses de vida, sendo que estes estudos tiveram como principal intuito aumentar a compreensão dos genes envolvidos em toda a cadeia de controle da homeostasia da glicose. Atualmente a DN está relacionada ao surgimento de mutações em genes envolvidos no desenvolvimento do pâncreas, na apoptose de células beta (β), no processamento da insulina e na regulação da liberação da insulina (Aguilar-Bryan e Bryan, 2008).

A etiologia desta doença é bastante heterogênea, portanto apenas as causas mais comuns de DN serão comentadas.

- Anomalias do braço longo do cromossomo 6

A maioria dos pacientes com DNT apresentam anormalidades no cromossomo 6q24, na qual três anormalidades foram encontradas: dissomia unipaternal do cromossomo 6, duplicação de herança paterna do braço longo do cromossomo 6 e defeitos de metilação (Temple et al., 1996). A duplicação é de herança paterna na DNT e acontece devido à “imprintings” (gene expresso apenas por um alelo, pois o outro é metilado e conseqüentemente torna-se inativo) que levam ao aumento da expressão do alelo paterno. Sugerem-se dois genes localizados no cromossomo 6 como candidatos a causa da doença: o gene que codifica o fator de crescimento ZAC, que regula o ciclo celular e apoptose, além do gene HYMAI de função ainda desconhecida (Arima et al., 2001).

- Mutações do canal de Potássio ATP-sensível

A fisiologia da liberação de insulina é observada na figura 1, onde a glicose entra na célula β através da ligação com a proteína transportadora de glicose (GLUT2), sendo então internalizada e fosforilada pela glicocinase, que a direciona para a via glicólítica, posteriormente para o ciclo do ácido tricarboxílico e finalmente, produzindo ATP (Glaser et al., 1998). O aumento da razão ATP/ADP intracelular leva ao fechamento do canal de potássio e à despolarização da membrana. O canal de cálcio sensível à voltagem então se abre e o influxo de cálcio promove a liberação dos grânulos de insulina (Greeley et al., 2010; Gurgel e Moises, 2008).

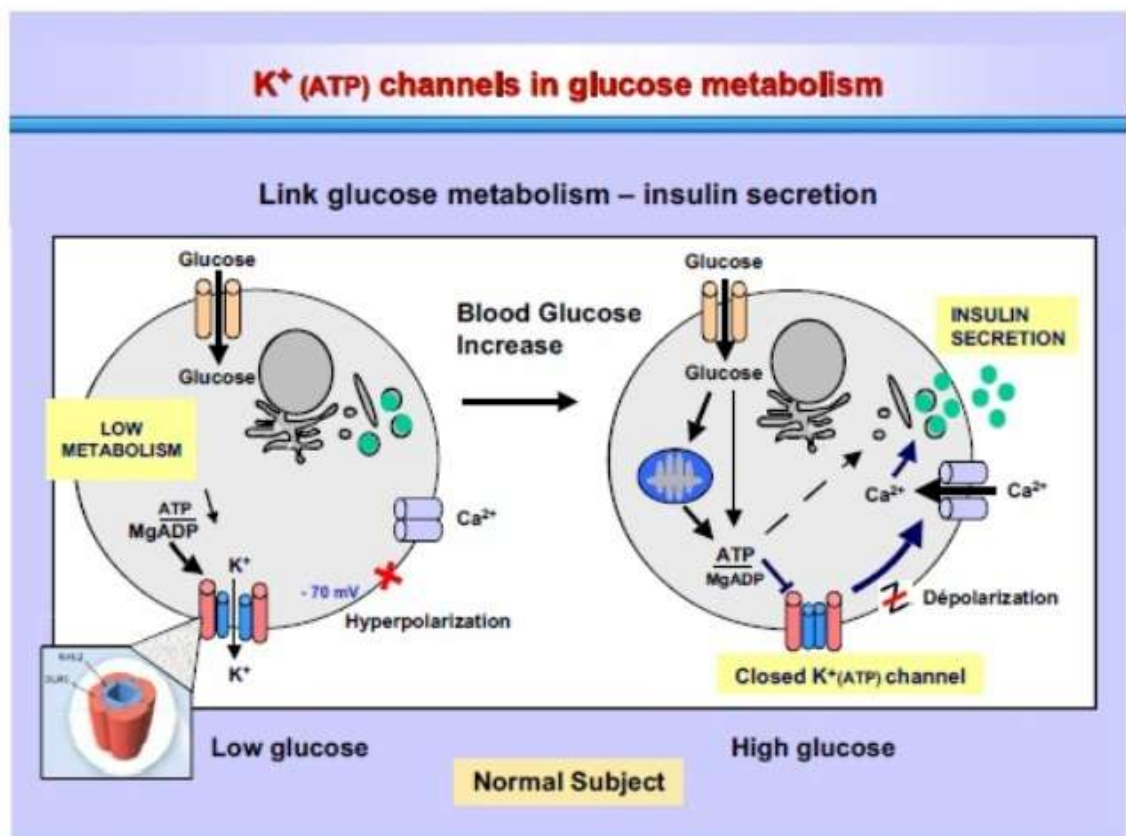


Figura 1: Secreção de insulina em relação ao canal de potássio (Adaptado de Flechtner et al., 2008).

Os canais de potássio ATP-sensível tem um papel importante na

atividade elétrica do metabolismo celular através da regulação do movimento de potássio através membrana. Estes canais são complexos octaméricos compostos por dois tipos de subunidades, quatro receptores regulatórios sulfonilurea (SUR) e quatro subunidades que formam o poro do canal (Kir) (Bryan et al., 2005). A subunidade SUR é codificada pelo gene ABCC8, estando presente na célula β pancreática e nos neurônios, já a subunidade Kir é codificada pelo gene KCNJ11 (Inagaki et al., 1995). Tanto a subunidade SUR quanto a Kir são vitais para a regulação adequada da secreção de insulina, já que fazem a ligação entre o metabolismo celular e a atividade elétrica da membrana plasmática (Gurgel e Moises, 2008).

Na DN ocorrem mutações no gene KCNJ11, sendo esta a causa mais comum de DNP (Sagen et al., 2004), e mutações no gene ABCC8 como a segunda causa mais comum de DNT (Vaxillaire et al., 2007). As mutações nestes dois genes provocam uma insensibilidade do canal de potássio aos altos níveis de ATP, ou seja, os canais de potássio não fecham e conseqüentemente a insulina não é secretada (figura 2) (Flechtner et al., 2008).

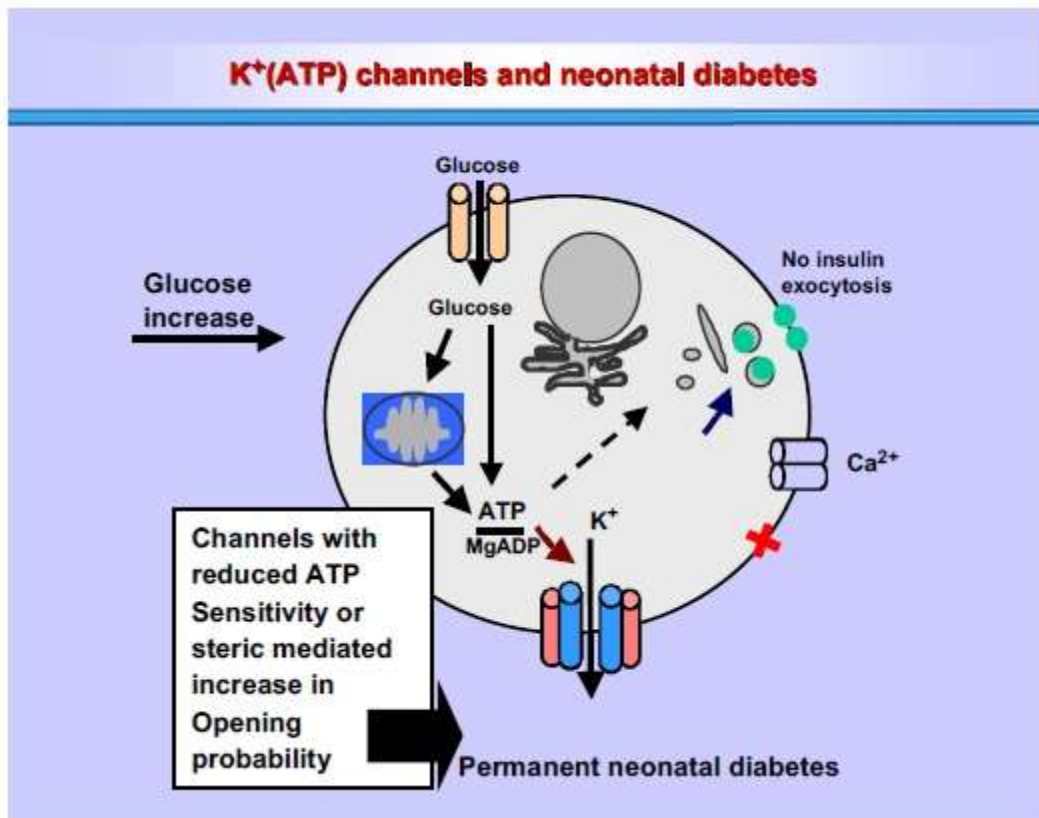


Figura 2: Mutações nos genes KCNJ11 e ABCC8 provocam a abertura dos canais de potássio e a insulina não é excretada (Adaptado de Flechtner et al, 2008).

- Mutações no gene da insulina

Estudos recentes apontam as mutações no gene da insulina como a segunda causa mais comum de DNP, após as mutações no gene KCNJ11. As mutações são localizadas em resíduos de aminoácidos que podem afetar potencialmente a clivagem e/ou dobramento de pré-pró-insulina e pró-insulina. O acúmulo da insulina dobrada inadequadamente poderia induzir um estresse prolongado ao retículo endoplasmático e a iniciação do processo de apoptose das células. Os pacientes com essas mutações apresentam cetoacidose, hiperglicemia (aproximadamente 650 mg/dL) e baixo peso ao nascimento. Todos esses sintomas resultam da falta de insulina, pois esta atua ainda no útero e nos primeiros meses de vida como um hormônio importante no desenvolvimento (Gurgel e Moises, 2008; Stoy et al., 2007).

- Mutações no gene da glicoquinase

A glicoquinase é uma enzima chave na regulação do metabolismo da glicose, pois funciona como um sensor da célula β pancreática ao nível de glicose sanguínea, que acaba por fim estimulando a liberação de insulina. São conhecidas aproximadamente 200 mutações do gene da glicoquinase, onde a maioria é heterozigota, que reduzem a entrada de glicose na rota glicolítica (Gloyn, 2003). Entretanto, existem mutações em homozigose sendo uma causa bastante rara e grave de DNP (Polak and Shield, 2004; Njolstad et al., 2001).

- Mutações no gene IPF-1 (insulin promoter factor 1)

O gene IPF-1 está envolvido no controle do desenvolvimento pancreático intrauterino e também na integridade funcional das células β pancreáticas. Mutações em homozigose ou heterozigose composta foram encontradas em portadores de DNP (Schwitzgebel et al., 2003).

Com relação ao tratamento destes pacientes na prática clínica, a insulina é a escolha imediata para o estabelecimento do controle metabólico na DN, pois é eficaz em todos os casos de déficit de insulina (Aguilar-Bryan e Bryan, 2008). Quando o diagnóstico é realizado antes dos seis meses de vida e o “screening” genético identifica mutações nos genes envolvidos com os canais de potássio ATP-sensíveis é possível utilizar uma estratégia terapêutica alternativa, o uso de sulfonilureas. As sulfonilureas, classe de drogas utilizadas no tratamento da diabetes tipo 2, causam o fechamento dos canais de K^+ ATP sensíveis por um mecanismo independente do ATP, portanto essa droga pode

ser utilizada no tratamento da DN causada por mutações nos canais de K⁺ ATP sensíveis (Flechtner et al., 2008). Em um estudo europeu foi possível a substituição de insulina por sulfonilureas em 90 % dos pacientes e em todas houve uma melhora do controle metabólico (Pearson et al., 2006). Além disso, agentes hipoglicemiantes orais (tolbutamida, glibenclamida e glicazida) apresentam uma alternativa substituindo o tratamento clássico de injeções de insulina (Aguilar-Bryan e Bryan, 2008; Metz et al., 2002).

Nas as últimas décadas, houve uma explosão de trabalhos na área pediátrica sobre a diabetes neonatal, estes analisam o perfil clínico, a etiologia e o tratamento a ser preconizado durante o diagnóstico da DN, entretanto, por se tratarem apenas de estudos clínicos se desconhecem os mecanismos responsáveis pelos efeitos deletérios da hiperglicemia neonatal sobre os órgãos dos pacientes neste período importante de desenvolvimento (Aguilar-Bryan e Bryan, 2008). Além disso, não existem estudos com modelos de hiperglicemia neonatal que mimetizem as condições encontradas no DN a fim de avaliar os mecanismos pelos quais a hiperglicemia danifica o SNC. Portanto, não existem estudos que correlacionem a hiperglicemia neonatal como contribuinte para os danos ao SNC devido ao aumento da produção de radicais livres.

1.2 – Radicais Livres

Um radical livre é qualquer espécie química que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, situação energeticamente instável, que confere alta reatividade a essas espécies (Halliwell e Gutteridge, 1999). Os radicais livres

podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical (Halliwell e Gutteridge, 2007). A presença de um único radical pode iniciar uma seqüência de reações em cadeia de transferência de elétrons, na qual um radical reativo pode levar à formação de um produto que também é um radical livre e que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical (Maxwell, 1995). As reações em cadeia são: reações de iniciação, ocorrendo à formação de um radical livre a partir de uma espécie química não-radical estável; reações de propagação, ocorrendo à formação de um radical livre que reage com uma molécula estável gerando outro radical; e reações de terminação, ocorrendo à formação de dois radicais livres que anulam seus elétrons desemparelhados formando um produto estável (Boveris, 1998).

Fisiologicamente, no metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, formando água (H_2O). A função da citocromo oxidase mitocondrial é a de acrescentar quatro elétrons em cada molécula de O_2 para gerar duas moléculas de H_2O (Bergendi et al., 1999). Todavia, cerca de 5% do O_2 utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido a água, sendo possivelmente convertido a intermediários reativos como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) hidroxila (OH^{\bullet}) e também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Boveris e Chance, 1973; Cohen, 1989).

Apesar de o ânion superóxido não poder atacar diretamente o DNA, lipídios e proteínas (Halliwell e Gutteridge, 1999), outras espécies reativas de

oxigênio são geradas rapidamente a partir desse precursor. A ação catalítica da enzima antioxidante superóxido dismutase promove a redução de duas moléculas de ânion superóxido a peróxido de hidrogênio por dismutação espontânea. Conseqüentemente, sempre que o peróxido de hidrogênio entrar em contato com íons Cu^{2+} ou Fe^{2+} serão gerados radicais hidroxila altamente reativos, capazes de atacar e danificar todas as biomoléculas (Halliwell, 2001). Além disso, a partir do ânion superóxido e do radical hidroxila também pode ser gerado o oxigênio singlet, que não é um radical livre, mas sim uma forma reativa do oxigênio capaz de oxidar diversas moléculas, como por exemplo, os lipídios de membrana, gerando hidroperóxidos lipídicos (Bergendi et al., 1999).

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 ($\text{O}_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet}), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (O_3) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito (ONOO^-) as principais representantes.

Espécies reativas estão presentes tanto em processos fisiológicos quanto em processos patológicos, mas a célula possui um sistema de defesa eficiente que é capaz de neutralizar naturalmente as espécies reativas formadas. Somente, um desequilíbrio entre os sistemas de formação e de remoção dessas espécies pode resultar em conseqüências patológicas, no qual essas espécies reativas podem oxidar moléculas biológicas incluindo

proteínas, lipídios e DNA (Maxwell, 1995).

1.4- Sistema de Defesa Antioxidante

Naturalmente o nosso organismo desenvolve mecanismos protetores contra o dano oxidativo induzido por radicais livres através de um sistema de defesa antioxidante, sendo classificado em enzimático e não-enzimático. Dentre as principais enzimas antioxidantes podemos citar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSHPx), que estão presentes no organismo em diferentes concentrações, dependendo do tecido em que se encontram. O tecido cerebral, por exemplo, contém níveis muito baixos de CAT, sendo então fundamental a presença de SOD e GSHPx em todas as regiões cerebrais (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A SOD catalisa a reação de dismutação de dois radicais superóxidos a peróxido de hidrogênio e oxigênio. Dessa forma, o papel biológico da SOD consiste em atuar como “scavenger” do íon superóxido (Fridovich, 1975) Halliwell e Gutteridge, 1999). Existem várias formas dessa metaloenzima, variando sua localização e o seu grupo prostético. A forma SOD cobre-zinco está presente principalmente no citosol de células eucarióticas, a SOD manganês na matriz mitocondrial, enquanto a SOD ferro está presente apenas em plantas e bactérias. Todas as formas, no entanto, catalisam a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ (íon superóxido), formando peróxido de hidrogênio e oxigênio (McCord and Fridovich, 1969; Halliwell e Gutteridge, 1999).

O peróxido de hidrogênio formado é degradado posteriormente pelas

enzimas CAT e GSHPx. A CAT irá catalisar diretamente a decomposição do H_2O_2 a oxigênio no estado fundamental, através da redução de uma molécula de H_2O_2 a H_2O e da oxidação de outra molécula a O_2 (Ferreira e Matsubara, 1997). A CAT de tecidos animais e vegetais está principalmente localizada em organelas subcelulares conhecidas como peroxissomas e em menor quantidade no citosol e mitocôndria (Marks et al., 1996; Ward e Peters, 1995).

A GSHPx atua removendo o H_2O_2 e outros peróxidos através do acoplamento de sua redução a H_2O com a concomitante oxidação da GSH. Existe uma GSHPx encontrada no citosol e na mitocôndria que requer selenocisteína como cofator, já a outra GSHPx existente localiza-se no citosol e é independente de selênio (Marks et al., 1996; Prohaska et al., 1977). A GSHPx atua dependendo da ação da enzima glutathione redutase (GR), que catalisa a redução de GSSG utilizando NADPH como coenzima (Marks et al., 1996).

Existe outra enzima antioxidante importante a glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), limitante da via das pentoses fosfato que converte glicose-6-fosfato (G6P) em 6-fosfogluconolactona e reduz NADP^+ a NADPH. O NADPH produzido é importante para fornecer uma proteção celular contra o estresse oxidativo por espécies reativas, pois detoxifica e regenera a forma reduzida da glutathione (GSH) através da GR (Frosali et al., 2004; Tsai et al., 1998).

As enzimas de defesa antioxidante atuam como um sistema

coordenado, balanceado, e operam juntamente com outros antioxidantes ditos não-enzimáticos (como o α -tocoferol, ácido ascórbico e glutathione) com o intuito de proteger o organismo dos danos celulares causados pelo estresse oxidativo. A GSH, um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol intracelular de baixo peso molecular presente na maioria das células. É um antioxidante endógeno que atua sinergicamente com o α -tocoferol e o ácido ascórbico, sendo fundamental para mantê-los nas suas formas reduzidas (Sies, 1999; Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.5 - Estresse Oxidativo

Em situações fisiológicas, a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio é em sua maior parte balanceada pelos sistemas de defesa antioxidante do organismo. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a defesa antioxidante presente na célula, levando a instalação do “estresse oxidativo” (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo pode ser resultado tanto da diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes (Halliwell, 2001; Salvador e Henriques, 2004). A presença de espécies reativas em excesso pode ocasionar uma inadequada oxidação de biomoléculas levando a um dano celular durante o estresse oxidativo, tendo como consequências: adaptação das células por up-regulation, injúria celular ou morte celular por apoptose ou necrose (Behl e Moosmann, 2002; Halliwell e Whiteman, 2004).

Sabe-se que o cérebro é um órgão particularmente suscetível ao estresse oxidativo quando comparado a outros tecidos, devido: ao seu elevado consumo de oxigênio; ao seu alto conteúdo de ferro, favorecendo a lipoperoxidação; ao seu alto conteúdo lipídico, principalmente lipídios de cadeias laterais altamente poliinsaturadas, que são extremamente suscetíveis à lipoperoxidação; e à sua pequena defesa antioxidante, sendo os níveis de CAT particularmente baixos em muitas regiões cerebrais (Halliwell, 1996) Halliwell e Gutteridge, 2007).

Diante destes fatores, sabe-se que o estresse oxidativo parece estar associado aos danos neurológicos de várias doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson, as escleroses múltiplas e demência, entre outras (Pitocco et al., 2010; Reznick e Packer, 1994) Halliwell e Gutteridge, 1999). Além disso, os radicais livres e o estresse oxidativo parecem estar associados à patogênese da diabetes, obesidade, câncer, envelhecimento, hipertensão e apoptose. No entanto, ainda persistem incertezas e controvérsias no que diz respeito ao estresse oxidativo ser a causa ou a consequência das doenças nas quais está envolvido (Halliwell, 1994).

1.6 - Estresse Oxidativo e Hiperglicemia

Recentemente, estudos têm demonstrado o envolvimento do estresse oxidativo nos mecanismos de danos moleculares e celulares aos tecidos em um amplo espectro de doenças humanas (Halliwell, 2001). Muitas evidências sugerem que o estresse oxidativo tem um papel fundamental na patogênese da

diabetes e suas complicações (Donne et al, 2006). Tem sido postulado que os pacientes e ratos diabéticos estariam mais suscetíveis ao estresse oxidativo, visto que a presença de hiperglicemia é capaz de promover um aumento na produção de radicais livres (Baynes, 1991; Baynes e Thorpe, 1999; Chang et al., 1993) e / ou um prejuízo nas defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1990; McLennan et al., 1991).

Várias hipóteses têm sido relatadas para explicar a elevação de radicais livres na diabetes, tais como a oxidação da glicose, a glicação não enzimática de proteínas, a ativação da proteína quinase C, a baixa concentração de antioxidantes nos tecidos e o comprometimento do sistema antioxidante enzimático (Baynes e Thorpe, 1999; Brownlee, 2001).

A hiperglicemia está presente em todas as formas de diabetes sendo um dos principais contribuintes para o estresse oxidativo, tanto através da geração direta de ROS quanto através da alteração no equilíbrio redox (Rains e Jain, 2011). Publicações recentes sugerem cinco principais mecanismos pelos quais a hiperglicemia induz estresse oxidativo no tecido vascular: fluxo aumentado de açúcares através da via poliol, formação intracelular aumentada de produtos de glicação avançada (AGEs), aumento da expressão do receptor para AGEs; ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e hiperatividade da via hexosamina (Giacco e Brownlee, 2010). Evidências convincentes levam à hipótese de que todos os mecanismos acima são ativados por um único evento anterior: a produção de superóxido aumentada (Giacco e Brownlee, 2010). O aumento de ânion superóxido pode ser mitocondrial (Brownlee, 2001) ou pela

NADPH oxidase (Serpillon et al., 2009).

A hiperglicemia presente na diabetes promove alterações no metabolismo do NADPH. Alterações provavelmente relacionadas com a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), enzima limitante da via das pentoses fosfato (PPP). Na fase oxidativa da via das pentoses fosfato, a G6PD produz NADPH, cofator essencial para a atividade das enzimas glutathione redutase e NADPH oxidases (Martins et al., 1986). Estudos recentes, utilizando um modelo de hiperglicemia grave, mostram o aumento na produção de ânion superóxido no miocárdio via NADPH oxidase. Sugere-se que o aumento da atividade da NADPH oxidase possa ser devido aos elevados níveis de NADPH derivados da atividade da G6PD (Gupte et al., 2005; Gupte et al., 2006; Serpillon et al., 2009).

Os mecanismos de dano cerebral nessa doença ainda permanecem desconhecidos, portanto, várias evidências baseadas em estudos recentes indicam que o dano oxidativo induzido pela hiperglicemia pode contribuir para danos ao sistema nervoso (Biessels et al., 2002). Espécies reativas geradas pela hiperglicemia podem danificar o sistema nervoso central pelo ataque a neurônios e células de Schwann, devido ao seu alto teor de lipídios poliinsaturados (Aragno et al., 2000; Kumar e Menon, 1993). É importante ressaltar que a maioria dos estudos encontrados mimetizam as condições de diabetes tipo 1 e tipo 2 na idade adulta. Entretanto, ainda se desconhece o efeito da hiperglicemia sobre parâmetros de estresse oxidativo na fase neonatal de desenvolvimento cerebral.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar o possível papel do estresse oxidativo na neurotoxicidade da hiperglicemia neonatal através da análise de alguns parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos, a fim de avaliar o envolvimento de espécies reativas nos mecanismos responsáveis pelos efeitos deletérios da hiperglicemia em uma fase crucial de desenvolvimento neurológico.

Objetivos específicos

- Desenvolver um modelo de hiperglicemia neonatal induzido por estreptozotocina a fim de avaliar os efeitos deletérios da hiperglicemia em cérebro de ratos.
- Investigar o efeito da hiperglicemia neonatal sobre a atividade das enzimas da via das pentoses fosfato glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfogluconato-desidrogenase em cérebro de ratos.
- Estudar se a hiperglicemia neonatal altera o conteúdo de ânion superóxido e a atividade da enzima NADPH oxidase em cérebro de ratos.
- Verificar o efeito da hiperglicemia neonatal sobre a lipoperoxidação através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.
- Finalmente analisar os efeitos da hiperglicemia neonatal sobre a atividade das principais enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase.

PARTE II

3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

3.1 Desenvolvimento do modelo de hiperglicemia neonatal

A maioria dos modelos experimentais de hiperglicemia induzidos por estreptozotocina (STZ) encontrados na literatura são realizados em animais adultos (Nakhaee, 2009; Kabay, 2009; Ulusu, 2003), entretanto o modelo do estudo proposto foi realizado em ratos Wistar no período neonatal, ou seja, de aproximadamente 5 dias de vida. Portanto, inicialmente realizou-se uma pesquisa na literatura para encontrar estudos com modelos induzidos por baixas dosagens dessa droga, devido a sua toxicidade.

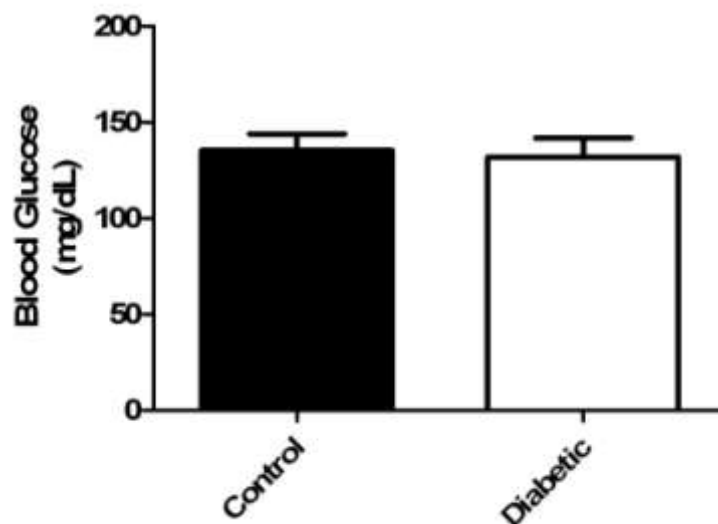


Figura 3: Efeito da administração i.p. de 55mg/Kg de peso corporal de STZ sobre a glicemia durante 4 dias. Resultados expressos em média \pm DP (n=4). *p<0,05. Não foram encontradas diferenças significativas com relação ao controle (teste *t*).

Diante disso, a menor dose de STZ encontrada foi a de 55mg/Kg de peso corporal (Ulusu, 2003). Os ratos do grupo diabético receberam uma injeção de STZ intraperitoneal (i.p.) de 55mg/Kg e o grupo controle uma injeção i.p. de salina. Na figura 3 conseguimos verificar que não houve diferença

significativa entre a glicemia dos grupos controle e a glicemia do grupo que recebeu STZ.

Um teste de tolerância a glicose foi realizado com o intuito de encontrar uma possível explicação para os valores de glicemias dos ratos do grupo controle serem semelhantes aos valores de glicemia ratos do grupo diabético ao administrar STZ (55mg/Kg i.p.). No teste de tolerância a glicose avalia-se a ação da insulina pelo monitoramento da glicemia após uma injeção de glicose (6mg/g de peso corporal i.p.). Foi possível verificar a inibição da ação da insulina nos ratos que receberam STZ quando comparados com os ratos do grupo controle (figura 4), supostamente causada pela diminuição do conteúdo de insulina pancreática (Takada, 2007).

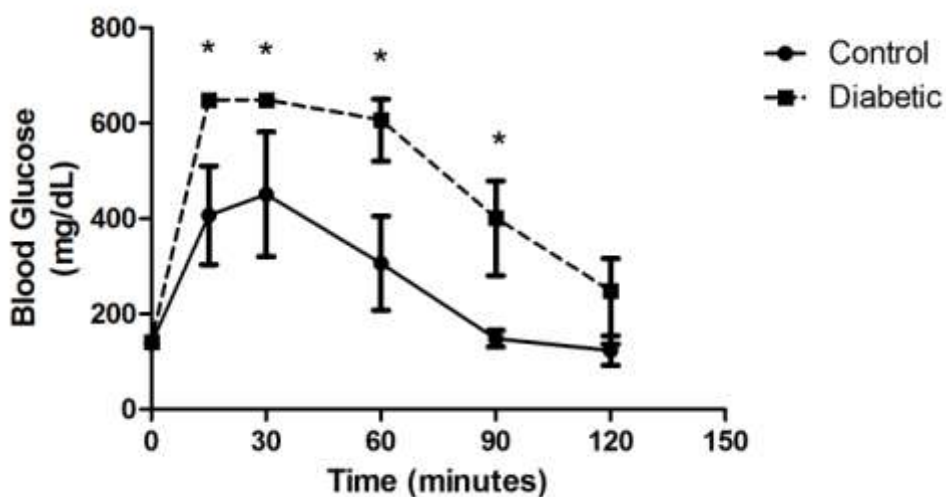


Figura 4: Monitoramento glicêmico após injeção de glicose (6 mg/g de peso corporal) em ratos que receberam 55mg/Kg de STZ (A). Resultados expressos em média \pm EP (n=3). * $p < 0,05$ diferenças em relação ao controle (teste *t*).

Realizou-se uma curva de dose de STZ, pois a proposta do modelo foi de induzir hiperglicemia neonatal com uma única dose desta droga. Podemos

verificar na figura 5 que com a administração de 100mg/Kg de STZ i.p. é possível reproduzir o modelo proposto, ou seja, esta dose mostrou as glicemias dos ratos diabéticos diferentes significativamente dos ratos controles, sendo possível induzir hiperglicemia com apenas uma administração de STZ [F(3) = 16,38; p<0.05].

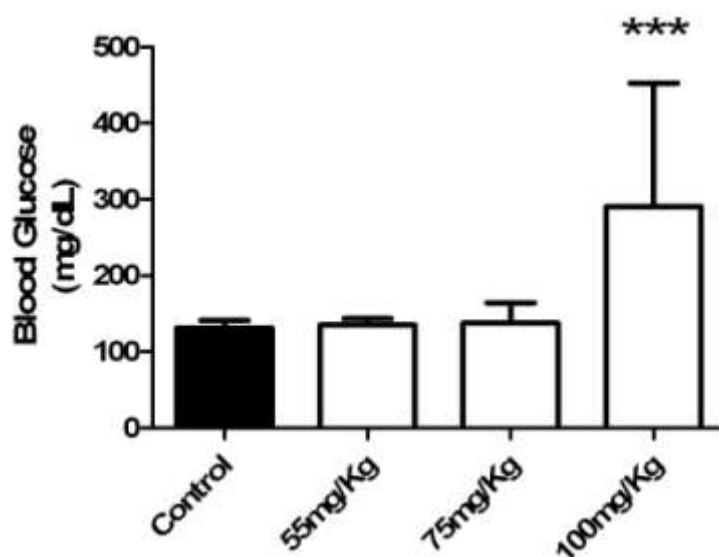


Figura 5: Monitoramento da glicemia durante 5 dias de uma curva de dose de STZ. Resultados expressos em média \pm DP (n=3). ***p<0,001 diferenças em relação ao controle (ANOVA de uma via seguida de Teste de Tukey).

Finalmente, na figura 6 é possível visualizar o resumo do modelo de hiperglicemia neonatal induzida por STZ. Os ratos foram retirados das mães e submetidos a um jejum de 8h, realizado para evitar a competição da glicose da dieta com a droga utilizada, pois ambos internalizam na célula beta-pancreática via receptor GLUT2 (Szkudelski, 2001). Após 8 horas de jejum foi administrada uma dose i.p. de 100mg/Kg de STZ nos ratos do grupo diabético e salina nos ratos do grupo controle. Aproximadamente dez horas após a injeção ocorreu uma hipoglicemia severa nos ratos que receberam STZ. Diante disso, foi

necessária uma injeção i.p. de glicose (2mg/g) no momento da hipoglicemia com o intuito de diminuir a mortalidade destes animais.

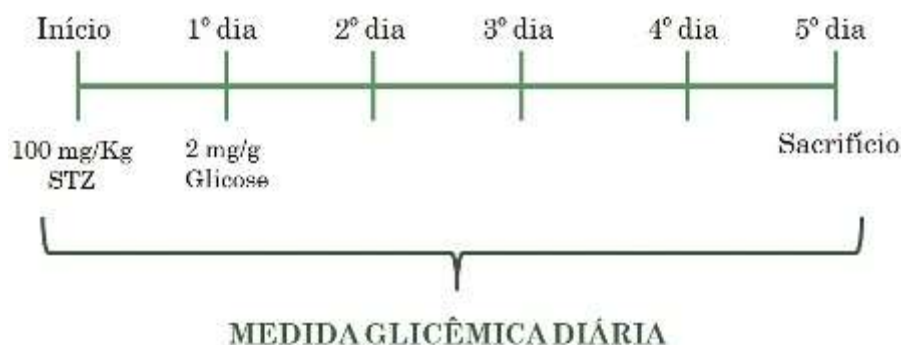


Figura 6: Resumo do modelo de hiperglicemia neonatal induzido por STZ.

Além disso, a glicemia e o peso destes animais foram monitorados diariamente. A glicemia diária do grupo diabético a partir do segundo dia de tratamento é significativamente maior que o grupo controle (figura 7). Os ratos do grupo diabético apresentaram uma diminuição significativa no peso [F(3)=6.214;p<0,001] quando comparado com o grupo controle (figura 8). Finalmente, o sacrifício dos animais foi realizado no quinto dia após a injeção de STZ.

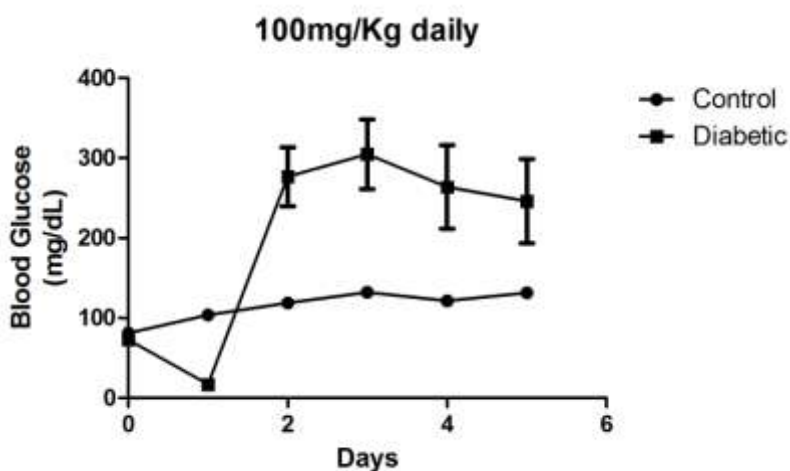


Figura 7: Monitoramento glicêmico diário durante todo tratamento em ratos que receberam 100 mg/Kg de STZ. Resultados expressos em média \pm EP (n=4).

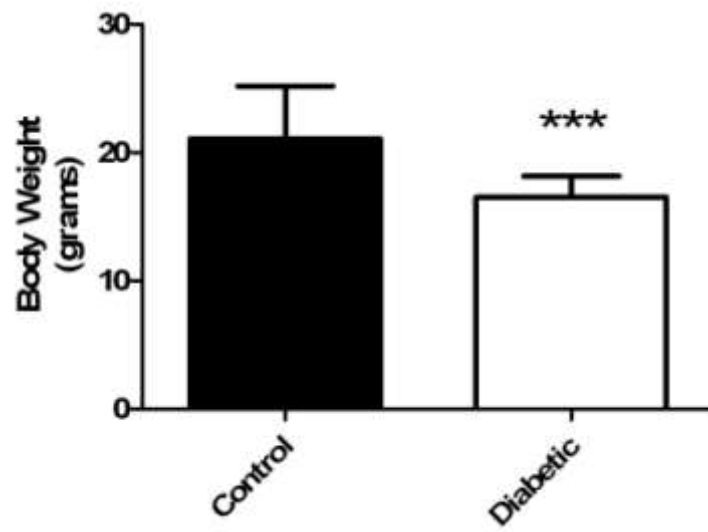


Figura 8: Efeito da administração i.p. de 100 mg/Kg de peso corporal de STZ sobre o peso corporal em ratos neonatos durante 5 dias. Os resultados são expressos em média \pm DP (n = 3). *** p < 0.001 comparado ao grupo controle (Teste t).

3.2 Artigo submetido

NEONATAL HYPERGLYCEMIA INDUCES OXIDATIVE STRESS IN RAT
BRAIN: THE ROLE OF PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY ENZYMES AND
NADPH OXIDASE

Artigo submetido à Metabolic Brain Disease

NEONATAL HYPERGLYCEMIA INDUCES OXIDATIVE STRESS IN RAT
BRAIN: THE ROLE OF PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY ENZYMES AND
NADPH OXIDASE.

²Andrea Pereira Rosa, ¹Carlos Eduardo Diaz Jacques, ¹Giovana Reche
Dalazen, ¹Melaine Terra, ²Priscila Nicolao Mazzola, ²Caroline Paula Mescka,
^{1,2}Carlos Severo Dutra-Filho*.

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de
Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto
Alegre, RS – Brazil

* Corresponding Author

Address Correspondence to:

Carlos Severo Dutra Filho

Departamento de Bioquímica

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo)

90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone number: +55-51 33085575

Fax number: +55-51 33085535

E-mail: dutra@ufrgs.br

Keywords: Neonatal diabetes; Neonatal hyperglycemia; NADPH oxidase;

Glucose-6-phosphate-dehydrogenase; Oxidative stress; Brain.

Abstract

Diabetes is an endocrine disorder of carbohydrate metabolism characterized by hyperglycemia due to body inability to secrete insulin or defect in insulin action. Recently, the consequences of diabetes on the central nervous system (CNS) have been receiving great attention, but the mechanisms by which hyperglycemia can cause brain damage remain poorly understood. Additionally, recent studies have shown that hyperglycemia induces oxidative damage in rat brain. Thus, in the present study we investigated whether streptozotocin-induced hyperglycemia elicits oxidative stress in the brain of neonate rats. The activities of glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), NADPH oxidase (Nox), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSHPx) and the production of superoxide anion and thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) were measured. Hyperglycemic rats presented increased activities of G6PD, 6PGD and Nox that, altogether, may be responsible for the enhanced production of superoxide anion observed. The enhanced antioxidant enzymes activities (SOD, CAT and GSHPx) observed in hyperglycemic rats, probably caused by a rebound effect of oxidative stress, were not able to hinder lipid peroxidation (TBA-RS) in the brain. So, these results suggest that oxidative stress could represent a mechanism to understand the harmful effect of hyperglycemia on the CNS.

Introduction

Diabetes is the most common serious disorder of the carbohydrate metabolism characterized by high blood glucose concentration (hyperglycemia), owing to body's inability to release insulin or defect in insulin action or both (Kabay et al. 2009; Quinn 2001), which results in the impairment of uptake and storage of glucose and reduced glucose utilization for energy purposes (Wild et al. 2004).

Recent studies in both diabetic humans and experimentally diabetic rats have shown that hyperglycemia induces oxidative stress that may perturb brain function (Biessels et al. 2002). It is important to emphasize that these studies were related to diabetes type 1 and type 2 regarding the adulthood or ageing and, to our knowledge, the effect of hyperglycemia on oxidative stress in developing phase of the CNS has not been reported. Recently, many clinical pediatric studies have emerged about a rare condition, the neonatal diabetes mellitus (1:400.000), characterized for presenting uncontrolled hyperglycemia during the first 6 months of life (Valampampil et al. 2009).

In aerobic metabolism, the production of reactive species is counterbalanced by antioxidant defense systems. However, overproduction of reactive species and/or diminished antioxidant defenses may lead to cell injury and death, produced by alterations in enzymatic systems, membrane transport, DNA dysfunction, resulting from protein, lipid, and/or DNA oxidative damage (Halliwell and Gutteridge 2007). Several hypotheses have been reported to explain elevation of free radicals in diabetes, such as glycooxidation, nonenzymatic glycation of protein, activation of protein kinase C, low concentration of antioxidants into tissues and impairment of antioxidant enzyme system (Baynes and Thorpe 1999; Brownlee 2001).

Diabetes produces alterations in tissue NADPH metabolism that is probably related to the alterations in glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD), a rate-limiting enzyme of pentose phosphate pathway (PPP), which produces NADPH to be used as cofactor for enzymes such as glutathione reductase and NADPH-dependent oxidases (Martins et al. 1986). Moreover, recent studies, using a model of severe hyperglycemia, suggest that Nox-derived superoxide generation in the myocardium is fueled by elevated levels of G6PD-derived NADPH (Serpillon et al. 2009). However, whether these effects of severe hyperglycemia were also present into brain tissue remains unknown, especially during development.

The neurological consequences of diabetes in the central nervous system have most recently been receiving greater attention, but the mechanisms by which hyperglycemia can cause brain damage remain poorly understood. Therefore, in the present study we investigated the effect of hyperglycemia in neonate rats on various parameters of oxidative stress in the brain in order to evaluate possible mechanisms of brain damage. To accomplish that, the following oxidative stress parameters were studied: G6PD and 6-phosphogluconate-dehydrogenase (6PGD) activities to evaluate the main cellular source of NADPH (the oxidative phase of PPP); Nox activity and the content of superoxide anion to evaluate superoxide anion production; the activities of glutathione peroxidase (GSHPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) to assess enzymatic antioxidant defenses; and thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) to assess lipid peroxidation.

Materials e Methods

Materials

All chemicals were purchased from Sigma/Aldrich (St. Louis, MO, USA). Streptozotocin (STZ) solutions were freshly prepared in a mixture containing saline (70 percent of final volume) and 20mM sodium phosphate buffer pH 7.4 (30 percent of final volume).

Animals

The NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication # 80–23, revised 1996) was followed in all experiments. Five-day-old Wistar rats bred in the Animal House of Universidade Federal do Rio Grande do Sul were used according to sample size calculation with 80% power at the 0.05 level of significance (MiniTab®). We used both male and female rats since they have not yet developed secondary sexual characteristics at the age of the experiments. Except by a brief period of starving, rats were kept with dams until they were killed. The dams had free access to water and a 20% (w/w) protein commercial chow (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil). They were kept into a room with 12:12 h light/dark cycle (lights on 7:00–19:00 h) and with controlled temperature (22 ± 1 °C).

Streptozotocin-induced neonatal diabetes

After eight hours of starving, Neonatal diabetes was developed through the administration intraperitoneally of a single injection of STZ (100 mg/Kg body weight). Controls received vehicle (saline and buffer) instead. Ten hours after STZ injection, rats received an intraperitoneal injection of glucose (2mg/g body weight) to avoid fatal hypoglycemia developed by the drug.

Tissues preparation

Five days after STZ injection, rats were killed by decapitation without anesthesia and the brain was immediately removed and kept on an ice-plate. The olfactory bulb, pons, and medulla were discarded and the total brain was weighed and kept chilled until homogenization (1:10, w/v) with 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing 140 mM KCl. These procedures lasted up to 5 min. Homogenates were centrifuged at 750 g for 10 min at 4°C to separate nuclei and cell debris (Lissi et al. 1986; Llesuy et al. 1985). The pellet was discarded and the supernatant was immediately separated and used for the measurements.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) assays

G6PD and 6PGD were measured by following the production of coenzyme NADPH. To obtain accurate enzyme activities, 6PGD activity and total dehydrogenase activity (G6PD + 6PGD) were measured separately and the difference from these two measures were related to G6PD activity. To obtain the total dehydrogenase activity, substrates for both dehydrogenase enzymes were added to a cuvette. The reaction mixture contained: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM NADP⁺, 1 mM 6-phosphogluconate (6PGD substrate), 1 mM glucose-6-phosphate (G6PD substrate) and sample. In another cuvette, the same reaction mixture without glucose-6-phosphate were used to obtain the activity of 6PGD alone. Finally, G6PD activity was calculated by subtracting the activity of 6PGD from total dehydrogenase activity (G6PD = total – 6PGD). The reactions were started by the addition of 1 mM NADP⁺ and were followed in a

spectrophotometer at 340 nm. One enzyme unit is defined as 1 μ mol of substrate transformed per min and the specific activity is represented as units per mg protein (Leong and Clark 1984; Tian et al. 1994).

NADPH oxidase assay (Nox)

NADPH oxidase was determined by measuring the chemiluminescence intensity of lucigenin induced by superoxide production after addition of NADPH in a luminometer counter (Guzik and Channon 2005). Briefly, 273 μ L of air equilibrated Krebs-HEPES buffer (99mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 1mM KH₂PO₄, 1.9 CaCl₂, 25mM NaHCO₃, 11.1mM glucose, and 20mM HEPES-Na pH 7.44) was added to a plate and maintained at 37°C. After that, 6 μ L of 20 μ M lucigenin was added and the background level of chemiluminescence was counted for 2 min. Samples (15 μ L) and NADPH (6 μ L) were added and counted for 5 min to determine the kinetic activity of NADPH oxidase, based on the increasing lucigenin chemiluminescence due to superoxide production. NADPH oxidase activity was represented as RLU/min/mg tissue.

Superoxide anion content (O₂^{•-})

Superoxide anion content was determined by measuring the chemiluminescence intensity of lucigenin (Guzik and Channon 2005). Briefly, 194 μ L of air equilibrated Krebs-HEPES buffer (99mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 1mM KH₂PO₄, 1.9 CaCl₂, 25mM NaHCO₃, 11.1mM glucose, and 20mM HEPES-Na pH 7.44) was added to a plate and maintained at 37°C. After that, 6 μ L of 20 μ M lucigenin was added and the background level of

chemiluminescence was counted for 5 min. Samples (100 μ L) were added and counted for 10 min to determine the content of superoxide anion in the tissue. The background was then subtracted from the values obtained in the tissue fraction-added incubation and the chemiluminescence data are represented as RLU/min/mg tissue.

Superoxide dismutase assay (SOD)

The assay of SOD activity was described by Marklund (1985). This method for the assay of SOD activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide, which is substrate for SOD. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm, using a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). A calibration curve was generated with purified SOD as a standard in order to calculate the activity of SOD present in the samples. The results were represented as SOD units/mg protein.

Glutathione peroxidase assay (GSHPx)

GSHPx assay was assessed in according to the method described by Wendel (1981). The GSHPx activity was measured using tert-butyl-hydroperoxide as substrate. NADPH disappearance was monitored at 340 nm using a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). The medium contained 2 mM glutathione, 0.15 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl-

hydroperoxide and 0.1 mM NADPH. One GSHPx unit is defined as one μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as GSHPx units/mg protein.

Catalase assay (CAT)

CAT activity was assayed by the method Aebi (1984) using a SpectraMax M5/M5 Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA, USA). This method is based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL. One CAT unit is defined as one μmol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is represented as CAT units/mg protein.

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS)

TBA-RS was measured according to Ohkawa et al. (1979). Briefly, to eppendorf tubes were added, in order of appearance: 150 μL of tissue homogenate, 40 μL of SDS 8.1%, 280 μL of 20% acetic acid in aqueous solution (v/v) pH3.5, and 280 μL of 0.8 % thiobarbituric acid. The mixture was vortexed and the reaction was carried out in a boiling water bath for 1 h. The mixture was allowed to cool on water for 5 min and was centrifuged at 750g for 10 min. The resulting pink stained TBA-RS obtained were determined spectrophotometrically at 535 nm in a Beckman DU®640 Spectrophotometer. A calibration curve was generated using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard, being subjected to the same treatment as that of the samples. TBA-RS were represented as nmol/mg protein.

Protein determination

Protein concentration was determined in brain homogenates using bovine serum albumin as a standard (Lowry et al. 1951).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the Student's t test. All analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software in a PC-compatible computer. A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

In the present study we investigated the effects of neonatal hyperglycemia on a series of oxidative stress parameters in the brain of rats.

Initially, we investigated the effect of STZ-induced neonatal hyperglycemia on the activities of G6PD and 6PGD, which are the two enzymes that produce NADPH in the oxidative phase of PPP (Figure 1). In figure 1A-B, we observed that the G6PD [$t(12)=3.97$; $p<0.01$] and 6PGD [$t(12)=3.5$; $p<0.01$] activities were significantly increased in hyperglycemic rats compared to controls.

Next, we evaluated the effect of neonatal hyperglycemia on the superoxide anion production and on the activity of Nox (Figure 2). Neonatal hyperglycemia was able to increase significantly the superoxide anion production [$t(14)= 3.073$; $p<0.01$] and Nox activity [$t(9)= 2.565$; $p<0.05$] as can be seen in figure 2A and 2B, respectively.

We also studied the effect of neonatal hyperglycemia on the brain enzymatic antioxidant defenses assessing the activities of the antioxidant enzymes SOD, CAT and GSHPx. Neonatal hyperglycemia significantly enhanced the activity of

SOD (Figure 3A) [$t(13) = 6.38$; $p < 0.001$]. Likewise, CAT [$t(11) = 2.27$; $p < 0.05$] and GSHPx [$t(13) = 3.97$; $p < 0.01$] activities were also enhanced by neonatal hyperglycemia in total brain of rats (Figure 3B and 3C, respectively). These results clearly show an increment in the enzymatic antioxidant defenses in total brain of rats subjected to STZ-induced neonatal hyperglycemia.

Finally, we evaluated the effect of neonatal hyperglycemia on the lipid peroxidation parameter TBA-RS. Figure 4 depicts that neonatal hyperglycemia markedly enhanced TBA-RS levels in total brain homogenates [$t(15) = 3.47$, $p < 0.01$]. These results indicate the promotion of lipid peroxidation by neonatal hyperglycemia in brain tissue homogenates.

Discussion

The consequences of hyperglycemia on the central nervous system are the subject of increasing interest and some studies shown that diabetes produces molecular, cellular and morphological changes in central nervous system (Reagan et al. 1999). The mechanisms of brain damage in this disease remain not fully understood, therefore several lines of evidence indicate that the oxidative damage induced by hyperglycemia may contribute to nervous system damage, through free radicals species impair the central nervous system attacking neurons and Schwann cells because of their high polyunsaturated lipid content (Aragno et al. 2000; Kumar and Menon 1993).

Under normal physiological conditions, there is a critical balance in the generation of free radicals and antioxidant defense system used by organisms to deactivate and protect themselves against free radical toxicity (Halliwell and Whiteman 2004). Impairment in the oxidant/antioxidant equilibrium creates a

condition known as oxidative stress. In this condition, free radicals can cause oxidative injury, by attacking the macromolecules like lipids, carbohydrates, proteins and nucleic acids (Halliwell and Gutteridge 2007). Oxidative stress is known to be a component of molecular and cellular tissue damage mechanisms in a wide spectrum of human diseases and has been recently associated with the pathogenesis of diabetes and its complications (Halliwell 2001; Donne et al, 2006). Diabetes is usually accompanied by increased production of free radicals (Baynes 1991; Baynes and Thorpe 1999; Chang et al. 1993) and/or impairment of antioxidant defenses (Halliwell and Gutteridge 1990; McLennan et al. 1991). Hyperglycemia, one factor shared by all diabetes forms is a major contributor to oxidative stress, through either by direct generation of ROS or by altering the redox balance (Rains and Jain 2011). The most of publications regarding the mechanisms underlying hyperglycemia-induced oxidative stress were approached in vascular tissue and focus on the 5 major mechanisms: increased flux of sugars through the polyol pathway; increased intracellular formation of advanced glycation end products (AGEs); increased expression of the receptor for AGEs; activation of protein kinase C isoforms (PKC); and overactivity of hexosamine pathway. Compelling evidence has lead to the hypothesis that all mechanisms above are activated by a single upstream event: increased superoxide production (Giacco and Brownlee 2010). Additionally, recent studies demonstrated that overexpression of G6PD increases NADPH production, which enhances superoxide anion production by Nox in the heart and vasculature (Gupte et al. 2005; Gupte et al. 2006; Serpillon et al. 2009). Therefore, based on the present evidence, in these studies we investigated the effects of STZ-induced hyperglycemia on oxidative stress parameters in the

brain of neonate rats. Also, in order to identify mechanisms by which oxidative stress plays a role in neonatal hyperglycemia-induced neurotoxicity, our aim was to determine whether NADPH oxidase is a source of superoxide anion and whether G6PD and 6PGD-derived NADPH plays a role by augmenting superoxide generation in neonatal diabetes.

We started measuring the effect of neonatal hyperglycemia on the G6PD and 6PGD activity, fundamental enzymes of the PPP that produce NADPH, which is required for many reduction systems and for NADPH oxidase activity. We observed that neonatal hyperglycemia was able to significantly increased G6PD and 6PGD activity in rat brain, which is in accordance with some studies that found increased G6PD activity in brain adult rats (Ulusu et al. 2003).

Next we verified that neonatal hyperglycemia was able to increased both superoxide anion levels and NADPH oxidase activity. These findings are in accordance with studies that have shown increased superoxide anion production in the brain adult rat by hyperglycemia (Arrick et al. 2011; Mayhan et al. 2010; Patel et al. 2010). However, the authors have not determined whether the production of superoxide anion was due to NADPH oxidase or from mitochondrial source.

With regard to the major enzymatic antioxidant defenses, neonatal hyperglycemia significantly enhanced the activities of SOD (Huang et al. 1999), CAT (Aragno et al. 1999) and GSHPx (Rauscher et al., 2001; Sanders et al. 2001) in the brain of rats. Similar effects have already been reported by other authors using adult rats. A possible explanation for this would be that the increased activity of SOD, CAT and GSHPx may reflect a higher *de novo*

synthesis of these enzymes caused by a rebound effect against oxidative stress in an effort to counteract the overproduction of superoxide anion.

We then investigated the effect of neonatal hyperglycemia on the lipid peroxidation assessed by the classic parameter TBA-RS. We observed that hyperglycemia significantly enhanced TBA-RS levels in the brain of neonate rats indicating that hyperglycemia neonatal promotes lipid peroxidation. TBA-RS levels reflect the amount of malondialdehyde, which is end product of lipid peroxidation (Halliwell and Gutteridge 2007). Therefore, the enhancement of this parameter promoted by hyperglycemia suggests an induction of lipid oxidative damage caused by oxidative stress. This result is in accordance with many studies reported in the literature, showing hyperglycemia-induced lipid peroxidation in adult rat brain (Aragno et al. 1999; Nakhaee et al. 2009; Pari and Murugan 2007; Pierrefiche et al. 1993; Ulusu et al. 2003) should be pointed out that some reactive species, such as hydrogen peroxide and superoxide anion, are not directly able to trigger lipid peroxidation, whereas hydroxyl radical and peroxynitrite can directly initiate oxidative damage to lipids (Halliwell and Gutteridge 2007). Therefore, the enhanced superoxide anion production by neonatal hyperglycemia can have led to the production of other reactive species, which can directly initiate the lipid peroxidation.

Taken together, as outlined in the figure 5 our present results suggest that neonatal hyperglycemia increased superoxide anion levels into the brain by enhancing the activities of G6PD, 6PGD and NADPH oxidase while lipid peroxidation was also increased despite the elevation of antioxidant enzymes activities (SOD, CAT and GSHPx). These effects may point to possible therapeutic targets to be studied in this pathological condition. At this point it

should be emphasized that the central nervous system is highly sensitive to oxidative stress due to its high oxygen consumption, its high iron and lipid contents, especially polyunsaturated fatty acids, and the low activity of antioxidant defenses (Halliwell 2001). Considering that oxidative stress can be elicited by the imbalance between free radical production and antioxidant defenses, and since neonatal hyperglycemia provokes an increase in reactive species (superoxide anion) and lipid damage, it is postulated that oxidative stress may contribute, along with other mechanisms, to the possible neurological damage induced by hyperglycemia in a crucial period of brain development.

Aknowledgements

This work was supported by the research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and FINEP Rede Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net #01.06.0842-00). Figure 5 were produced using Servier Medical Art (www.servier.com).

References

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.

Aragno, M., Parola, S., Tamagno, E., Brignardello, E., Manti, R., Danni, O., and Boccuzzi, G. (2000). Oxidative derangement in rat synaptosomes induced by hyperglycaemia: restorative effect of dehydroepiandrosterone treatment. *Biochem. Pharmacol.* 60:389-395.

Aragno, M., Tamagno, E., Gatto, V., Brignardello, E., Parola, S., Danni, O., and Boccuzzi, G. (1999). Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1467-1474.

Arrick, D.M., Sun, H., Patel, K.P., and Mayhan, W.G. (2011). Chronic resveratrol treatment restores vascular responsiveness of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301:696-703.

Baynes, J.W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 40:405-412.

Baynes, J.W., and Thorpe, S.R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 48:1-9.

Biessels, G.J., van der Heide, L.P., Kamal, A., Bleys, R.L., and Gispen, W.H. (2002). Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* 441:1-14.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414:813-820.

Chang, K.C., Chung, S.Y., Chong, W.S., Suh, J.S., Kim, S.H., Noh, H.K., Seong, B.W., Ko, H.J., and Chun, K.W. (1993). Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266:992-1000.

Donne, I.D., Ranieri, R., Roberto, C., Daniela, G., and Aldo, M. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52:601-623.

Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 107:1058-1070.

Gupte, S.A., Kaminski, P.M., Floyd, B., Agarwal, R., Ali, N., Ahmad, M., Edwards, J., and Wolin, M.S. (2005). Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288:13-21.

Gupte, S.A., Levine, R.J., Gupte, R.S., Young, M.E., Lionetti, V., Labinsky, V., Floyd, B.C., Ojaimi, C., Bellomo, M., Wolin, M.S., and Recchia, F.A. (2006). Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41:340-349.

Guzik, T.J., and Channon, K.M. (2005). Measurement of vascular reactive oxygen species production by chemiluminescence. *Methods Mol. Med.* 108:73-89.

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18:685-716.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85.

Halliwell B., Gutteridge J.M. (2007). Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free Rad. Biol. Med.* Oxford University Press Inc., Oxford:187–267

Halliwell, B., and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142:231-255.

Huang, W.C., Juang, S.W., Liu, L.M., Chi, T.C., and Cheng, J.T. (1999). Changes of superoxide dismutase gene expression and activity in the brain of streptozotocin-diabetic rats. *Neurosci. Lett.* 275:25-28.

Kabay, S.C., Ozden, H., Guven, G., Ustuner, M.C., Degirmenci, I., Olgun, E.G., and Unal, N. (2009). Protective effects of vitamin E on central nervous system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin. Invest. Med.* 32:314-321.

Kumar, J.S., and Menon, V.P. (1993). Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism.* 42:1435-1439.

Leong, S.F., and Clark, J.B. (1984). Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem. J.* 218:131-138.

Lissi, E.A., Caceres, T., and Videla, L.A. (1986). Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. *J. Free. Radic. Biol. Med* 2:63-69.

Llesuy, S.F., Milei, J., Molina, H., Boveris, A., and Milei, S. (1985). Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori.* 71:241-249.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Marklund, S.L. Pyrogallol autoxidation. (1985) *In: Greenwald RA (ed) Handbook of methods for oxygen radical research. CRC, Boca Raton. 243–247.*

Martins, R.N., Stokes, G.B., and Masters, C.L. (1986). Regulation of liver and brain hexose monophosphate dehydrogenases by insulin and dietary intake in the female rat. *Mol. Cell Biochem. 70:169-175.*

Mayhan, W.G., Arrick, D.M., Patel, K.P., and Sun, H. (2010). Exercise training normalizes impaired NOS-dependent responses of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 300:1013-1020.*

McLennan, S.V., Heffernan, S., Wright, L., Rae, C., Fisher, E., Yue, D.K., and Turtle, J.R. (1991). Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes. 40:344-348.*

Nakhaee, A., Bokaeian, M., Akbarzadeh, A., and Hashemi, M. (2009). Sodium tungstate attenuate oxidative stress in brain tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Trace. Elem. Res. 136:221-231.*

Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem. 95:351-358.*

Pari, L., and Murugan, P. (2007). Tetrahydrocurcumin prevents brain lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Med. Food. 10:323-329.*

Patel, K.P., Mayhan, W.G., Bidasee, K.R., and Zheng, H. (2010). Enhanced angiotensin II-mediated central sympathoexcitation in streptozotocin-induced diabetes: role of superoxide anion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300:311-320.

Pierrefiche, G., Topall, G., Courboin, G., Henriet, I., and Laborit, H. (1993). Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 80:211-223.

Quinn, L. (2001). Type 2 diabetes: epidemiology, pathophysiology, and diagnosis. *Nurs. Clin. North Am.* 36:175-192, v.

Rains, J.L., and Jain, S.K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 50:567-575.

Rauscher, F.M., Sanders, R.A., and Watkins, J.B., 3rd (2001). Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15:159-164.

Reagan, L.P., Magarinos, A.M., and McEwen, B.S. (1999). Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893:126-137.

Sanders, R.A., Rauscher, F.M., and Watkins, J.B., 3rd (2001). Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15:143-149.

Serpillon, S., Floyd, B.C., Gupte, R.S., George, S., Kozicky, M., Neito, V., Recchia, F., Stanley, W., Wolin, M.S., and Gupte, S.A. (2009). Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297:153-162.

Tian, W.N., Pignatare, J.N., and Stanton, R.C. (1994). Signal transduction proteins that associate with the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mediate the PDGF-induced release of glucose-6-phosphate dehydrogenase from permeabilized cells. *J. Biol. Chem.* 269:14798-14805.

Ulusu, N.N., Sahilli, M., Avci, A., Canbolat, O., Ozansoy, G., Ari, N., Bali, M., Stefek, M., Stolc, S., Gajdosik, A., and Karasu, C. (2003). Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem. Res.* 28:815-823.

Valampampil, J.J., Chirakkarot, S., Savida, P., and Omana, S. (2009). Clinical profile and etiology of diabetes mellitus with onset at less than 6 months of age. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 25:656-662.

Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77:325-333.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 27:1047-1053.

FIGURE CAPTION LIST

Figure 1: Effect of neonatal hyperglycemia on the activities of glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD) (A) and 6-phosphogluconate-dehydrogenase (6PGD) (B) in rat brain. Results are mean \pm SD (n=6-8) for independent experiments performed in duplicate. *p<0.05 and **p<0.01 compared to control (Student's t test for unpaired samples).

Figure 2: Effect of neonatal hyperglycemia on superoxide anion content (A), and on NADPH oxidase (Nox) activity (B) in rat brain. Results are mean \pm SD (n=6-10) for independent experiments performed in duplicate. *p<0.05 and **p<0.01 compared to control (Student's t test for unpaired samples).

Figure 3: Effect of neonatal hyperglycemia on the activities of superoxide dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) and glutathione peroxidase (GSHPx) (C) in rat brain. Results are mean \pm SD (n=6-10) for independent experiments performed in duplicate. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001 compared to control (Student's t test for unpaired samples).

Figure 4: Effect of neonatal hyperglycemia on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) in rat brain. Results are mean \pm SD (n=6-9) for independent experiments performed in duplicate. *p<0.05; **p<0.01 compared to control (Student's t test for unpaired samples).

Figure 5: Schematic overview of the results on the effects of neonatal hyperglycemia in rat brain. Glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate-dehydrogenase (6PGD), superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSHPx).

Figure 1:

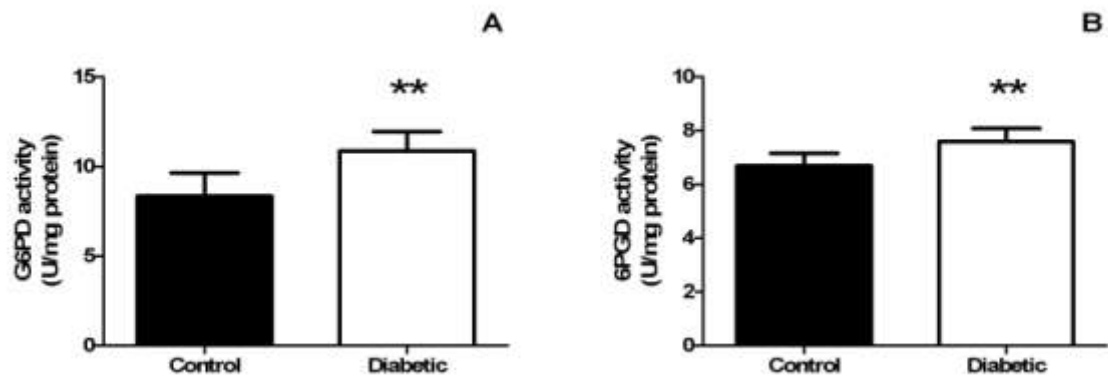


Figure 2:

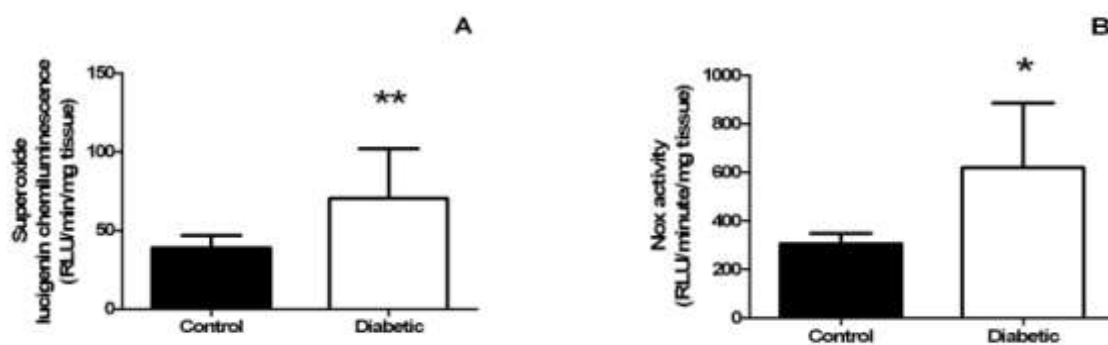


Figure 3:

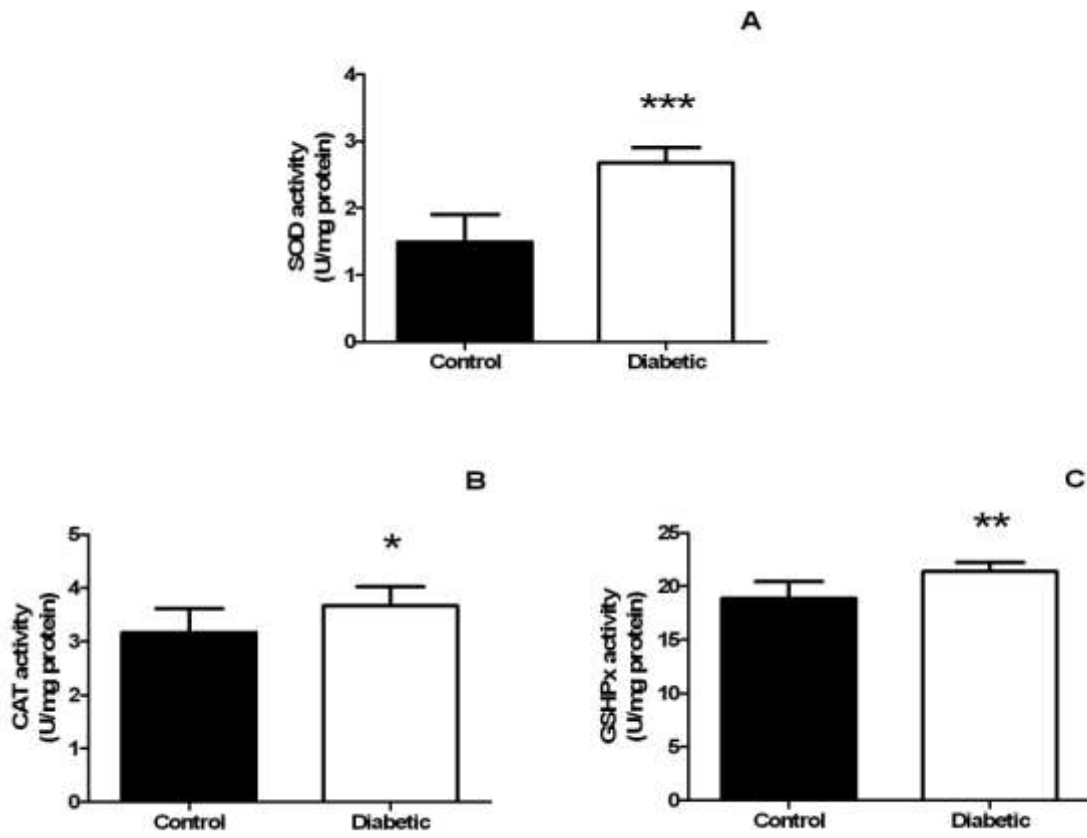


Figure 4:

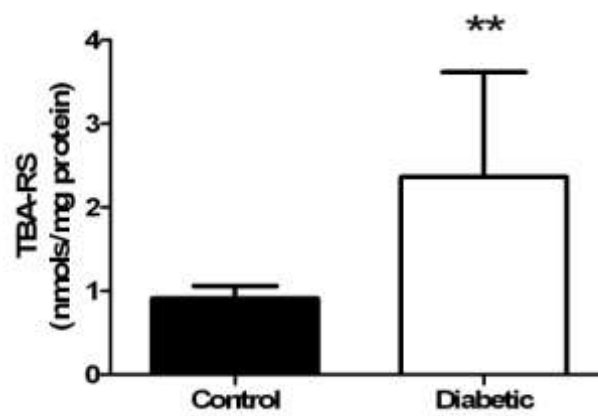
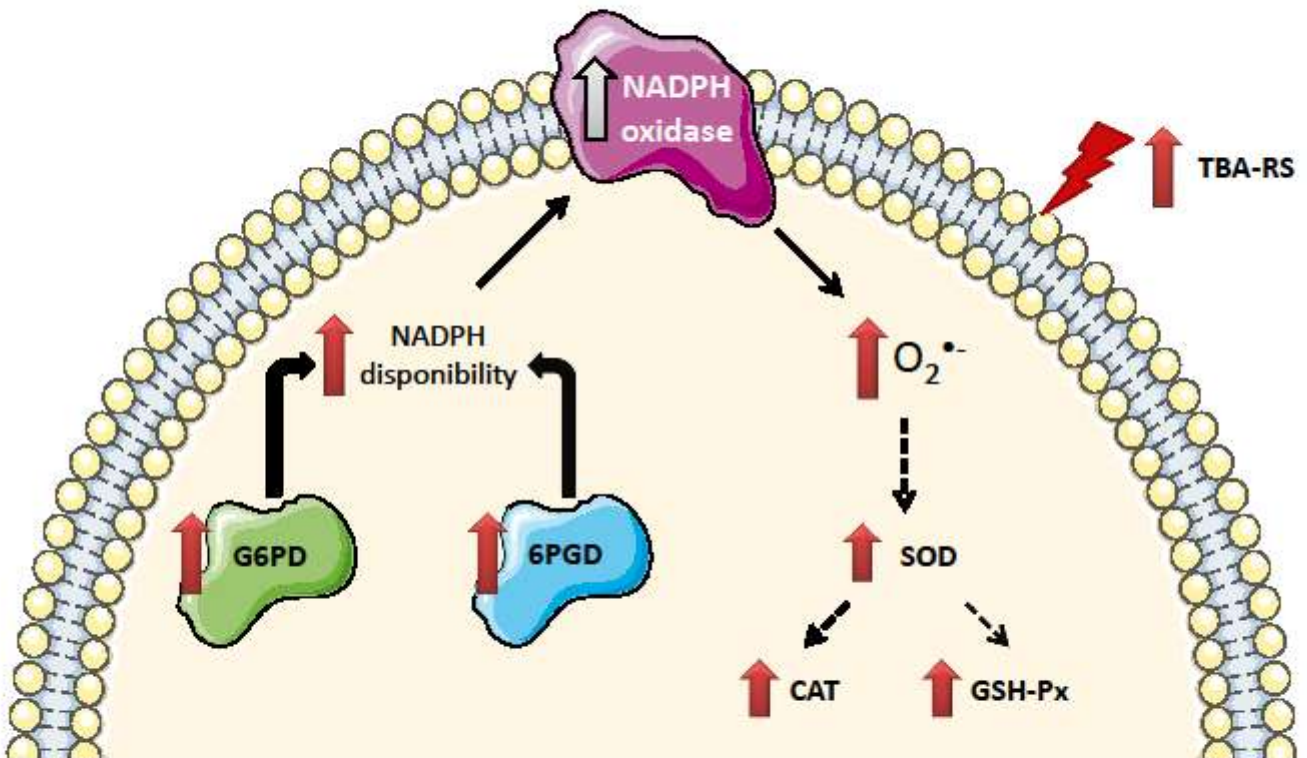


Figure 5:



PARTE III

5. DISCUSSÃO

Nas as últimas décadas, houve uma explosão de trabalhos na área pediátrica sobre as múltiplas causas hereditárias de uma forma de diabetes com etiologia não imunológica, a diabetes neonatal. A DN é caracterizada pela presença de hiperglicemia diagnosticada durante os seis primeiros meses de vida (Aguilar-Bryan e Bryan, 2008; Flechtner et al., 2008; Greeley et al., 2010; Gurgel e Moises, 2008; Polak e Cave, 2007; Polak e Shield, 2004; Suzuki et al., 2007; Valamparampil et al., 2009). Estes estudos analisam o perfil clínico, a etiologia e o tratamento a ser preconizado durante o diagnóstico da DN, entretanto, por se tratarem apenas de estudos clínicos se desconhecem os efeitos deletérios da hiperglicemia neonatal sobre os órgãos dos pacientes neste período importante de desenvolvimento.

A maioria dos estudos experimentais desenvolvidos em humanos e ratos diabéticos foi realizada na idade adulta e mimetiza as diabetes melito tipo 1 e tipo 2 (Cumaoglu et al., 2011; Kabay et al., 2009; Nakhaee et al., 2009; Ulusu et al., 2003). Existem poucos relatos a respeito de diabetes induzida por STZ no período neonatal de ratos, sendo que estes trabalhos apenas citam o modelo utilizado e não descrevem os detalhes experimentais descobertos durante o desenvolvimento do modelo (Portha et al., 1974; Takada et al., 2007). Portanto, torna-se muito importante criar um modelo animal que mimetize os efeitos hiperglicemia encontrada em humanos durante os seis primeiros meses de vida e, finalmente, esclarecer o dano hiperglicemia em todos os órgãos.

Os estudos com animais que utilizam estreptozotocina (STZ) têm uma longa história no campo de pesquisa de indução de diabetes. A STZ é um análogo da glicose, pois o carbono-2 de uma hexose está ligado à porção N-metil-N-nitrosourea da STZ. Portanto, a droga internaliza na célula β com baixa afinidade através do transportador de glicose GLUT2 e promove a destruição das células β pancreáticas (Karunanayake et al., 1976). A indução de diabetes por STZ em ratos promove a inibição da liberação de insulina, e conseqüentemente, provoca um estado de diabetes insulino-dependente (Szkudelski, 2001). Supõe-se que o mecanismo da STZ esteja associado a sua porção metilnitrosourea, que contém propriedades alquilantes. A transferência do grupo metil da STZ à molécula de DNA provoca danos, que ao longo de uma cadeia definida de eventos, resulta em fragmentação do DNA (Pieper et al., 1999; Yamamoto et al., 1981). Na tentativa de reparo ao DNA, a enzima poli ADP-ribose polimerase (PARP) é superestimulada, levando a diminuição dos estoques de NAD e, posteriormente, ATP (Schein e Loftus, 1968; Uchigata et al., 1982; Yamamoto et al., 1981). O esgotamento da energia celular resulta finalmente em apoptose das células β (Elsner et al., 2002; Heller et al., 1994). Apesar das propriedades de alquilação da STZ serem a principal razão da sua toxicidade, a ação do óxido nítrico e das espécies reativas de oxigênio produzidas pela droga, também podem contribuir para os danos nas células β pancreáticas (Szkudelski, 2001).

A STZ na dose de 55mg/Kg de peso corporal foi utilizada inicialmente devido à toxicidade da droga, pois se realizou uma pesquisa a fim de encontrar estudos com modelos de diabetes induzido por baixas doses desta droga,

afinal os animais eram muito jovens e poderiam ser muito sensíveis à STZ. No entanto, ao monitorar a glicemia diária destes animais verificamos que os ratos que receberam a STZ apresentavam a glicemia semelhante ao grupo controle. A fim de encontrar uma possível explicação para as glicemias semelhantes realizamos nestes mesmos animais um teste de tolerância a glicose. Por fim, verificamos que os ratos diabéticos (55mg/Kg de peso corporal) atingiam glicemias altas (>600 mg/dL) e levavam mais tempo que os ratos controles para retornar a valores normoglicêmicos, supostamente devido a diminuição do conteúdo de insulina pancreática (Takada et al., 2007). Tem sido relatado que a administração de STZ em baixas doses gera uma hiperglicemia transitória que inicia um processo para recuperar uma mínima massa de células beta suficiente para secretar insulina necessária para reparar o estado diabético (Ahren e Skoglund, 1989; Portha et al., 1974).

A proposta inicial foi a de criar um modelo de diabetes neonatal induzida por STZ com a administração de uma única dose, para isso realizamos uma curva de dose, uma vez que a literatura tem poucos relatos sobre as doses utilizadas em ratos jovens. Foi realizada a administração i.p. das doses de 55, 75 e 100 mg/Kg de peso corporal, sendo que com a administração da dose de 100mg/kg de STZ foi possível reproduzir o modelo proposto, em outras palavras, a hiperglicemia induzida com apenas uma administração.

Finalmente, na figura 3 podemos mostrar um resumo esquemático do modelo de hiperglicemia neonatal induzida por STZ. Inicialmente, os ratos

foram submetidos a um jejum de oito horas (retirados de suas mães), destinado a evitar a competição entre a STZ e a glicose da dieta, pois ambas internalizam nas células β pancreáticas via receptor GLUT2 (Szkudelski, 2001). Aproximadamente dez horas após a injeção de STZ os ratos apresentaram uma hipoglicemia grave, sendo que a explicação para esta alteração é o mecanismo de ação da STZ, que provoca apoptose nas células β do pâncreas. A apoptose das células β leva a hipoglicemia devido a ruptura dos grânulos de insulina que atingem a corrente sanguínea (Lenzen, 2008). Portanto, dez horas após a injeção de STZ administrou-se glicose i.p. (2 mg/g de peso corporal) a fim de diminuir a mortalidade destes animais. A glicemia e o peso corporal foram medidos diariamente. Os ratos foram sacrificados cinco dias após a injeção de STZ, pois a maioria dos animais não sobrevive após o quinto dia de tratamento. A mortalidade dos ratos diabéticos que receberam 100mg/kg de peso corporal ao final do nosso estudo foi de 30%.

Os animais tratados com STZ tiveram o peso corporal menor do que o grupo controle, a partir do segundo dia de tratamento. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados em ratos neonatos com diabetes induzida por STZ (Portha et al., 1974; Takada et al., 2007). Portha et al. (1974) relatam que ratos diabéticos induzidos por STZ apresentam uma ligeira diminuição da insulina, ácidos graxos elevados e conteúdo de glicogênio hepático menor do que os ratos controles. Takada et al. (2007) mostram que ratos recém nascidos após a administração de STZ (150mg/kg de peso corporal) desenvolveram polifagia, polidipsia, poliúria, glicosúria, redução do

número de receptores de insulina e deficiência na capacidade de oxidar glicose.

Resumidamente, os principais resultados encontrados durante o desenvolvimento do modelo de diabetes neonatal induzida por STZ são: os ratos diabéticos levaram mais tempo para retornarem aos valores normoglicêmicos que os ratos controles, sendo que os valores glicêmicos dos ratos diabéticos atingiram valores maiores que 600mg/dL 15 minutos após a administração i.p. de STZ na dose de 55mg/Kg de peso corporal; e hiperglicemia induzida com uma única dose i.p. de 100mg/Kg de STZ, sendo que os animais que receberam esta dose apresentaram peso corporal diminuído durante o tratamento e mortalidade de 30% quando comparados ao grupo controle. Além disso, espera-se encontrar diminuição nos níveis do hormônio insulina nos ratos que receberam a dose de 100mg/Kg de peso corporal de STZ, pois se sugere uma correlação positiva direta entre a glicemia e a destruição da célula beta pancreática (Szkudelski, 2001). Em conclusão, o modelo de diabetes neonatal induzido por STZ proposto neste trabalho, provavelmente, pode contribuir para investigação dos mecanismos pelos quais a hiperglicemia promove danos em vários órgãos, pois os níveis plasmáticos de glicose são semelhantes aos encontrados em pacientes com a diabetes neonatal.

Recentemente, as conseqüências neurológicas da hiperglicemia no sistema nervoso central têm recebido maior atenção. Alguns estudos mostram que a hiperglicemia é capaz de produzir alterações moleculares, celulares e

morfológicas no sistema nervoso central (Reagan et al., 1999). No entanto, os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral permanecem ainda não esclarecidos.

Várias evidências indicam que o dano oxidativo induzido pela hiperglicemia possa contribuir para os danos ao sistema nervoso. As espécies reativas produzidas pelo quadro hiperglicêmico podem prejudicar o sistema nervoso central, pois reagem com os neurônios e células de Schwann, devido ao seu alto teor de lipídeos poliinsaturados (Aragno et al., 2000; Kumar e Menon, 1993). Estudos experimentais recentes em humanos e ratos diabéticos têm mostrado que a hiperglicemia induz estresse oxidativo, que pode estar sendo gerado devido à condição de diabetes ser geralmente acompanhada do aumento da produção de radicais livres (Baynes, 1991; Baynes e Thorpe, 1999; Chang et al., 1993) e / ou do prejuízo das defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1990; McLennan et al., 1991; Biessels et al., 2002). Todas essas evidências apontam para um possível envolvimento do estresse oxidativo na neurotoxicidade da hiperglicemia gerada na diabetes.

A hiperglicemia, um fator comum a todos os tipos de diabetes, é um dos principais contribuintes para o estresse oxidativo, quer através da geração direta de espécies reativas ou da alteração do equilíbrio redox (Rains e Jain, 2011). A maioria das publicações sobre os mecanismos pelos quais a hiperglicemia induz estresse oxidativo são desenvolvidas no tecido vascular e citam cinco principais mecanismos: fluxo aumentado de açúcares através da via polioliol, formação intracelular aumentada de produtos de glicação avançada

(AGEs), aumento da expressão do receptor para AGEs; ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e hiperatividade da via hexosamina (Giacco e Brownlee, 2010).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como a hiperglicemia induzida aumenta o fluxo da via poliol e têm capacidade de danificar tecidos como nervos, retina, glomérulos e células vasculares (Ramasamy e Goldberg, 2010). O mecanismo mais citado é o aumento do estresse redox causado pela diminuição dos níveis de NADPH, cofator necessário para regeneração da glutatona reduzida (GSH). A GSH é um importante “scavenger” de espécies reativas, isso poderia induzir ou exacerbar o estresse oxidativo intracelular. Estudos demonstram que a superexpressão da aldose redutase aumentou a aterosclerose em ratos diabéticos e reduziu a expressão de genes que regulam a regeneração da glutatona (Vikramadithyan et al., 2005).

AGEs são formados pela reação não enzimática da glicose e outros compostos provenientes tanto da oxidação de glicose quanto da oxidação aumentada de ácidos graxos em células endoteliais e cardíacas (por exemplo, como dicarbonil 3-deoxiglucosona, metilglioxal e glioxal) com proteínas. Na diabetes, AGEs são encontrados em quantidades aumentadas na matriz extracelular. A produção intracelular de precursores de AGE pode danificar as células por três mecanismos gerais. Primeiro, os AGEs são capazes de modificar proteínas intracelulares alterando suas funções. Segundo, os componentes da matriz extracelular são modificados por precursores dos AGE, que interagem de forma anormal com outras componentes e receptores da

matriz (integrinas). Finalmente terceiro, proteínas plasmáticas são modificadas por precursores dos AGEs e se ligam a receptores AGE em células como macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. A ligação de um ligante a um receptor para AGE (RAGE) induz a produção de espécies reativas, que por sua vez ativa o fator de fator de transcrição nuclear pleiotrópico (NFκB), causando múltiplas alterações patológicas através da expressão de vários genes (Giacco e Brownlee, 2010; Goldin et al., 2006).

A PKC é uma enzima que tem o papel de fosforilar várias proteínas alvo. A atividade da isoforma clássica é dependente de íons Ca^{2+} , fosfatidilserina e é bastante reforçada pelo diacilglicerol (DAG) (Gerald e King, 2010). A ativação persistente e excessiva de várias isoformas da PKC funciona como uma via comum de lesão induzida por espécies reativas na diabetes. Além disso, o aumento de espécies reativas é capaz de inibir a enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e conseqüentemente elevar os níveis intracelulares da triose fosfato, precursor de DAG. Portanto, o aumento da disponibilidade de DAG resulta da sua síntese de novo via triose fosfato a partir da glicose (Craven et al., 1990; Inoguchi et al., 1992; Shiba et al., 1993).

A hiperglicemia e a resistência à insulina induzidas pelo excesso de oxidação de ácidos graxos também parecem contribuir com a patogênese da diabetes por aumentar o fluxo de frutose-6-fosfato na via da hexosamina. Nesta via a frutose-6-fosfato é desviada da glicólise, fornecendo substrato para a enzima limitante desta via, a glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT). A GFAT converte frutose 6-fosfato à glucosamina 6-fosfato, que é

então convertida em UDP-N-acetilglucosamina. Embora não esteja totalmente claro como a hiperglicemia induz o aumento do fluxo através da via hexosamina, sabe-se que com o aumento da rota hexosamina ocorre a inibição da enzima eNOS em células vasculares (Chen et al., 1998; Du et al., 2000).

Evidências convincentes levam à hipótese de que todos os mecanismos citados acima são ativados por um único evento a montante: a produção aumentada de ânion superóxido mitocondrial (Giacco e Brownlee, 2010). Normalmente, a transferência de elétrons nos complexos I, III e IV impulsiona os prótons da matriz para o espaço intermembrana da mitocôndria. Essa mobilização gera um gradiente de prótons capaz de ativar a ATP sintase (complexo V), que produz ATP através do retorno desses prótons a matriz mitocondrial. Em contraste, nas células diabéticas com alta concentração intracelular de glicose há mais piruvato formado a partir da glicose que será oxidado no ciclo do ácido cítrico. Este aumento na oxidação de piruvato leva ao aumento no fluxo de doadores de elétrons (NADH e FADH₂) e o gradiente de voltagem no espaço intermembrana aumenta até alcançar um limiar crítico. Neste ponto, a transferência de elétrons no complexo III é bloqueada (Trumpower, 1990), fazendo com que a coenzima Q doe elétrons diretamente ao oxigênio molecular, formando ânion superóxido (Figura 8) (Giacco e Brownlee, 2010).

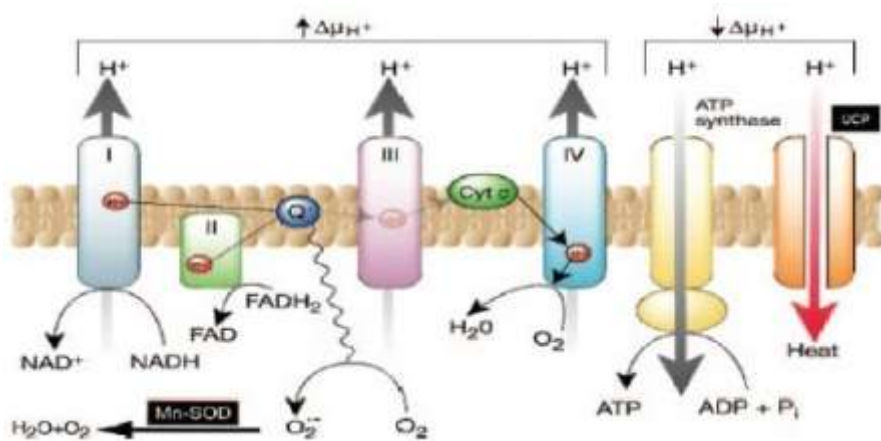


Figura 8: Produção de EROs pela cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. Em cultura de células endoteliais, os doadores de elétrons NADH e FADH₂ são gerados pela oxidação de piruvato derivado da glicose. O fluxo dos elétrons doados através da cadeia de transporte de elétrons na membrana mitocondrial interna bombeia prótons (H⁺) para o espaço intermembranar. Quando o gradiente de tensão atinge seu limiar devido ao fluxo aumentado de doadores de elétrons, ânion superóxido é gerado em maior quantidade. Adaptado de Brownlee, 2005.

As mitocôndrias são necessárias para o início da produção de ânion superóxido induzida pela hiperglicemia, que por sua vez, pode ativar um número de outras vias de produção de superóxido, como a ativação da enzima NADPH oxidase, ampliando o efeito original prejudicial da hiperglicemia. Estudos recentes demonstram que a superexpressão de G6PD pode promover o aumento na disponibilidade de NADPH, sugerindo um aumento na produção de ânion superóxido pela NADPH oxidase no tecido cardíaco e vascular (Gupte et al., 2005; Gupte et al., 2006; Serpillon et al., 2009).

Portanto, nosso estudo objetivou desenvolver um modelo de hiperglicemia neonatal que mimetizasse os efeitos deletérios da hiperglicemia em um período crucial de desenvolvimento cerebral. A partir do desenvolvimento do modelo de hiperglicemia neonatal, objetivamos investigar os efeitos desta sobre parâmetros de estresse oxidativo em cérebro total de

ratos. Além disso, a fim de identificar os mecanismos pelos quais o estresse oxidativo desempenha um papel na neurotoxicidade induzida por hiperglicemia neonatal avaliamos o papel da enzima NADPH oxidase como responsável pela produção de ânion superóxido.

Nós começamos medindo o efeito da hiperglicemia neonatal sobre a atividade da G6PD e 6PGD, enzimas fundamentais da via das pentoses fosfato que produzem NADPH. O NADPH é uma coenzima necessária em vários sistemas redutores e para a atividade da NADPH oxidase. Observou-se que a hiperglicemia neonatal foi capaz de aumentar significativamente a atividade da G6PD e da 6PGD em cérebro de rato. Este resultado está de acordo com alguns estudos que encontraram aumento da atividade da G6PD em cérebro de ratos adultos submetidos à hiperglicemia (Ulusu et al., 2003).

Em seguida, verificou-se que a hiperglicemia neonatal foi capaz de aumentar os níveis de ânion superóxido e a atividade da NADPH oxidase. Esses achados estão de acordo com estudos que demonstram a produção de ânion superóxido aumentada em cérebro de ratos adultos submetidos à hiperglicemia (Arrick et al., 2011; Mayhan et al., 2010; Patel et al., 2010).

Foram determinadas também as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSHPx. A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido; a CAT dismuta o peróxido de hidrogênio; e a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos com a glutathiona reduzida (Marklund et al., 1984). A hiperglicemia neonatal foi capaz de aumentar significativamente as

atividades da SOD (Huang et al., 1999), CAT (Aragno et al., 1999) e GSHPx (Rauscher et al., 2001; Sanders et al., 2001) em cérebro total de ratos. Efeitos semelhantes já foram relatados por outros autores utilizando cérebro de ratos adultos diabéticos. Possivelmente o aumento da atividade da SOD, CAT e GSHPx seja causado por uma resposta contra-regulatória contra o estresse oxidativo em um esforço para neutralizar o excesso de ânion superóxido produzido pela hiperglicemia neonatal.

Em seguida, investigou-se o efeito da hiperglicemia neonatal sobre a peroxidação lipídica avaliada pelo parâmetro clássico TBA-RS. Observou-se que a hiperglicemia aumentou significativamente os níveis de TBA-RS em cérebro de ratos neonatos, indicando que a hiperglicemia neonatal promove peroxidação lipídica. Os níveis de TBA-RS refletem a quantidade de malondialdeído, produto final da peroxidação lipídica (Halliwell e Gutteridge 2007). Portanto, o aumento desse parâmetro promovido pela hiperglicemia neonatal sugere a indução de dano oxidativo aos lipídios causados pelo estresse oxidativo. Este resultado está de acordo com muitos estudos nos quais a hiperglicemia induz peroxidação lipídica no cérebro de ratos adultos (Aragno et al., 1999; Nakhaee et al., 2009; Pari e Murugan, 2007; Pierrefiche et al., 1993; Ulusu et al., 2003). É importante salientar que algumas espécies reativas, como peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, não são diretamente capazes de desencadear peroxidação lipídica. No entanto, o radical hidroxila e o peroxinitrito podem iniciar diretamente o dano oxidativo a lipídios (Halliwell e Gutteridge, 2007). Portanto, o aumento na produção de ânion superóxido pela

hiperglicemia neonatal pode ter levado à produção de outras espécies reativas, que diretamente podem iniciar a peroxidação lipídica.

Finalmente, em conjunto os nossos resultados sugerem que a hiperglicemia neonatal aumenta os níveis de ânion superóxido no cérebro, aumenta as atividades de G6PD, 6PGD e NADPH oxidase, enquanto aumenta a peroxidação lipídica, apesar da elevação das atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSHPx). Estes efeitos podem apontar possíveis alvos terapêuticos a serem estudado nesta condição patológica. Neste ponto cabe ressaltar que o sistema nervoso central é altamente sensível ao estresse oxidativo devido ao seu alto consumo de oxigênio, ao seu alto teor de ferro e de lipídeos, especialmente ácidos graxos poliinsaturados, e a baixa atividade das defesas antioxidantes (Halliwell, 2001). Considerando que o estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre a produção de radicais livres e defesas antioxidantes, e que a hiperglicemia neonatal provoca aumento de espécies reativas (ânion superóxido) e dano a lipídios, postula-se que o estresse oxidativo possa contribuir, juntamente com outros mecanismos, para os possíveis danos neurológicos induzidos pela hiperglicemia em um período crucial do desenvolvimento cerebral.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no trabalho podemos concluir que:

O modelo de diabetes neonatal induzido por uma única administração de STZ (100 mg/Kg de peso corporal) proposto neste trabalho pode contribuir para investigação dos mecanismos pelos quais a hiperglicemia promove danos em vários órgãos, pois os níveis plasmáticos de glicose são semelhantes aos encontrados em pacientes com a diabetes neonatal.

A hiperglicemia neonatal aumentou significativamente a atividade das enzimas da via das pentoses fosfato, glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e 6-fosfogluconato-desidrogenase (6PGD) em homogeneizados de cérebro total de ratos neonatos.

O conteúdo de ânion superóxido e a atividade da NADPH oxidase foram aumentados pela hiperglicemia neonatal em cérebro de ratos.

Além disso, a hiperglicemia neonatal foi capaz de induzir peroxidação lipídica através da medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em cérebro total de ratos neonatos.

Por fim, as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSHPx) foram aumentadas na presença de hiperglicemia neonatal em de cérebro total de ratos.

Sendo assim, concluímos que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo pelo qual a hiperglicemia neonatal induz dano ao sistema nervoso central por aumentar a produção de espécies reativas ($O_2^{\bullet-}$), induzir lipoperoxidação (TBA-RS) e por alterar a atividade das principais enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GSHPx).

8. REFERÊNCIAS

- Aguilar-Bryan, L., e Bryan, J. (2008). Neonatal diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29, 265-291.
- Ahren, B., e Skoglund, G. (1989). Insulin secretion in neonatally streptozotocin-injected mice. *Diabetes Res* 11, 185-189.
- Aragno, M., Parola, S., Tamagno, E., Brignardello, E., Manti, R., Danni, O., e Boccuzzi, G. (2000). Oxidative derangement in rat synaptosomes induced by hyperglycaemia: restorative effect of dehydroepiandrosterone treatment. *Biochem Pharmacol* 60, 389-395.
- Aragno, M., Tamagno, E., Gatto, V., Brignardello, E., Parola, S., Danni, O., e Boccuzzi, G. (1999). Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26, 1467-1474.
- Arima, T., Drewell, R.A., Arney, K.L., Inoue, J., Makita, Y., Hata, A., Oshimura, M., Wake, N., e Surani, M.A. (2001). A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* 10, 1475-1483.
- Arrick, D.M., Sun, H., Patel, K.P., e Mayhan, W.G. (2011). Chronic resveratrol treatment restores vascular responsiveness of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H696-703.
- Baynes, J.W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40, 405-412.
- Baynes, J.W., e Thorpe, S.R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48, 1-9.
- Behl, C., e Moosmann, B. (2002). Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med* 33, 182-191.
- Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., e Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65, 1865-1874.
- Biessels, G.J., van der Heide, L.P., Kamal, A., Bleyss, R.L., e Gispen, W.H. (2002). Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* 441, 1-14.
- Boveris, A. (1998). Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)* 58, 350-356.

Boveris, A., e Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.

Bryan, J., Crane, A., Vila-Carriles, W.H., Babenko, A.P., e Aguilar-Bryan, L. (2005). Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. *Curr Pharm Des* 11, 2699-2716.

Chang, K.C., Chung, S.Y., Chong, W.S., Suh, J.S., Kim, S.H., Noh, H.K., Seong, B.W., Ko, H.J., e Chun, K.W. (1993). Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 266, 992-1000.

Chen, Y.Q., Su, M., Walia, R.R., Hao, Q., Covington, J.W., e Vaughan, D.E. (1998). Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273, 8225-8231.

Cohen, M.V. (1989). Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? *Ann Intern Med* 111, 918-931.

Craven, P.A., Davidson, C.M., e DeRubertis, F.R. (1990). Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes* 39, 667-674.

Cumaoglu, A., Ozansoy, G., Irat, A.M., Aricioglu, A., Karasu, C., e Ari, N. (2011). Effect of long term, non cholesterol lowering dose of fluvastatin treatment on oxidative stress in brain and peripheral tissues of streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 654, 80-85.

Donne, I.D., Ranieri, R., Roberto, C., Daniela, G., e Aldo, M. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52:601-623.

Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., e Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12222-12226.

Edghill, E.L., Dix, R.J., Flanagan, S.E., Bingley, P.J., Hattersley, A.T., Ellard, S., e Gillespie, K.M. (2006). HLA genotyping supports a nonautoimmune etiology in patients diagnosed with diabetes under the age of 6 months. *Diabetes* 55, 1895-1898.

Elsner, M., Tiedge, M., Guldbakke, B., Munday, R., e Lenzen, S. (2002). Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia* 45, 1542-1549.

Ferreira, A.L.A, Matsubara, L.S., (1997). Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Ver. Ass. Med. Brasil. 43: 61-68.

Flanagan, S.E., Patch, A.M., Mackay, D.J., Edghill, E.L., Gloyn, A.L., Robinson, D., Shield, J.P., Temple, K., Ellard, S., and Hattersley, A.T. (2007). Mutations in ATP-sensitive K⁺ channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood. *Diabetes* 56, 1930-1937.

Flechtner, I., Vaxillaire, M., Cave, H., Scharfmann, R., Froguel, P., and Polak, M. (2008). Neonatal hyperglycaemia and abnormal development of the pancreas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22, 17-40.

Fosel, S. (1995). Transient and permanent neonatal diabetes. *Eur J Pediatr* 154, 944-948.

Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44, 147-159.
Frosali, S., Di Simplicio, P., Perrone, S., Di Giuseppe, D., Longini, M., Tanganelli, D., and Buonocore, G. (2004). Glutathione recycling and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of term and preterm newborns at birth. *Biol Neonate* 85, 188-194.

Gach, A., Wyka, K., Malecki, M.T., Noczynska, A., Skupien, J., Nazim, J., Szalecki, M., Bodalski, J., Sieradzki, J., and Mlynarski, W. (2007). Islet-specific antibody seroconversion in patients with long duration of permanent neonatal diabetes caused by mutations in the KCNJ11 gene. *Diabetes Care* 30, 2080-2082.

Geraldes, P., and King, G.L. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 106, 1319-1331.

Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 107, 1058-1070.

Glaser, B., Kesavan, P., Heyman, M., Davis, E., Cuesta, A., Buchs, A., Stanley, C.A., Thornton, P.S., Permutt, M.A., Matschinsky, F.M., and Herold, K.C. (1998). Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* 338, 226-230.

Gloyn, A.L. (2003). Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Hum Mutat* 22, 353-362.

Goldin, A., Beckman, J.A., Schmidt, A.M., and Creager, M.A. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114, 597-605.

Greeley, S.A., Tucker, S.E., Worrell, H.I., Skowron, K.B., Bell, G.I., e Philipson, L.H. (2010). Update in neonatal diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17, 13-19.

Gupte, S.A., Kaminski, P.M., Floyd, B., Agarwal, R., Ali, N., Ahmad, M., Edwards, J., e Wolin, M.S. (2005). Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H13-21.

Gupte, S.A., Levine, R.J., Gupte, R.S., Young, M.E., Lionetti, V., Labinskyy, V., Floyd, B.C., Ojaimi, C., Bellomo, M., Wolin, M.S., e Recchia, F.A. (2006). Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 41, 340-349.

Gurgel, L.C., e Moises, R.S. (2008). [Neonatal diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52, 181-187.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721-724.

Halliwell, B. (1996). Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 24, 1023-1027.

Halliwell, B., e Gutteridge, M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3^aed. New York: Oxford University Press Inc.

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685-716.

Halliwell, B., e Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186, 1-85.

Halliwell, B., e Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142, 231-255.

Halliwell B., e Gutteridge J.M. (2007). Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free Rad. Biol. Med.* Oxford University Press Inc., Oxford:187–267

Heller, B., Burkle, A., Radons, J., Fengler, E., Jalowy, A., Muller, M., Burkart, V., e Kolb, H. (1994). Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375, 597-602.

Huang, W.C., Juang, S.W., Liu, I.M., Chi, T.C., e Cheng, J.T. (1999). Changes of superoxide dismutase gene expression and activity in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* 275, 25-28.

Inagaki, N., Gono, T., Clement, J.P.t., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., e Bryan, J. (1995). Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270, 1166-1170.

- Inoguchi, T., Battan, R., Handler, E., Sportsman, J.R., Heath, W., e King, G.L. (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11059-11063.
- Kabay, S.C., Ozden, H., Guven, G., Ustuner, M.C., Degirmenci, I., Olgun, E.G., e Unal, N. (2009). Protective effects of vitamin E on central nervous system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Invest Med* 32, E314-321.
- Karunanayake, E.H., Hearse, D.J., e Mellows, G. (1976). Streptozotocin: its excretion and metabolism in the rat. *Diabetologia* 12, 483-488.
- Kumar, J.S., e Menon, V.P. (1993). Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism* 42, 1435-1439.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51, 216-226.
- Marklund, S.L., Midander, J., e Westman, G. (1984). CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in glutathione-deficient human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 798, 302-305.
- Marks, D.B., Marks, A.D., e Smith, C.M. (1996). *Basic Medical Biochemistry: a clinical approach*. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. P. 143.
- Martins, R.N., Stokes, G.B., e Masters, C.L. (1986). Regulation of liver and brain hexose monophosphate dehydrogenases by insulin and dietary intake in the female rat. *Mol Cell Biochem* 70, 169-175.
- Maxwell, S.R. (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49, 345-361.
- Mayhan, W.G., Arrick, D.M., Patel, K.P., e Sun, H. (2010). Exercise training normalizes impaired NOS-dependent responses of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H1013-1020.
- McCord, J.M., e Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 244, 6049-6055.
- McLennan, S.V., Heffernan, S., Wright, L., Rae, C., Fisher, E., Yue, D.K., e Turtle, J.R. (1991). Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* 40, 344-348.
- Metz, C., Cave, H., Bertrand, A.M., Deffert, C., Gueguen-Giroux, B., Czernichow, P., e Polak, M. (2002). Neonatal diabetes mellitus: chromosomal analysis in transient and permanent cases. *J Pediatr* 141, 483-489.

Nakhaee, A., Bokaeian, M., Akbarzadeh, A., e Hashemi, M. (2009). Sodium tungstate attenuate oxidative stress in brain tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res* 136, 221-231.

Njolstad, P.R., Oddmund, S., Cuesta-Munoz, A., et al. (2001). Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 344:1588-1592.

Pari, L., e Murugan, P. (2007). Tetrahydrocurcumin prevents brain lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* 10, 323-329.

Patel, K.P., Mayhan, W.G., Bidasee, K.R., e Zheng, H. (2010). Enhanced angiotensin II-mediated central sympathoexcitation in streptozotocin-induced diabetes: role of superoxide anion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300, R311-320.

Pearson, E.R., Flechtner, I., Njolstad, P.R., Malecki, M.T., Flanagan, S.E., Larkin B., et al., (2006). The Neonatal Diabetes International Collaborative Group. Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N Engl J Med.* 355:467-77.

Pieper, A.A., Brat, D.J., Krug, D.K., Watkins, C.C., Gupta, A., Blackshaw, S., Verma, A., Wang, Z.Q., e Snyder, S.H. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3059-3064.

Pierrefiche, G., Topall, G., Courboin, G., Henriet, I., e Laborit, H. (1993). Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 80, 211-223.

Pitocco, D., Zaccardi, F., Di Stasio, E., Romitelli, F., Santini, S.A., Zuppi, C., e Ghirlanda, G. (2010). Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud* 7, 15-25.

Polak, M., e Cave, H. (2007). Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. *Orphanet J Rare Dis* 2, 12.

Polak, M., e Shield, J. (2004). Neonatal and very-early-onset diabetes mellitus. *Semin Neonatol* 9, 59-65.

Portha, B., Levacher, C., Picon, L., e Rosselin, G. (1974). Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* 23, 889-895.

Prohaska, J.R., Oh, S.H., Hoekstra, W.G., e Ganther, H.E. (1977). Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium. *Biochem Biophys Res Commun* 74, 64-71.

Rains, J.L., e Jain, S.K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 50, 567-575.

Ramasamy, R., e Goldberg, I.J. (2010). Aldose reductase and cardiovascular diseases, creating human-like diabetic complications in an experimental model. *Circ Res* 106, 1449-1458.

Rauscher, F.M., Sanders, R.A., e Watkins, J.B., 3rd (2001). Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 15, 159-164.

Reagan, L.P., Magarinos, A.M., e McEwen, B.S. (1999). Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. *Ann N Y Acad Sci* 893, 126-137.

Reznick, A.Z., e Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233, 357-363.

Sagen, J.V., Raeder, H., Hathout, E., Shehadeh, N., Gudmundsson, K., Baevre, H., Abuelo, D., Phornphutkul, C., Molnes, J., Bell, G.I., Gloyn, A.L., Hattersley, A.T., Molven, A., Sovik, O., e Njolstad, P.R. (2004). Permanent neonatal diabetes due to mutations in *KCNJ11* encoding Kir6.2: patient characteristics and initial response to sulfonylurea therapy. *Diabetes* 53, 2713-2718.

Salvador, M., e Henriques, J.A.P. (2004). Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1ª edição. Canoas, RS: editora Ulbra.

Sanders, R.A., Rauscher, F.M., e Watkins, J.B., 3rd (2001). Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 15, 143-149.

Schein, P.S., e Loftus, S. (1968). Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res* 28, 1501-1506.

Schwitzgebel, V.M., Mamin, A., Brun, T., Ritz-Laser, B., Zaiko, M., Maret, A., Jornayvaz, F.R., Theintz, G.E., Michielin, O., Melloul, D., e Philippe, J. (2003). Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 4398-4406.

Serpillon, S., Floyd, B.C., Gupte, R.S., George, S., Kozicky, M., Neito, V., Recchia, F., Stanley, W., Wolin, M.S., e Gupte, S.A. (2009). Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H153-162.

Shiba, T., Inoguchi, T., Sportsman, J.R., Heath, W.F., Bursell, S., e King, G.L. (1993). Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol* 265, E783-793.

Shield, J.P., Gardner, R.J., Wadsworth, E.J., Whiteford, M.L., James, R.S., Robinson, D.O., Baum, J.D., e Temple, I.K. (1997). Aetiopathology and genetic basis of neonatal diabetes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 76, F39-42.

Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 27, 916-921.

Stoy, J., Edghill, E.L., Flanagan, S.E., Ye, H., Paz, V.P., Pluzhnikov, A., Below, J.E., Hayes, M.G., Cox, N.J., Lipkind, G.M., Lipton, R.B., Greeley, S.A., Patch, A.M., Ellard, S., Steiner, D.F., Hattersley, A.T., Philipson, L.H., e Bell, G.I. (2007). Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15040-15044.

Suzuki, S., Makita, Y., Mukai, T., Matsuo, K., Ueda, O., e Fujieda, K. (2007). Molecular basis of neonatal diabetes in Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 3979-3985.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50, 537-546.

Takada, J., Machado, M.A., Peres, S.B., Brito, L.C., Borges-Silva, C.N., Costa, C.E., Fonseca-Alaniz, M.H., Andreotti, S., e Lima, F.B. (2007). Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism* 56, 977-984.

Temple, I.K., Gardner, R.J., Robinson, D.O., Kibirige, M.S., Fergusson, A.W., e Baum, J.D. (1996). Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localized to chromosome 6q22-q23. *Hum. Mol. Genet.* 5:1117-1121.

Trumpower, B.L. (1990). The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem* 265, 11409-11412.

Tsai, K.J., Hung, I.J., Chow, C.K., Stern, A., Chao, S.S., e Chiu, D.T. (1998). Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphate-dehydrogenase-deficient granulocytes. *FEBS Lett* 436, 411-414.

Uchigata, Y., Yamamoto, H., Kawamura, A., e Okamoto, H. (1982). Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem* 257, 6084-6088.

Ulusu, N.N., Sahilli, M., Avci, A., Canbolat, O., Ozansoy, G., Ari, N., Bali, M., Stefek, M., Stolc, S., Gajdosik, A., and Karasu, C. (2003). Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res* 28, 815-823.

Valampampil, J.J., Chirakkarot, S., Savida, P., e Omana, S. (2009). Clinical profile and etiology of diabetes mellitus with onset at less than 6 months of age. *Kaohsiung J Med Sci* 25, 656-662.

Vaxillaire, M., Dechaume, A., Busiah, K., Cave, H., Pereira, S., Scharfmann, R., de Nanclares, G.P., Castano, L., Froguel, P., e Polak, M. (2007). New ABCC8 mutations in relapsing neonatal diabetes and clinical features. *Diabetes* 56, 1737-1741.

Vikramadithyan, R.K., Hu, Y., Noh, H.L., Liang, C.P., Hallam, K., Tall, A.R., Ramasamy, R., e Goldberg, I.J. (2005). Human aldose reductase expression accelerates diabetic atherosclerosis in transgenic mice. *J Clin Invest* 115, 2434-2443.

Ward, R.J., e Peters, T.J. (1995). In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. (Editores). *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. New York: Churchill Livingstone. 765-777.

Yamamoto, H., Uchigata, Y., e Okamoto, H. (1981). Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 294, 284-286.