

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

**ESTRESSE OXIDATIVO COMO UM MECANISMO DOS EFEITOS
DELETÉRIOS CAUSADOS PELA HIPERGLICEMIA NEONATAL EM
CÉREBRO DE RATOS**

Andrea Pereira Rosa

Orientador
Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Coorientador
Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araújo

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

Porto Alegre, 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Pereira Rosa, Andrea

Estresse oxidativo como um mecanismo dos efeitos deletérios causados pela hiperglicemia neonatal em cérebro de ratos / Andrea Pereira Rosa. -- 2018.

115 f.

Orientador: Carlos Severo Dutra-Pilho.

Coorientador: Alex Sander da Rosa Araujo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Diabetes neonatal. 2. Estresse oxidativo. 3. Morte celular. 4. Sistema de defesa antioxidante. I. Severo Dutra-Pilho, Carlos, orient. II. Sander da Rosa Araujo, Alex, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*Aos meus pais Enio e Ivete, pelo apoio,
incentivo e amor incondicional.*

*A minha vó professora Olga, meu
exemplo (“In memoriam”).*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus professores Dr. Carlos Severo Dutra Filho meu orientador e Dr. Alex Sander da Rosa Araujo meu co-orientador. Ambos por terem me aceitado nessa parceria como orientada, muito obrigada pelos aprendizados, pelos conhecimentos compartilhados, e acima de tudo pelos conselhos, que com certeza ultrapassam a simples relação de orientador e orientado gerando, finalmente esse vínculo de amizade.

Ao professor Guilherme Baldo pela excelente e brilhante parceria.

Aos excelentes bolsistas de iniciação científica Felipe, Thales, Bruna e Débora, todos fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Espécies Ativas de Oxigênio do Departamento de Fisiologia, Alexandre, Rayane e Cristina, por me ensinarem tudo o que não sabia sobre “Western Blot”. Com certeza a ajuda de vocês foi fundamental para o sucesso deste trabalho.

À minha amiga e irmã Alessandra pela oportunidade de conhecer este grupo de pesquisa e consequentemente de estar realizando esse sonho de ser Doutora em bioquímica. Obrigada por acreditar, apoiar e incentivar, mesmo que de longe.

À minha amiga especial Carol, por estar sempre ao meu lado literalmente em todos os momentos, obrigada. Teu apoio foi incondicional esses anos todos e continuará sendo sempre.

A todo apoio que tive de amigos especiais como a Gabriele e o Ebergton.

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.

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.

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

ÍNDICE

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13

PARTE I.

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Diabetes.....	15
1.2 Diabetes Neonatal.....	16
1.3 Espécies Reativas.....	21
1.4 Sistema de Defesa Antioxidante.....	23
1.5 Estresse Oxidativo.....	27
1.6 Estresse Oxidativo e Hiperglicemia.....	28
1.7 Morte Celular.....	30
1.8 Morte Celular e Hiperglicemia.....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	37
3. OBJETIVOS.....	38
4. METODOLOGIA.....	40
4.1 Animais.....	40
4.1.1 Indução do modelo de hiperglicemia neonatal.....	41
4.2 Preparação do tecido.....	42
4.3 Considerações éticas.....	42

PARTE II.

5. RESULTADOS	45
----------------------------	-----------

5.1 Artigo aceito pela revista “Metabolic Brain Disease” intitulado: “Neonatal hyperglycemia induces cell death in the rat brain”	45
5.2 Artigo submetido à revista “Biomedicine and Pharmacotherapy” intitulado: “Neonatal hyperglycemia alters the expression of oxidative stress-related proteins”	54
5.3 Resultado da Medida do Peróxido de Hidrogênio.....	74

PARTE III.

6. DISCUSSÃO.....	76
7. CONCLUSÕES.....	92
8. REFERÊNCIAS	95

RESUMO

A diabetes é um distúrbio endócrino do metabolismo dos carboidratos clinicamente caracterizada por hiperglicemia, resultante da incapacidade do organismo em secretar insulina, defeitos na sua ação ou ambos. Na última década, houve um crescente aumento no número de trabalhos sobre a múltipla hereditariedade de um tipo de diabetes rara e não imunológica diagnosticada antes dos 6 meses de vida, a diabetes neonatal (DN). A maioria dos estudos, existentes na literatura referentes à DN, foi realizada em pacientes e aborda principalmente aspectos clínicos, etiológicos e terapêuticos. No entanto, existe uma deficiência de estudos realizados em modelos animais, a fim de avaliar danos moleculares em tecidos submetidos à hiperglicemia neonatal. Recentemente, as consequências da diabetes no sistema nervoso central (SNC) têm recebido maior atenção, uma vez que os recentes estudos mostram que a hiperglicemia é capaz de promover a ruptura da homeostase redox no cérebro de ratos. Neste sentido, o estresse oxidativo (EO) parece representar um dos mecanismos pelos quais a hiperglicemia danifica o tecido cerebral em um período crucial de desenvolvimento. Diante disso, o presente trabalho objetivou estudar não só a relação do EO com a hiperglicemia neonatal em cérebro de ratos, mas também avaliar se os danos oxidativos promovidos pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) na condição hiperglicêmica podem estar envolvidos no processo de morte celular neuronal. Para isso, foram utilizados ratos Wistar de 5 dias de vida, divididos em dois grupos: controle e diabético. O modelo de diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) em uma única dose de 100 mg/Kg peso corporal, sendo que foram considerados diabéticos os ratos com glicemia >200mg/dL. Os animais foram sacrificados com 10 dias de vida, ou seja, 5 dias após a administração de STZ. O cérebro total dos animais foi homogeneizado, centrifugado e o homogeneizado utilizado para as medidas de parâmetros de EO e expressão proteica. Além disso, o cérebro total foi utilizado em cortes histológicos para análise do parâmetro de morte celular neuronal, avaliada pela técnica FluoroJade C. Os parâmetros de EO analisados foram o metabolismo da glutathione, que engloba a atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST), glutathione redutase (GR), glutamato-cisteína ligase (GCL) e a

determinação da concentração de glutathiona total e reduzida (GSH/GSSG). A medida do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também foi avaliada, juntamente com a quantificação proteica por “Western Blot” do fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2 (Nrf2), da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT), da glutathiona peroxidase (GPx), da heme oxigenase 1 (HO-1) e da tiorredoxina (TRX). Os parâmetros relativos à sobrevivência e morte celular avaliados foram a quantificação proteica por “Western Blot” da proteína cinase B (AKT), da proteína cinase B fosforilada (p-AKT), da glicogênio sintase cinase 3 β (GSK3 β), da p38 proteína cinase ativada por mitógenos (p38), proteína cinase c-Jun N-terminal (JNK), da célula-B de linfoma 2 (Bcl2) e da proteína X associada a Bcl2 (Bax). Os ratos submetidos ao modelo de hiperglicemia neonatal não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros relacionados ao metabolismo da glutathiona (GST, GR, GCL e GSH/GSSG), tampouco nas concentrações de H_2O_2 quando comparados ao grupo controle. A expressão proteica do Nrf2 foi diminuída no grupo diabético, enquanto que a expressão da CAT, HO-1 e TRX se apresentaram aumentadas no grupo diabético quando comparado ao grupo controle. Não foram encontradas diferenças significativas nas expressões proteicas da SOD e GPx. As expressões proteicas das proteínas p38 e Bcl2 foram aumentadas, enquanto a expressão da p-AKT se mostrou reduzida no grupo diabético. Já com relação à expressão das proteínas JNK, GSK3 β e Bax não houve diferença significativa nos grupos analisados. Finalmente, com relação à técnica que avaliou morte celular neuronal, o grupo diabético apresentou três vezes mais marcações de neurônios fluorescentes, ou seja, com morte celular quando comparado com o grupo controle. Portanto, esses resultados sugerem que o EO pode representar um mecanismo envolvido nos efeitos da hiperglicemia no SNC de ratos neonatos. Além disso, as alterações na expressão de proteínas envolvidas em vias de sobrevivência/morte celular colaboram para o resultado de morte celular verificado no cérebro de animais com hiperglicemia neonatal e mostram os efeitos nocivos da DN em um período crucial de desenvolvimento cerebral.

Palavras-Chave: hiperglicemia neonatal; diabetes neonatal; estresse oxidativo; sistema de defesa antioxidante; morte celular.

ABSTRACT

Diabetes is an endocrine disorder of the carbohydrates metabolism clinically characterized by hyperglycemia, resulting from the inability of the body to secrete insulin, defects in its action and both. In the last decade, there has been an increasing number of studies about neonatal diabetes (DN), a type of diabetes non-immunological diagnosed before 6 months of life. The most studies related to DN was developed in patients and mainly deal with clinical, etiological and therapeutic aspects. However, there is a few of studies in animal models in order to assess molecular damage in tissues submitted to neonatal hyperglycemia. Recently, the consequences of diabetes in the central nervous system (CNS) have received increased attention, as recent studies show that hyperglycemia is capable of promoting the rupture of redox homeostasis in the rat brain. Wherefore, the present work aimed to study not only the relationship between EO and neonatal hyperglycemia in rat brain, but also evaluate if the oxidative damage promoted by reactive oxygen species (ROS) in the hyperglycemic condition may be involved in the neuronal cell death process. For this, 5-day-old Wistar rats were used to promote the induction of diabetes, which was done with a single intraperitoneal streptozotocin (STZ) administration (100 mg/kg body weight). Rats with glycemia > 200 mg/dL were considered diabetic. The rats were sacrificed in 10 days of life, wherefore five days after STZ administration. The whole brain of the rats was homogenized, centrifuged and homogenized used for EO techniques and protein expression measurements. In addition, total brain was used in histological sections for analysis of the neuronal cell death. The EO parameters evaluated were the activity of the glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), glutamate-cystein ligase (GCL) and the determination of total and reduced glutathione concentration (GSH/GSSG). Hydrogen peroxide (H₂O₂) was evaluated along with Western Blot protein quantification of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), heme oxygenase (HO-1) and thioredoxin (TRX). Relative to cell survival and death were evaluated protein kinase B (Akt), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), p38 mitogen-activated protein kinase (p38), c-Jun amino-terminal kinases (JNK), phosphorylated c-Jun amino-terminal kinases (p-JNK), B-cell

lymphoma 2 (Bcl2) and Bcl2-associated protein X (Bax) by western blot. The neonatal hyperglycemia was not able to promote significant differences in the glutathione metabolism (GST, GR, GCL and GSH / GSSG) nor in the H₂O₂ measurement when compared to the control group. Nrf2 protein expression was decreased whereas CAT, HO-1 and TRX protein expression were increased in the diabetic group when compared to the control group. No significant differences were found in the protein expression of SOD and GPx. Also, p38 and Bcl2 protein expression was increased, whereas p-Akt was decreased in the diabetic group, already regarding the expression of JNK, p-JNK, Jsk3 β and Bax proteins there were no significant difference in the analyzed groups. Finally, relative to neuronal cell death technique, the diabetic group presented three fold more neuronal cell death with fluorescent marking characteristic, when compared to the control group. Therefore, these results suggest that OE may represent a mechanism involved in the effects of hyperglycemia in the central nervous system of neonatal rats. In addition, changes in the expression of proteins involved in survival/death cell pathways contribute to the outcome of cell death, result found in the brain of animals with neonatal hyperglycemia and finally show the harmful effects of neonatal diabetes in a crucial period of brain development.

Keywords: neonatal hyperglycemia; neonatal diabetes; oxidative stress; antioxidant defense system; death cellular.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
AGEs	produtos de glicação avançada
ATP	adenosina trifosfato
AKT	proteína cinase B
p-AKT	proteína cinase B fosforilada
Bax	proteína X associada a Bcl2
Bcl2	célula-B de linfoma 2
CAT	catalase
DAG	diacilglicerol
DN	diabetes neonatal
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNT	diabetes neonatal transitória
DNP	diabetes neonatal permanente
EO	estresse oxidativo
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GCL	glutamato-cisteína ligase
GFAT	glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase
G6PD	glicose-6-fosfato-desidrogenase
6PGD	6-fosfogluconato-desidrogenase
GLUT2	proteína transportadora de glicose
GPx	glutaciona peroxidase
GSK3β	glicogênio sintase quinase 3 beta
GST	glutaciona S-transferase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona reduzida
GSH/GSSG	concentração de glutaciona total e reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
HO-1	heme oxigenase 1
HO-2	heme oxigenase 2
H₂O₂	peróxido de hidrogênio

IPF-1	“insulin promoter factor 1”
JNK	proteína quinase c-Jun N-terminal
K⁺	potássio
Kir	poro do canal
NFκB	fator de transcrição nuclear pleiotrópico
Nrf2	fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2
p38	p38 proteína cinase ativada por mitógenos
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	fosfatidilinositol 3-cinase
PKC	proteína cinase C
MAPK	proteínas cinases ativadas por mitógenos
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
STZ	estreptozotocina
SUR	receptores de sulfonilureia
TBA-RS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRX	tiorredoxina
TrxR	tiorredoxina redutase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito da hiperglicemia neonatal sobre a medida do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão (n= 10-16) para experimentos independentes realizados em duplicata. Resultados com valores de $*p < 0,05$ foram considerados significativos (teste *t* Student).

Figura 2: Esquema dos principais resultados obtidos no modelo de hiperglicemia neonatal induzido por estreptozotocina (STZ). (p38) p38 proteína cinase ativada por mitógeno; (p-AKT) proteína cinase B fosforilada; (Nrf2) fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2; (CAT) catalase; (Bcl2) célula-B de linfoma 2; (Trx) tiorredoxina; (HO-1) heme oxigenase 1.

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes

A diabetes é uma desordem metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia resultante da incapacidade do pâncreas em produzir uma quantidade suficiente de insulina ou quando o organismo é incapaz de, efetivamente, utilizar a insulina produzida ((Ncd-Risc), 2016). A insulina é um hormônio produzido no pâncreas em resposta a diversos estímulos sendo que a glicose é considerada o principal determinante da sua secreção (Joshi *et al.*, 2007; Asmat *et al.*, 2016). Nesta patologia, coexistem distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (Joshi *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011).

Atualmente, segundo a Organização Mundial da Saúde a prevalência a nível global da diabetes é de 8,5% na população adulta e aproximadamente 422 milhões conviviam com a diabetes em 2014, portanto esta doença pode ser considerada uma epidemia ((Ncd-Risc), 2016). Além disso, já que a diabetes continua sendo uma questão de saúde pública, torna-se importante enfatizar os efeitos econômicos desta doença e a importância de estudos relativos à mesma.

A diabetes é comumente classificada em dois tipos, a do tipo 1 e a do tipo 2. Na diabetes do tipo 1, os pacientes são normalmente diagnosticados na infância e adolescência e sua etiologia é baseada na destruição autoimune das células beta pancreáticas, o que acarreta em uma deficiência na secreção de insulina, tornando os pacientes dependentes de insulina por toda a vida. Por

outro lado, a diabetes do tipo 2 se desenvolve principalmente na idade adulta e se caracteriza pela resistência tecidual à ação da insulina associada à insuficiência pancreática na secreção deste hormônio. Normalmente, está relacionada à obesidade, falta de atividade física e alimentação não saudável. Trata-se do tipo mais comum, representando 90% dos casos em todo o mundo e o tratamento pode envolver mudanças de estilo de vida, perda de peso, medicação oral ou até mesmo injeções de insulina (Olokoba *et al.*, 2012; Davey *et al.*, 2014; (Ncd-Risc), 2016). Além da diabetes do tipo 1 e do tipo 2, existem outros tipos de diabetes, como a DN.

1.2 Diabetes Neonatal (DN)

DN é uma doença rara com incidência de aproximadamente de 1 para 20.000 a 500.000 nascimentos no mundo (Aguilar-Bryan e Bryan, 2008; Grulich-Henn *et al.*, 2010; Habeb *et al.*, 2012; lafusco *et al.*, 2012) na qual, devido à produção ou liberação inadequada de insulina, a terapia exógena acaba sendo requerida (Fösel, 1995; Polak e Cavé, 2007).

Um problema potencial de diagnóstico da DN é a sua diferenciação da diabetes do tipo 1. A DN é diagnosticada clinicamente pela presença de hiperglicemia antes dos seis primeiros meses de vida dos pacientes (Takagi *et al.*, 2013). Vários estudos indicam que a maioria das causas identificadas de diabetes, antes dos seis meses de idade, é de origem monogênica (Shield *et al.*, 1997; Flanagan *et al.*, 2007) sem evidência de marcadores de destruição autoimune das células beta (β) (Edghill *et al.*, 2006; Gach *et al.*, 2007).

Os níveis hiperglicêmicos dos pacientes com DN podem normalizar

espontaneamente, caracterizando a diabetes neonatal transitória (DNT) que abrange 50 a 60% dos casos de DN. Por outro lado, o alto nível glicêmico pode persistir durante o resto da vida na diabetes neonatal permanente (DNP) (Polak e Shield, 2004; Takagi *et al.*, 2013). Os pacientes com DN apresentam como principais sintomas: hiperglicemia, retardo no crescimento intrauterino, falha no desenvolvimento, baixo peso corporal, febre, desidratação e acidose com cetonúria, retinopatia prematura, sepse, hemorragia intraventricular severa e internação hospitalar prolongada, além dessa doença aumentar a mortalidade e a morbidade de crianças prematuras (Ertl *et al.*, 2006; Garg *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2006; Hays *et al.*, 2006; Fösel, 1995).

A hiperglicemia neonatal é comum em bebês prematuros com baixo peso ao nascer (Hays *et al.*, 2006) e tem sido vinculada a inúmeras complicações como

Na última década, houve um aumento no número 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 sobre os genes envolvidos em toda a cadeia de controle da homeostasia da glicose. A DN é geneticamente heterogênea, com pelo menos 20 genes causais diferentes. 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).

Como citado acima, a etiologia desta doença tem uma origem heterogênea; portanto, apenas as causas mais comuns de DN serão

comentadas, tais como:

- Anomalias no braço longo do cromossomo 6

A maioria dos pacientes com DNT apresenta 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 adenosina trifosfato (ATP)-sensível

A liberação de insulina ocorre quando a glicose entra na célula β pancreática através da ligação com a proteína transportadora de glicose (GLUT2), sendo então internalizada e fosforilada pela glicocinase, que a direciona para a via glicolítica, 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 (Gurgel e Moisés, 2008; Greeley *et al.*, 2010).

Os canais de potássio ATP-sensíveis têm 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 sulfonilureia (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 Moisés, 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 (Flehtner *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 (Støy *et al.*, 2007; Gurgel e Moisés, 2008).

- Mutações no gene da glicocinase

A glicocinase é uma enzima relevante 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 glicocinase, em que a maioria é heterozigota, reduzindo a entrada de glicose na rota glicolítica (Gloyn, 2003). Entretanto, existem mutações em homozigose sendo uma causa bastante rara e grave de DNP (Njølstad *et al.*, 2001; Polak e Shield, 2004).

- Mutações no gene *insulin promoter factor 1* (IPF-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 sulfonilureias. Essa é uma classe de fármacos utilizada no tratamento da diabetes tipo 2 que leva ao fechamento dos canais de potássio (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). Além disso, agentes hipoglicemiantes orais (tolbutamida, glibenclamida e glicazida) apresentam uma alternativa substituindo o tratamento clássico de injeções de insulina (Metz *et al.*, 2002; Aguilar-Bryan e Bryan, 2008).

Nas as últimas décadas, houve uma expansão nos estudos relacionados a diabetes neonatal, analisando o perfil clínico, a etiologia e o tratamento a ser preconizado durante o diagnóstico da DN. No entanto, 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. Evidências sugerem que o estresse oxidativo (EO) possa atuar como um destes mecanismos, sendo que o mesmo tem um papel fundamental na patogênese da diabetes e suas complicações (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2015). Além disso, tem sido postulado que os pacientes e ratos diabéticos estariam mais suscetíveis ao EO, visto que a presença de hiperglicemia é capaz de promover um aumento na produção de radicais livres (Baynes, 1991; Chang *et al.*, 1993; Baynes e Thorpe, 1999) e / ou um prejuízo nas defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1990; Mclennan *et al.*, 1991).

1.3 Espécies Reativas

Um radical livre é qualquer espécie química de existência independente que possui um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, os quais apresentam rotação paramagnética, configurando uma situação energeticamente instável (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A formação de radicais livres pode ser realizada mediante a perda ou ganho de um elétron de um não radical (Halliwell e Gutteridge, 2007). Sendo que um único radical pode iniciar uma sequência de reações de transferência de elétrons em cadeia (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).

No metabolismo celular aeróbio fisiológico, o O_2 aceita quatro elétrons sofrendo então uma redução tetravalente e formando finalmente duas moléculas de água (H_2O). A citocromo oxidase mitocondrial acrescenta quatro elétrons em cada molécula de O_2 , gerando então duas moléculas de H_2O (Bergendi *et al.*, 1999). Todavia, em torno de 5% do O_2 utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, produzindo possivelmente intermediários reativos como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}) e também o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Boveris e Chance, 1973).

Apesar de o ânion superóxido não danificar diretamente a molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios e proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2007), outras espécies reativas de oxigênio (ERO) acabam sendo geradas rapidamente a partir desse precursor. A ação catalítica da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) promove a redução de duas moléculas de ânion superóxido a peróxido de hidrogênio por dismutação espontânea.

Conseqüentemente, o peróxido de hidrogênio quando entra em contato com íons de cobre ou ferro gera radical hidroxila altamente reativo, capaz então de atacar e danificar todas as biomoléculas citadas acima (Halliwell, 2001). Além disso, a partir do ânion superóxido e do radical hidroxila também pode ser gerado o oxigênio singlet (1O_2), que não é um radical livre, mas uma forma reativa do oxigênio (O_2) capaz de oxidar diversas moléculas, como por exemplo, os lipídios de membrana, gerando hidroperóxidos lipídicos (Bergendi *et al.*, 1999).

O termo genérico ERO é utilizado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 ($O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet}), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlet (1O_2), o ácido hipocloroso (HOCl) e o ozônio (O_3) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) as principais representantes.

As espécies reativas estão presentes tanto em processos fisiológicos quanto em processos patológicos. Somente, um desequilíbrio entre os sistemas de formação e de remoção dessas espécies pode resultar em consequências patológicas, no qual essas espécies reativas podem oxidar moléculas biológicas incluindo proteínas, lipídios e DNA (Maxwell, 1995). Todavia, a célula possui um sistema de defesa eficiente que é capaz de neutralizar naturalmente estas espécies reativas formadas.

1.4 Sistema de Defesa Antioxidante

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não radicais às biomoléculas do organismo (Halliwell, 2012). O sistema de defesa antioxidante é classificado em enzimático e não-enzimático.

Com relação ao sistema de defesa enzimático, dentre as principais enzimas antioxidantes podemos citar a SOD, a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), 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 GPx em todas as regiões cerebrais (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O papel biológico da enzima SOD consiste em atuar como “scavenger” do íon superóxido (Fridovich, 1975; Halliwell e Gutteridge, 2007). 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 $O_2^{\bullet-}$ (ânion superóxido), formando peróxido de hidrogênio e oxigênio (Mccord e Fridovich, 1969; Halliwell e Gutteridge, 2007).

O H_2O_2 formado é degradado posteriormente pelas enzimas CAT e GPx. A enzima CAT irá catalisar a redução de uma molécula de H_2O_2 a H_2O e a 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 (Wood, 2006).

Já a enzima GPx atua removendo o H_2O_2 e outros peróxidos através do acoplamento de sua redução a H_2O com a concomitante oxidação da molécula glutathiona reduzida (GSH). A GPx atua dependendo da ação da enzima glutathiona redutase (GR), que catalisa a redução de GSSG a GSH utilizando NADPH como coenzima (Wendel, 1981). Existe uma GPx encontrada no citosol e na mitocôndria que requer selenocisteína como cofator, já a outra GPx existente localiza-se no citosol e é independente de selênio (Prohaska *et al.*, 1977).

Neste contexto, destaca-se a importância da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), limitante da via das pentoses fosfato que converte glicose-6-fosfato (G6P) em 6-fosfogluconolactona e reduz nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma oxidada ($NADP^+$) a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). O NADPH produzido é importante para fornecer uma proteção celular contra o EO por espécies reativas, pois detoxifica e regenera a forma GSH através da enzima GR (Tsai *et al.*, 1998; Frosali *et al.*, 2004).

Outras enzimas antioxidantes, como a glutathiona S-transferase (GST) e a tioredoxina também ajudam na remoção e inativação de ERO formada nas mitocôndrias (Zhang *et al.*, 2010). A tioredoxina contém o seu sítio ativo na parte Cys-Gly-Pro-Cys (Holmgren, 1968). Os elétrons provenientes do NADPH são transferidos para a tioredoxina redutase (TrxR), a qual é capaz de reduzir a tioredoxina através da redução das ligações dissulfeto (Hanschmann *et al.*, 2013). A TrxR é uma seleno proteína com grande especificidade de substrato, também regulada pelo fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2 (Nrf2) (Kim *et al.*, 2001).

Relacionado ao sistema de defesa antioxidante não enzimático podemos citar a molécula de glutathione que é um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) presente nos mamíferos em suas formas reduzida e oxidada, atingindo a concentração máxima no fígado. É o tiol mais abundante no meio intracelular, sendo sua capacidade redutora determinada pelo grupamento-SH. A função antioxidante da GSH se dá, em grande parte pela reação catalisada pela GPx, que reduz o H_2O_2 e peróxidos de lipídios, enquanto ocorre a conversão em GSSG. A GSSG por sua vez, é reduzida pela GR utilizando o NADPH e impedindo a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (Lu, 2013).

A síntese de GSH ocorre no citosol de todas as células a partir dos aminoácidos: glicina, cisteína e glutamato. A glutathione é produzida pela ação sucessiva de duas enzimas: glutamato cisteína-ligase (GCL) e glutathione-sintetase (GS). Na primeira reação, a enzima GCL, utilizando como substratos os aminoácidos glutamato e cisteína, forma o dipeptídeo γ -L-glutamil-L-cisteína. Na reação seguinte, esta molécula é combinada com a glicina na reação catalisada pela enzima GS, formando a GSH. A adenosina trifosfato (ATP) serve como co-substrato para ambas as enzimas. A GCL é a enzima chave limitante da síntese de GSH e é conhecida por regular o *turnover* de controle de GSH intracelular, ou seja, quando a concentração intracelular de GSH está baixa, a GCL é estimulada por retroalimentação negativa e a produção de GSH é então estimulada (Lu, 2013).

Um componente que também desempenha um papel importante na defesa oxidativa é o Nrf2 (He *et al.*, 2009). O Nrf2 atua na regulação da expressão e indução de uma série de proteínas e enzimas citoprotetoras. Estudos recentes com ratos *knockout* para o gene que codifica o Nrf2

mostraram um aumento substancial na toxicidade e nas doenças associadas com EO (Motohashi e Yamamoto, 2004; Ma e He, 2012). Existem evidências de que alterações no estado redox e o aumento da formação de espécies reativas podem acarretar na translocação do Nrf2 para o núcleo (Kweon *et al.*, 2006). A expressão anormal do Nrf2 tem sido associada com a hiperglicemia presente no diabetes (Zhao *et al.*, 2013). Conseqüentemente, o Nrf2 quando translocado para o núcleo tem a finalidade de induzir a expressão de várias proteínas de detoxificação e antioxidantes.

Neste contexto, destaca-se o papel da heme-oxigenase, proteína presente em todos os tecidos, que compreende dois subtipos a HO-1 e a HO-2, e que age como enzima chave na degradação do grupamento heme, um processo que leva a formação de quantidades equimolares de biliverdina, ferro livre e monóxido de carbono. No cérebro de rato adulto normal, a isoenzima de HO-2 é expressa constitutivamente e amplamente distribuída ao longo do neuroaxis mamífero, enquanto a HO-1, uma proteína de estresse que tem sua expressão baixa e restrita a pequenos grupos de neurônios e neuroglia (Ryter *et al.*, 2006). Vários estudos demonstraram que a expressão de HO-1 cerebral é marcadamente induzida por diversos fatores incluindo lesões cerebrais (Ryter *et al.*, 2006; Syapin, 2008). O gene da proteína HO-1 é induzido por estímulos nocivos (por exemplo, H₂O₂ e citocinas) em doenças cerebrais como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson e outras condições neuropatológicas. Além disso, um estudo recente demonstrou que a hiperglicemia induz a expressão de HO-1 mediante sinalização que envolve a formação de ERO (Yang *et al.*, 2016).

1.5 Estresse Oxidativo

Em situações fisiológicas, a produção de ERO e de ERN é em sua maior parte neutralizada pelos sistemas de defesa antioxidante do organismo. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e o sistema de defesa antioxidante presente na célula, levando então a instalação do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O EO pode ser resultado tanto da diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, ou ambas (Halliwell, 2001). A presença de espécies reativas em excesso pode ocasionar uma inadequada oxidação de biomoléculas, levando a um dano molecular e celular durante o EO, tendo como consequências: a adaptação das células, 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 EO quando comparado a outros tecidos, devido: ao elevado consumo de oxigênio (O_2); ao alto conteúdo de ferro, favorecendo a lipoperoxidação; ao alto conteúdo lipídico, principalmente lipídios de cadeias laterais altamente poli-insaturadas, que são extremamente suscetíveis à lipoperoxidação; e à reduzida defesa antioxidante, sendo os níveis de CAT particularmente baixos em muitas regiões cerebrais (Halliwell, 1996; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Recentemente, estudos têm demonstrado o envolvimento do EO nos mecanismos de danos moleculares e celulares aos tecidos em um amplo espectro de doenças humanas (Halliwell, 2001). Como por exemplo, o EO

parece estar associado aos danos neurológicos de várias doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer, Parkinson, as escleroses múltiplas e demência, entre outras (Reznick e Packer, 1994; Halliwell, 2001).

1.6 Estresse Oxidativo e Hiperglicemia

Muitas evidências sugerem que o EO 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 EO, visto que a presença de hiperglicemia é capaz de promover um aumento na produção de radicais livres (Baynes, 1991; Chang *et al.*, 1993; Baynes e Thorpe, 1999) 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 espécies reativas na condição metabólica presente na diabetes, tais como a oxidação da glicose, a glicação não enzimática de proteínas, a ativação da proteína cinase 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 EO, tanto pela geração direta de ERO, quanto mediante alteração no equilíbrio redox (Rains e Jain, 2011). Publicações recentes sugerem cinco principais mecanismos pelos quais a hiperglicemia induz EO 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 cinase 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 enzima 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. Na fase oxidativa da via das pentoses fosfato, a G6PD produz NADPH, cofator essencial para a atividade das enzimas GR 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. (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 (SNC) pelo ataque a neurônios e células de Schwann, devido ao seu alto teor de lipídios poli-insaturados (Kumar e Menon, 1993; Aragno *et al.*, 2000). Além disso, um estudo recente realizado pelo nosso grupo mostrou alterações em alguns parâmetros de EO, sugerindo que o mesmo parece ser um mecanismo que contribui para os danos ao SNC de ratos neonatos (Rosa *et al.*, 2015).

1.7 Morte Celular

No corpo humano a morte celular ocorre em grande frequência, tanto em condições consideradas fisiológicas quanto em patológicas. Fisiologicamente, o organismo adulto em condições de homeostase promove, como o intuito de compensação, a eliminação de uma célula mediante a morte celular a cada ciclo de duplicação realizado. Em contraste, as condições patológicas são normalmente ligadas à morte celular desregulada (excessiva ou deficiente) (Galluzzi *et al.*, 2007).

Segundo o comitê de nomenclatura de morte celular existe uma classificação de morte celular a partir de características morfológicas englobando principalmente a autofagia, a necrose e a apoptose. A morte celular autofágica é classificada morfológicamente como um tipo de morte celular que ocorre na ausência de condensação da cromatina, mas acompanhada de vacuolização autofágica maciça do citoplasma. Em contraste com as células apoptóticas (cuja depuração é assegurada por engolfamento e degradação lisossômica), as células que morrem com morfologia autofágica têm pouca ou nenhuma associação com fagócitos (Clarke, 1990; Baehrecke, 2005).

Já a morte celular necrótica ou necrose é morfológicamente caracterizada por um ganho no volume celular, inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e subsequente perda de conteúdo intracelular. Durante muito tempo, a necrose foi considerada meramente como uma forma de morte celular a partir de um acidente descontrolado, mas há evidências de que a execução da morte celular necrótica pode ser finamente regulada por um

conjunto de vias de transdução de sinal e mecanismos catabólicos. Vários mediadores, organelas e processos celulares têm sido implicados na morte celular necrótica, mas ainda não está claro como eles inter-relacionam entre si (Festjens *et al.*, 2006; Golstein e Kroemer, 2007).

Finalmente a morte celular por apoptose é classificada então como um tipo de morte celular acompanhada por arredondamento da célula, retração dos pseudópodes, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, classicamente poucas ou nenhuma modificação ultraestrutural de organelas citoplasmáticas, protrusão da membrana plasmática (mas manutenção de sua integridade até as etapas finais do processo) e engolfamento por fagócitos residentes (*in vivo*). Por conseguinte, o termo "apoptose" deve ser aplicado aos eventos de morte celular que ocorrem ao mesmo tempo em que se manifestam várias destas características morfológicas (Kroemer *et al.*, 2009).

Relativo à ativação do processo de apoptose podemos citar duas vias: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é ativada por sinais extracelulares que são detectados e propagados através de receptores específicos (Wajant, 2002; Mehlen e Bredesen, 2011). Já a via intrínseca é regulada principalmente pela família de proteínas célula-B de linfoma 2 (Bcl2), que desempenham um papel importante no controle da permeabilidade da membrana mitocondrial. Essas proteínas em conjunto são capazes de promover a estimulação da apoptose por proteínas pró-apoptóticas proteína X associada a Bcl2 (Bax) ou de bloquear a apoptose através das proteínas antiapoptóticas (Bcl2). A exemplo disso, em um cenário de dano a membrana mitocondrial enquanto a proteína pró-apoptótica Bax promove a liberação do

citocromo c e ativa as proteínas caspases, a proteína antiapoptótica Bcl2 não foi capaz de impedir a liberação de citocromo c, podendo então ocasionar, por fim a apoptose (Anilkumar e Prehn, 2014).

Neste mesmo contexto, existem outras proteínas que também podem ser correlacionadas com o a ativação do processo de morte celular, como por exemplo as proteínas da família proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). As proteínas da família MAPKs são mediadores importantes da transdução de sinal e desempenham um papel crítico em muitos processos celulares, tais como crescimento e proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e apoptose (Kyosseva, 2004; Kyriakis e Avruch, 2012). A p38 proteína cinase ativada por mitógenos (p38) e a proteína cinase c-Jun N-terminal (JNK) são proteínas membros da superfamília MAPK que podem ser ativadas por sinais de estresse e promover diversas respostas celulares, como por exemplo, a apoptose, dependendo do tipo de célula e do estímulo (Heidenreich e Kummer, 1996; Kummer *et al.*, 1997; Juretic *et al.*, 2001; Hommes *et al.*, 2003; Dhanasekaran e Reddy, 2008).

A sinalização da via PI3K/AKT é responsável pelos efeitos de sobrevivência e função neuronal desenvolvidos pela insulina e pelo IGF (Duarte *et al.*, 2008). Portanto, a ativação da via fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) pela insulina é capaz de evitar a apoptose em células da retina e gânglios (Kermer *et al.*, 2000; Barber *et al.*, 2001; Politi *et al.*, 2001). Além disso, a sinalização da insulina e o nível de glicose plasmática são capazes de controlar as vias que envolvem proteínas como a proteína cinase B (AKT) e glicogênio sintase cinase 3 beta (GSK3 β). AKT é uma proteína mediadora chave responsável pela sobrevivência e pelo crescimento celular (Scheid e Woodgett, 2001; Hanada *et*

al., 2004) que quando ativada pela insulina através da sua fosforilação direciona a célula à sobrevivência. Enquanto a proteína GSK3 β quando ativada pela insulina através de sua fosforilação tem a sua atividade inibida. Portanto, em condições de baixos níveis de insulina (ratos tratados com STZ) ocorre a diminuição da atividade AKT e aumento da atividade da GSK3 β , provavelmente devido a uma baixa sinalização de insulina e a hiperglicemia (Patel *et al.*, 2004; Asano *et al.*, 2007). Além disso, a proteína GSK3 β quando ativada tem sido relacionada com a diminuição da sobrevivência celular e indução de apoptose (Miyashita *et al.*, 2009).

1.8 Morte celular e hiperglicemia

Muitos estudos demonstraram que a apoptose desempenha um papel importante na perda neuronal e de função cognitiva encontradas no diabetes (Zhang *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2011). Uma perda significativa de neurônios do neocórtex ocorre em ratos diabéticos induzidos por STZ (Jakobsen *et al.*, 1987). Já no hamster chinês diabético, a morte neuronal ocorre nos núcleos arqueado e ventromedial (Garris, 1984). Portanto, os estudos acima indicam que a perda neuronal ocorre em animais diabéticos do tipo 1.

A hiperglicemia, alteração metabólica encontrada em todos os tipos de diabetes, é capaz de promover o EO através da via poliólica, aumento dos AGEs, aumento dos subprodutos de peroxidação lipídica e desequilíbrios na geração de ERO e defesas antioxidantes (Ceriello *et al.*, 1993; Mercuri *et al.*, 2000; Lipinski, 2001; Opara, 2002). Alguns estudos sugerem que o EO também está associado a apoptose neuronal (Gorman *et al.*, 1996; Nicotera *et al.*, 1997;

Sastre *et al.*, 2000). Portanto, é provável que a hiperglicemia possa induzir a apoptose pela sinalização via ERO, além disso, evidências recentes sugerem que o excesso de produção de ERO está associada à morte celular apoptótica (Greene *et al.*, 1999; Lelkes *et al.*, 2001).

Adicionalmente, algumas proteínas de sinalização consideradas pró-apoptóticas tais como JNK, p38, Bax, e Caspase-3 parecem estar envolvidas na apoptose induzida pela hiperglicemia e relacionadas com as complicações diabéticas (Allen *et al.*, 2005; Cavaletti *et al.*, 2007). Foi demonstrado que os ERO podem estimular a via de apoptose através dessas proteínas pró-apoptóticas (Li *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013). Portanto, a inibição da produção de ERO e, conseqüentemente, a prevenção da sua função podem bloquear tanto o início quanto a progressão da neuropatia diabética (Brownlee, 2005).

Em colaboração, em condição de estresse, a proteína GSK3 β pode induzir a ativação da caspase-3 e liberação de citocromo c, podendo assim ativar a via apoptótica (Park *et al.*, 2009). Além disso, experimentos revelam que a glicose elevada causa a redução da expressão de GSK3 β fosforilada que, por sua vez, acaba aumentando a atividade da GSK3 β e finalmente direcionando a célula para a via morte celular (Qu *et al.*, 2011).

Os trabalhos sobre a diabetes neonatal são, na sua maioria, clínicos pediátricos desenvolvidos em humanos e que abordam basicamente a etiologia, o diagnóstico e o tratamento a ser preconizado. Portanto, estes ensaios clínicos não nos possibilitam avaliar os mecanismos nocivos diretamente aos tecidos prejudicados nesta doença sistêmica. Para isso, o modelo de hiperglicemia induzida por STZ no período neonatal de ratos foi capaz de mimetizar em modelo animal condições metabólicas semelhantes as

encontradas em pacientes com diabetes neonatal, nos permitindo estudar um pouco mais desses efeitos nocivos em vários tecidos (Portha *et al.*, 1974; Rosa *et al.*, 2015, Takada *et al.*, 2007). No entanto, atualmente ainda existem poucos relatos a respeito dos efeitos da condição metabólica presente no diabetes neonatal sobre o SNC (Rosa *et al.*, 2015). Como os mecanismos de dano cerebral nessa doença ainda permanecem desconhecidos, 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). Portanto, torna-se de extrema importância investigar os efeitos nocivos da condição metabólica presente na diabetes neonatal a fim de elucidar possíveis efeitos da hiperglicemia em uma fase neonatal de desenvolvimento cerebral.

2. JUSTIFICATIVA

Diante de todos os dados acima citados postula-se que o EO parece contribuir, juntamente com outros mecanismos com os efeitos nocivos do diabetes no SNC (Rosa *et al.*, 2015). Portanto, estudar outros parâmetros de EO e verificar a expressão de proteínas relacionadas à sobrevivência e morte celular possa contribuir, juntamente com outros mecanismos, a fim de explicar de uma maneira mais ampliada os possíveis danos neurológicos induzidos pela hiperglicemia em um período crucial de desenvolvimento cerebral.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar o estresse oxidativo e as vias de sobrevivência e morte celular em um modelo de hiperglicemia neonatal induzida por estreptozotocina, com a finalidade de estabelecer os efeitos deletérios da hiperglicemia em uma fase crucial de desenvolvimento neurológico.

Objetivos específicos

- Aprofundar o estudo do estresse oxidativo no modelo de hiperglicemia neonatal aguda através da medida do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da verificação do status do metabolismo da glutathione pela dosagem da razão da glutathione oxidada versus glutathione reduzida. Além disso, através da atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo da glutathione, a glutamato-cisteína ligase (GCL), a glutathione s-transferase (GST) e a glutathione-redutase (GR).
- Determinar o papel da resposta antioxidante mediante a quantificação proteica do Nrf2 e de enzimas como a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), tioredoxina (TRX), heme oxigenase 1 (HO-1) por “Western Blot”.
- Verificar se a hiperglicemia neonatal é capaz de alterar vias de sinalização celular relacionadas à sobrevivência e morte celular através da quantificação proteica por “Western Blot” de proteínas como AKT, p-AKT, Bax, Bcl2, GSK3 β , JNK, p-JNK e p38.

- Identificar se existe morte celular em cérebro de ratos com hiperglicemia neonatal aguda através da técnica de FluoroJade C.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Para o modelo de hiperglicemia neonatal agudo, ratos *Wistar* são apropriados, pois o desenvolvimento diário do seu sistema nervoso é equivalente ao que ocorre a cada mês no ser humano (Clark *et al.*, 1993), atingindo o desenvolvimento cerebral equivalente ao recém-nascido humano, entre o 6º e o 8º dia de vida pós-natal (Hommes *et al.*, 2003). Apesar de modelos químicos experimentais com animais não corresponderem exatamente à doença humana, eles permitem reproduzir alterações metabólicas específicas semelhantes às encontradas em doenças como a diabetes, sendo, portanto, úteis para o estudo de suas repercussões.

Foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais foram mantidos com as mães até serem sacrificados, em uma sala com ciclo claro-escuro de 12-12 horas, com temperatura do ar condicionado de 22 ± 1 °C, em gaiolas plásticas de 41 x 34 cm e 16 cm de altura, com 8 ratos lactantes por gaiola juntamente com a mãe. A maravalha foi trocada a cada dois dias e as mães tiveram acesso livre a água e a ração comercial.

Para induzir o modelo utilizou-se estreptozotocina (STZ), um composto de glicosamina-nitrosuréia, que tem sido amplamente utilizado para a indução de diabetes em diferentes modelos animais (Ashafaq *et al.*, 2014). Este composto inibe a síntese de pró-insulina nas células beta pancreáticas e induz alquilação do DNA, causando a fragmentação e consequente morte desta célula. Desta

forma, a STZ não causa dano em outros tecidos e se mostra eficaz para indução do modelo de diabetes experimental (Szkudelski, 2001).

4.1.1 Indução do modelo de hiperglicemia neonatal

Ratos *Wistar* com cinco dias de vida foram submetidos a um jejum de 8h (retirada das mães), durante este período os animais foram mantidos em suas caixas na sala de experimentação com uma fonte de calor para a manutenção da temperatura (aproximadamente 37°C) que foi monitorada durante todo este período por um termômetro de temperatura ambiente. Este jejum foi realizado para evitar a competição da glicose da dieta com a droga utilizada, pois ambas internalizam na célula beta pancreática via receptor GLUT2 (Szkudelski, 2001). Posteriormente os ratos do grupo diabético receberam uma administração intraperitoneal de STZ (100 mg/Kg de peso corporal – diluída com 20% de tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,4 e 80% de salina) no grupo hiperglicêmico e salina nos ratos do grupo controle. As injeções foram realizadas no Laboratório 11 do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Após a realização das injeções, os ratos neonatos foram novamente colocados com a mãe.

Aproximadamente 10 horas após a administração de STZ os ratos receberam uma injeção intraperitoneal de glicose (2mg/g de peso corporal). O acompanhamento glicêmico foi realizado em microgota de sangue obtida por punção caudal com sistema de monitoramento de glicose sanguínea por tiras (Accucheck-Performa Nano) e foram considerados hiperglicêmicos os ratos que obtiveram a glicemia > 200 mg/dL após 48h da administração de STZ.

4.2 Preparação do tecido

Para a realização das técnicas de EO, após a indução do modelo os ratos foram sacrificados por decapitação sem anestesia, uma vez que este método é rápido, eficaz e acarreta alterações mínimas às condições fisiológicas e bioquímicas do sistema nervoso. Já para a realização das técnicas de histoquímica e “Western Blot” os ratos foram submetidos a uma perfusão extracorpórea com salina para a melhor limpeza do tecido cerebral. Em ambos os casos, seus cérebros foram removidos, descartando-se o cerebelo, bulbos olfatórios, ponte e medula (Mcdannold *et al.*, 2011).

Para a realização das técnicas de EO os cérebros foram pesados e homogeneizados em tampão de homogeneização (tampão fosfato de sódio 20 mM com KCL 140 mM, pH 7,4). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 1000g por 10 minutos a 4°C, utilizando-se o sobrenadante para as medidas dos parâmetros de EO. Na técnica de determinação da razão GSSG/GSH foi utilizado o tecido cerebral íntegro, que foi mantido congelado até o momento do experimento. Finalmente, a descrição sobre a forma de utilização dos cérebros dos animais nas técnicas de “Western Blot” e FluoroJade C encontra-se nos materiais e métodos dos artigos.

4.3 Considerações éticas

O projeto para a realização deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS com o número 25395. Todos os

procedimentos realizados neste trabalho seguiram as considerações e definições da NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication # 80–23, revised 1996).

PARTE II

5. RESULTADOS

5.2 Artigo aceito pela revista “Metabolic Brain Disease”

Metabolic Brain Disease
<https://doi.org/10.1007/s11011-017-0170-6>

ORIGINAL ARTICLE



Neonatal hyperglycemia induces cell death in the rat brain

Andrea Pereira Rosa^{1,2} · Caroline Paula Mescka¹ · Felipe Maciel Catarino² · Alexandre Luz de Castro³ · Rayane Brinck Teixeira³ · Cristina Campos³ · Guilherme Baldo³ · Débora Dalmas Graf⁴ · Angela de Mattos-Dutra⁴ · Carlos Severo Dutra-Filho^{1,2} · Alex Sander da Rosa Araujo³

Received: 26 August 2017 / Accepted: 11 December 2017
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017

Abstract

Several studies have examined neonatal diabetes, a rare disease characterized by hyperglycemia and low insulin levels that is usually diagnosed in the first 6 months of life. Recently, the effects of diabetes on the brain have received considerable attention. In addition, hyperglycemia may perturb brain function and might be associated with neuronal death in adult rats. However, few studies have investigated the damaging effects of neonatal hyperglycemia on the rat brain during central nervous system (CNS) development, particularly the mechanisms involved in the disease. Thus, in the present work, we investigated whether neonatal hyperglycemia induced by streptozotocin (STZ) promoted cell death and altered the levels of proteins involved in survival/death pathways in the rat brain. Cell death was assessed using FluoroJade C (FJC) staining and the expression of the p38 mitogen-activated protein kinase (p38), phosphorylated-c-Jun amino-terminal kinase (p-JNK), c-Jun amino-terminal kinase (JNK), protein kinase B (Akt), phosphorylated-protein kinase B (p-Akt), glycogen synthase kinase-3 β (Gsk3 β), B-cell lymphoma 2 (Bcl2) and Bcl2-associated X protein (Bax) protein were measured by Western blotting. The main results of this study showed that the metabolic alterations observed in diabetic rats (hyperglycemia and hypoinsulinemia) increased p38 expression and decreased p-Akt expression, suggesting that cell survival was altered and cell death was induced, which was confirmed by FJC staining. Therefore, the metabolic conditions observed during neonatal hyperglycemia may contribute to the harmful effect of diabetes on the CNS in a crucial phase of postnatal neuronal development.

Keywords Neonatal hyperglycemia · Cell death · Cell survival · Brain · Central nervous system

Introduction

Diabetes is a common and severe chronic disease characterized by a high blood glucose concentration (hyperglycemia) that occurs either when the pancreatic beta cells do not

produce enough insulin or when the body has a defect in insulin action or both, consequently resulting in impaired glucose uptake and storage and reduced utilization of glucose for energy (Wild et al. 2004; Quinn 2001; NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) 2016).

Currently, many clinical studies of pediatric patients have assessed neonatal diabetes, a rare condition in preterm babies with low birth weights (Srinivasan et al. 2004; Hays et al. 2006; Flanagan et al. 2007; Suzuki et al. 2007; Aguiar-Bryan and Bryan 2008; Flechtner et al. 2008; Greeley et al. 2010; Sagili et al. 2015; Nansseu et al. 2016). Neonatal diabetes has been linked to numerous complications, such as premature retinopathy, sepsis, severe intraventricular hemorrhage and increased early mortality and morbidity. In the literature, several case reports describe the symptoms, etiology and consequences of hyperglycemia in patients (Hays et al. 2006; Ertl et al. 2006; Garg et al. 2003; Kao et al. 2006). These studies have provided a better understanding of the genes involved in the mechanisms that control glucose homeostasis (Aguiar-Bryan and Bryan 2008). Few studies have

✉ Andrea Pereira Rosa
deia1018@gmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo), Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Published online: 19 December 2017

Springer

investigated the damaging effects of neonatal hyperglycemia on the rat brain during central nervous system (CNS) development. Therefore, a study of the effects of neonatal diabetes on the rat brain may contribute to a better elucidation of these mechanisms.

In addition, the effects of diabetes on the CNS have received considerable attention. According to a recent experimental study with type 1 diabetic rats, neurological damage is a diabetic complication. The diabetic brain exhibits neurological alterations in structure, neurotransmitters, electrophysiology, cognitive function, neuronal density and apoptotic activity (Li and Sima 2004).

Moreover, many proteins respond to the diabetes status. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway has been correlated with hyperglycemia-induced injury (Venkatachalam et al. 2008; Soetikno et al. 2012; Evans et al. 2002). Proteins of the MAPK family are important signal transduction mediators and play critical roles in cellular processes, such as cell growth and proliferation, differentiation, survival and apoptosis (Kyosseva 2004; Kyriakis and Avruch 2012). The p38 and JNK proteins are members of the MAPK superfamily that are activated by stress signals and promote many cellular responses, depending on the cell type and stimulus (Hommes et al. 2003; Heidenreich and Kummer 1996; Juretic et al. 2001; Sabapathy 2012). The p38 and JNK signaling pathway is involved in stress-induced apoptosis in many cell lines (Kummer et al. 1997; Dhanasekaran and Reddy 2008). A study of diabetic rats showed activation of p38 and JNK. In addition, the inhibition of both proteins ameliorated cell death in the dorsal root ganglion and sciatic nerve (Cavaletti et al. 2007).

Protein phosphorylation plays an important role in intracellular signal transduction activated by several extracellular stimuli, including insulin and plasma glucose levels. Protein kinase B (PKB/Akt) is a key protein in signal transduction pathways and is activated in response to growth factors or insulin. Akt is thought to contribute to several cellular functions, including nutrient metabolism, cell growth and apoptosis (Hanada et al. 2004; Scheid and Woodgett 2001). Gsk3 is a serine/threonine kinase that is involved in diabetes and neurodegenerative diseases. Downregulation of insulin signaling increases the activity and level of the Gsk3 protein in the skeletal muscle of mice with type 2 diabetes and in the adipose tissue of obese diabetic mice, probably due to both abnormal insulin signaling and hyperglycemia (Nikoulina et al. 2000; Eldar-Finkelman et al. 1999). Gsk3 β is also involved in cell survival and apoptosis (Miyashita et al. 2009). Chronically increased glucose levels significantly downregulate Akt expression in retinal glial cells, potentially contribute to high glucose-induced apoptosis (Xi et al. 2005).

Cells under stress activate cell survival and cell death signaling pathways. Cell death signaling converges on the mitochondria, a process that is regulated by the activities of pro-

and anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 (Bcl2) family proteins. The important roles of Bcl-2 family proteins in regulating apoptosis have been studied for the past decade. Bcl2 proteins family play important roles in stimulating or blocking apoptosis during neuronal development and in response to injury, since they regulate the mitochondrial transmembrane passage of cytochrome C and activate downstream caspase proteins (Anilkumar and Prehn 2014; Youle and Strasser 2008). Therefore, the Bcl2 family acts as key modulators of the intrinsic (mitochondrial) apoptosis pathway (Youle and Strasser 2008). Moreover, a high Bax/Bcl2 ratio promotes increased apoptotic activity (Oltvai et al. 1993).

In summary, neonatal diabetes is a rare metabolic disease characterized by hyperglycemia that occurs in preterm babies and most studies of this condition focus on its etiology, symptoms, and treatments. On the other hand, few studies of neonatal rats have focused on the impact of this disease on the CNS. Based on previous findings, diabetes may lead to neuronal alterations. Thus, the mechanisms by which neonatal hyperglycemia and hypoinsulinemia cause brain damage remain poorly understood. Therefore, the present study aimed to investigate whether neonatal hyperglycemia promoted alterations in the expression of proteins involved in balancing cell survival and death and induced neuronal damage in a crucial period of postnatal brain development.

Materials and methods

Materials

All chemicals reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Streptozotocin (STZ) solutions were freshly prepared with saline (70% of the final volume) and 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 (30% of the final volume).

Animals

In this work, we utilized the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication # 80-23, revised 1996) as a guide for all experiments. For these experiments, we used five-day-old Wistar rats bred in the Animal House of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and the sample size was calculated based on 80% power at the 0.05 level of significance (MiniTab®). We used both male and female rats because they have not yet developed secondary sexual characteristics at the age in which they were used in the experiments. Animals were housed with dams until sacrifice, with the exception of a brief period of starvation. Dams had free access to water and a 20% (w/w) protein commercial chow (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil). Rats were maintained in

a room with 12:12 h light/dark cycle (lights on 7:00–19:00 h) and controlled temperature (22 ± 1 °C).

Streptozotocin-induced neonatal hyperglycemia

The STZ-induced neonatal hyperglycemia model was described previously (Rosa et al. 2015). Briefly, 5-day-old Wistar rats were submitted to eight hours of starvation. The neonatal hyperglycemia model was induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of STZ (100 mg/Kg body weight). Controls received vehicle (saline and buffer) instead. Ten hours after the STZ injection, rats received an i.p. injection of glucose (2 mg/g body weight). Finally, rats were sacrificed five days after the STZ injection. Glycemia was assessed by caudal puncture daily. Rats were sacrificed by decapitation, the brains were immediately removed, the olfactory bulb, pons, and medulla were discarded, and the whole brain was utilized for Western blot analyses. For the histochemical analyses and insulin dosage (plasma) experiments, rats were anesthetized (90 mg/Kg Ketamine and 10 mg/Kg xylazine, i.p.) and perfused with saline solution.

Western blot analysis

The brain was homogenized in buffer (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 10% glycerol, 20 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ L/mL aprotinin and 10 μ L/mL leupeptin). The homogenate was centrifuged at 1000 \times g for 10 min at 0–4 °C to remove the nuclei and cell debris and the supernatants were utilized for the Western blot assay. We separated one hundred micrograms of protein by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a discontinuous system using a 12% (w/v) separating gel and stacking gel (Laemmli 1970). The proteins separated were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes utilizing a buffer containing 150 mmol/L glycine, 20 mmol/L Tris, pH 8.2, and 20% (v/v) methanol, and 0.1% (w/v) SDS, in a cooled Bio-Rad Trans-Blot unit. Afterwards, membranes were incubated with non-fat milk in Tris buffer for one hour to block non-specific protein-binding sites. Membranes were processed for immunodetection using the antibodies described in Table 1 and signals were revealed using chemiluminescence. We utilized an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT) to quantitatively analyze the autoradiographs produced. A standard molecular weight marker was used as a reference to determine the molecular weights of the bands (RPN 800 rainbow full range, Bio-Rad, CA, USA).

The tubulin mRNA is expressed at lower levels in peripheral nerves from diabetic patients and animals (McLean 1997). In addition, insulin influences the expression of the GAPDH protein in other tissues, such as adipose tissues and

the liver (Alexander et al. 1988). Therefore, the STZ-induced diabetic model presented hyperglycemia and hypoinsulinemia, both of which are capable of influencing housekeeping gene expression, such as tubulin, GAPDH and structural cytoskeletal proteins. Since the levels of housekeeping proteins should be influenced by the treatment or the protocol used in this study, their utilization as a normalizer could compromise the quantification and analysis of the data. Therefore, we used the Ponceau method (Klein et al. 1995), which is not influenced by the STZ diabetic model.

Histochemical processing for FluoroJade C staining

FluoroJade C (FJC) is a fluorochrome used to detect neurons that are undergoing death (Schmued et al. 2005). For this technique, animals were anesthetized and transcardially perfused with saline, and brain tissues were fixed in buffered formalin. Following fixation, tissues were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in paraffin. Brain tissues were serially sectioned into 6 μ m coronal sections. Slides were sequentially rinsed with 70% ethanol and distilled water for 2 min each and then incubated with a 0.06% potassium permanganate solution for 10 min. Slides were then incubated with a 0.0001% solution of FJC (Histo-Chem, Jefferson, AR, USA) dissolved in 0.1% acetic acid vehicle for 10 min. The slides were then rinsed with distilled water three times for 1 min each. The excess water was drained, and the air-dried slides were then cleared in xylene for 1 min and then coverslipped after addition of Permount media. Using a fluorescence microscope (4000X magnification, Zeiss microscope, Axiostar Plus, Jena, Germany), FJC-positive cells were identified by green fluorescence in the brain. The number of positive cells per slide was quantified by an observer who was blinded to the groups.

Protein determination

Protein concentrations in brain homogenates were determined using bovine serum albumin as a standard (LOWRY et al. 1951).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM and were compared using Student's *t*-test. All analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software on a PC-compatible computer. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

The present study investigated whether neonatal hyperglycemia caused neuronal death using FJC staining, and subsequently

Table 1 Description of the antibodies and the respective dilutions utilized in the Western blot analysis

Primary Antibodies from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	Secondary Antibodies From Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	Dilution
Rabbit anti-p-Akt polyclonal	Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit	1:1000
Rabbit anti-Akt polyclonal	Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit	1:1000
Rabbit anti-p-JNK polyclonal	Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit	1:1000
Rabbit anti-JNK polyclonal	Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit	1:1000
Rabbit anti-Gsk3 β polyclonal	Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit	1:1000
Rabbit anti-p38 polyclonal	Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit	1:1000
Rabbit anti-Bax polyclonal	Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit	1:500
Rabbit anti-Bcl2 polyclonal	Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit	1:500

investigated the effects of both neonatal hyperglycemia and hypoinsulinemia on the expression of a series of proteins involved in balancing survival and death in the brain.

As proof that the model is valid, a significant increase in glycemia in the neonatal diabetes group (222 ± 29 mg/dL) was observed compared to the controls (122 ± 3 mg/dL) $p < 0.01$, $n = 10$. The diabetic animals presented reduced insulin plasma levels (approximately five-fold lower) compared to control animals, $p < 0.01$, $n = 10$ (data not shown). Furthermore, the diabetic animals showed reduced body weights (21 ± 0.9 g) compared to control animals (17 ± 0.4 g) $p < 0.001$, $n = 10$.

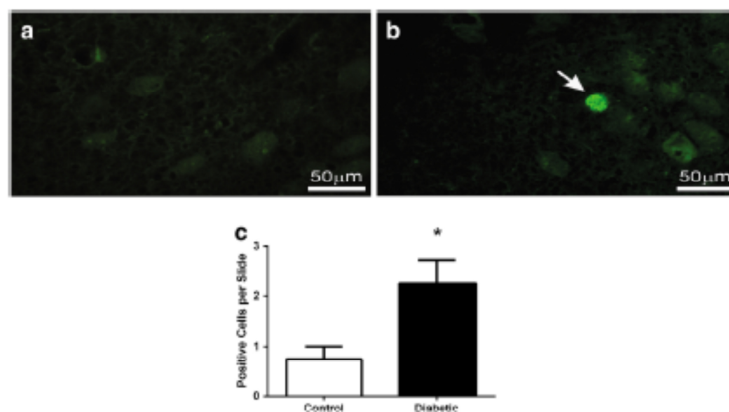
Firstly, rats with STZ-induced diabetes exhibited a diminished brain weight (182 ± 17 mg) compared to the control group (270 ± 15 mg) $p < 0.01$, $n = 10$. Therefore, we evaluated the effect of neonatal hyperglycemia on neuronal cell death using FJC staining. Figure 1a depicts a representative image from the control group, in which few cells in each slide were positive for FJC (0.75 ± 0.5) compared to the diabetic group. Figure 1b shows a representative image from the hyperglycemic group, where a 3-fold increase in the number of dying cells per slide was observed (2.25 ± 0.95 , $p < 0.05$), revealing an increase in cell death throughout the tissue. Figure 1c

shows the results from the quantitative analysis of both groups. Therefore, cell death occurred in the hyperglycemic rat brain, and we proposed to verify which pathways were involved in neuronal cell death.

Thus, we investigated the effect of STZ-induced neonatal hyperglycemia on the expression of Bcl2 family proteins, which have complex roles in regulating cell death by apoptosis. As shown in Fig. 2a, neonatal hyperglycemia was not able to alter the expression of the pro-apoptotic protein Bax [$t(5) = 0.77$; $p = 0.47$]. However, as shown in Fig. 2b, neonatal hyperglycemia increased the expression of the anti-apoptotic protein Bcl2 [$t(5) = 3.893$; $p = 0.0115$].

Next, this study evaluated the effect of neonatal hyperglycemia on the expression of the p-JNK, JNK and p38 proteins, which are involved in the cell death process. Neonatal hyperglycemia did not alter p-JNK (Fig. 3a), JNK (Fig. 3b) and p-JNK/JNK ratio (Fig. 3c) protein expression, respectively (Fig. 3a) [$t(7) = 0.6219$; $p = 0.5537$]; [$t(6) = 2.301$; $p = 0.0611$]; [$t(70) = 1.514$; $p = 0.1738$]. However, the expression of the p38 protein was significantly increased in the hyperglycemic group compared to the control group (Fig. 3d) [$t(5) = 3.261$; $p = 0.0224$].

Fig. 1 Effect of STZ-induced neonatal hyperglycemia on cell death, as analyzed by Fluoro-Jade C (FJC) staining. **a** Representative image of a brain section from a control rat. **b** representative image of a brain section from a hyperglycemic rat showing an FJC-positive cell (arrow). **c** Quantification of the number of FJC-positive cells per slide. * $p < 0.05$ (Student's t test)



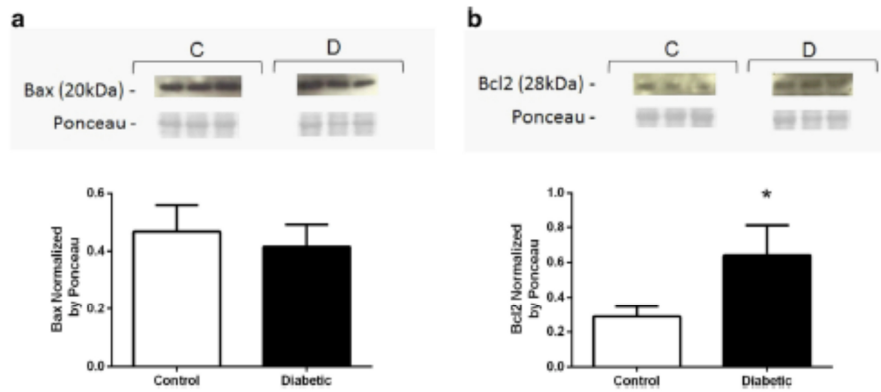


Fig. 2 Western blot analyses of STZ-induced neonatal hyperglycemia using a Bax antibody (a) and Bcl2 antibody (b). Results are presented as the means \pm SEM ($n=6$) of independent experiments performed in duplicate; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the control (Student's t test)

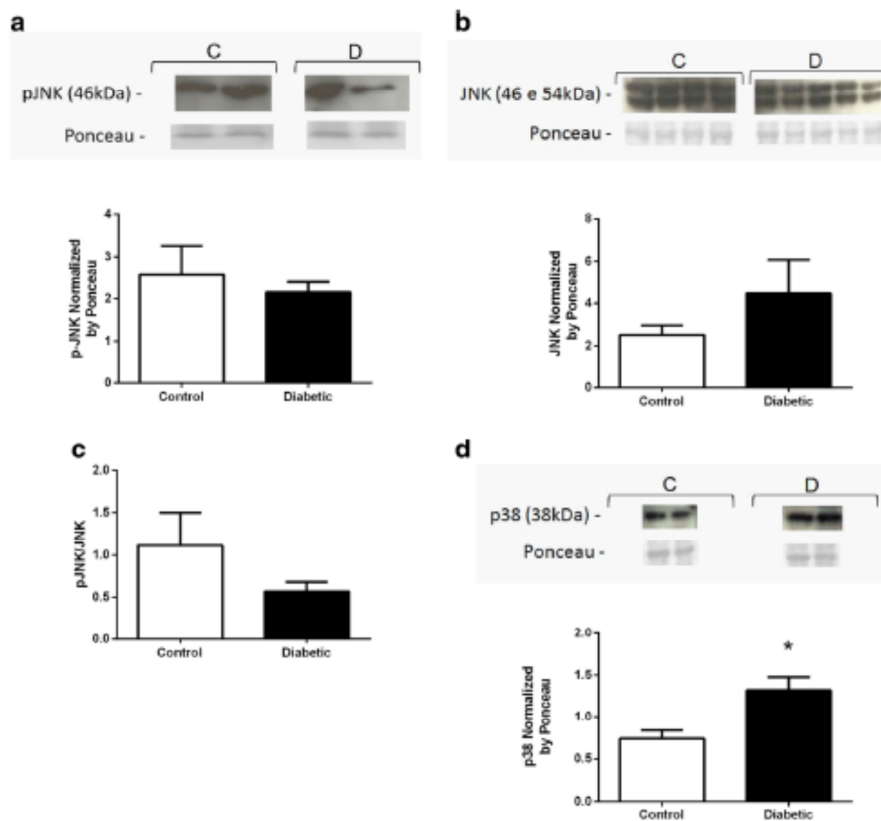


Fig. 3 Western blot analyses of STZ-induced neonatal hyperglycemia using a p-JNK antibody (a), JNK antibody (b), p-JNK/JNK (c) and p38 antibody (d). Results are presented as the means \pm SEM ($n=6-7$) for independent experiments performed in duplicate; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the control (Student's t test)

We also studied the effect of neonatal hyperglycemia on the expression of the Akt and Gsk3 β proteins. The expression of the total Akt protein and p-AKT/AKT ratio were not altered by neonatal hyperglycemia compared to the control group, respectively (Fig. 4b and c) [$t(6) = 1.952$; $p = 0.0988$]; [$t(6) = 0.007$; $p = 0.9941$]. However, levels of the p-Akt protein were decreased in the hyperglycemic group compared to the control group (Fig. 4a) [$t(6) = 2.671$; $p = 0.0370$]. Furthermore, as shown in Fig. 4d, neonatal hyperglycemia did not alter levels of the Gsk3 β protein [$t(6) = 0.3430$; $p = 0.7433$].

Discussion

Neonatal diabetes is a rare condition, characterized by hyperglycemia diagnosed before 6 months of life (Aguilar-Bryan

and Bryan 2008). Hyperglycemia may induce neuronal damage due to the excessive glucose levels (Tomlinson and Gardiner 2008) and may consequently promote alterations in proteins involved in neuronal survival/death (Kummer et al. 1997; Xi et al. 2005; Yang et al. 2016; Chen et al. 2014). However, a few studies investigate the effects of hyperglycemia in a brain of diabetic neonate rats.

Therefore, in the present work, neonatal hyperglycemia increased the expression of the p38 protein but did not alter the pJNK, JNK and pJNK/JNK ratio protein levels in the brain tissue. In fact, a recent study showed that hyperglycemia activates JNK in endothelial cells leading to apoptosis (Ho et al. 2000). Besides that, in these cells, JNK inhibition blocked hyperglycemia-induced apoptosis (Ho et al. 2000). In our study it is possible that the short period of hyperglycemia induction (five days) could explain the absence of JNK

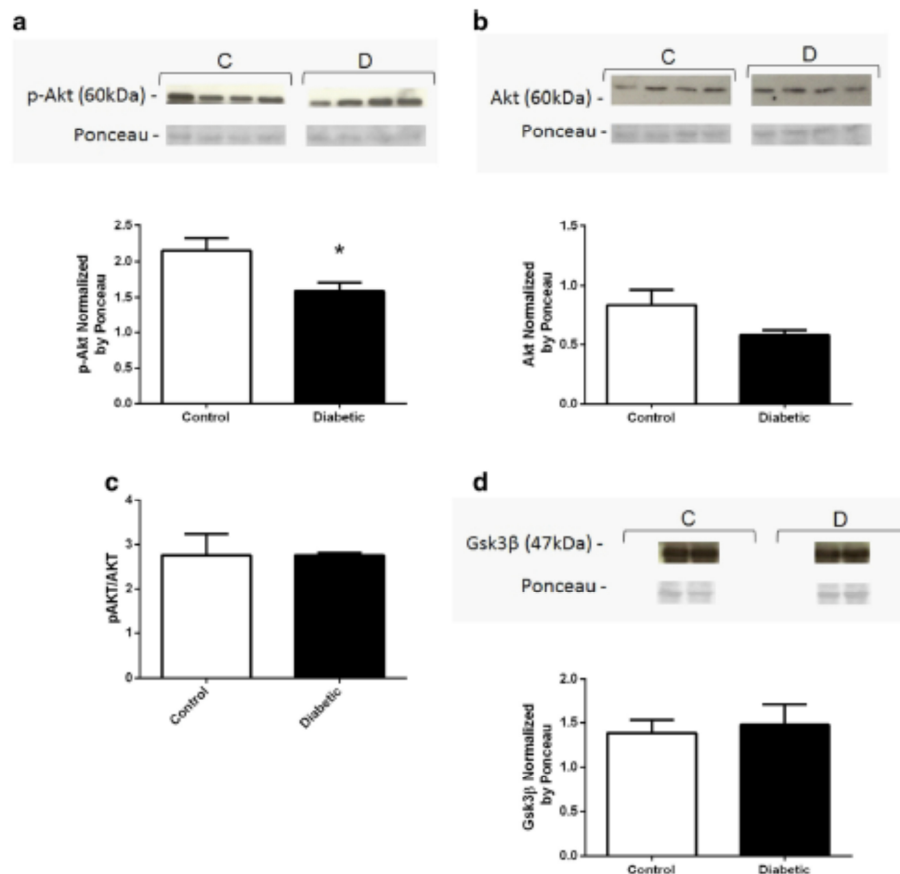


Fig. 4 Western blot analyses of STZ-induced neonatal hyperglycemia using a p-Akt antibody (a), Akt antibody (b) p-AKT/AKT (c) and Gsk3 β antibody (d). Results are presented as the means \pm

SEM ($n = 7$) for independent experiments performed in duplicate; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the control (Student's t test)

alteration in the brain tissue. However, we cannot exclude the possibility that JNK expression would increase after an extended treatment. In relation to p38, since insulin negatively regulates the expression of these protein in the brain (Kummer et al. 1997), both hypoinsulinemia and hyperglycemia could be responsible for the increase in p38 expression in the brain of diabetic rats, as was previously described (Chen et al. 2014). In fact, according to studies of STZ-treated rats, diabetes significantly increases p38 expression in several brain structures (Cavaletti et al. 2007; Ramakrishnan et al. 2005), and these alterations are reversed by insulin administration to rats (Ramakrishnan et al. 2005). Based on these results, insulin promotes neuronal survival by inhibiting a cell death pathway regulated by p38 (Xia et al. 1995; Ichijo et al. 1997). In view of that, in the present study, insulin deprivation and neonatal hyperglycemia resulted in an increased expression of p38, which is an important regulator of neuronal apoptosis (Xia et al. 1995; Ichijo et al. 1997).

In terms of neuronal survival pathways, the effects of insulin are mediated by the activation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway (Duarte et al. 2008). In fact, the activation of Akt pathway induced by insulin avoided serum glucose deprivation-induced apoptosis in cells (rat amacrine cells and in the R28 retinal cell line) (Barber et al. 2001; Politi et al. 2001) and inhibited ganglion cell apoptosis after optic nerve transection (Kermer et al. 2000). Besides that, Akt activity is significantly reduced by the high glucose levels observed in the brains of non-malformed diabetic embryos (Kruse et al. 2012). In our study, the diabetic rats presented a decreased in p-Akt levels in the brain tissue when compared with control. Since insulin activates the PI3K/Akt pathway, the brains of diabetic rats may have showed decreased p-Akt

levels due to hypoinsulinemia. Consistent with our results, chronically elevated glucose decreased Akt activity in retinal glial Muller cells in vitro and promoted Akt dephosphorylation in vivo (STZ-induced diabetic rats) in a previous study. In addition, the downregulation of Akt-mediated survival signaling is partially responsible for apoptosis induced by high glucose levels (Xi et al. 2005). Therefore, in our study, the Akt-mediated survival signaling downregulation and the p38-mediated death signaling upregulation probably contributed to the glucose-induced neuronal cell death, which was verified by FluoroJade C staining.

Another protein involved in insulin signaling and PI3K/Akt pathway is Gsk3 β . In our study, Gsk3 β expression was not altered by hyperglycemia during the neonatal period. However, insulin-deficient diabetes significantly decreases the phosphorylation of the insulin receptor, suggesting that Gsk3 β activity is increased by phosphorylation (Thomas et al. 2013).

Since apoptotic cell death has consistently been shown to play a significant role in neurotoxicity of diabetes (Zhang et al. 2010; Ye et al. 2011), in the present study, we used FluoroJade C staining to evaluate neuronal cell death. A greater number of FJC-positive cells was observed in the diabetic rats, which indicates an increase in cell death. This result is consistent with studies performed in cell cultures that showed a decrease in brain cell viability induced by high glucose levels (Yang et al. 2016; Yang et al. 2014; Aminzadeh et al. 2014; Liu et al. 2013; Afrazi et al. 2014). Besides the induction of pro-apoptotic proteins expression (Ho et al. 2000), hyperglycemia was recently shown to induce neuronal cell death also due to extracellular ROS generation in the mitochondria via Nox, suggesting that this condition may

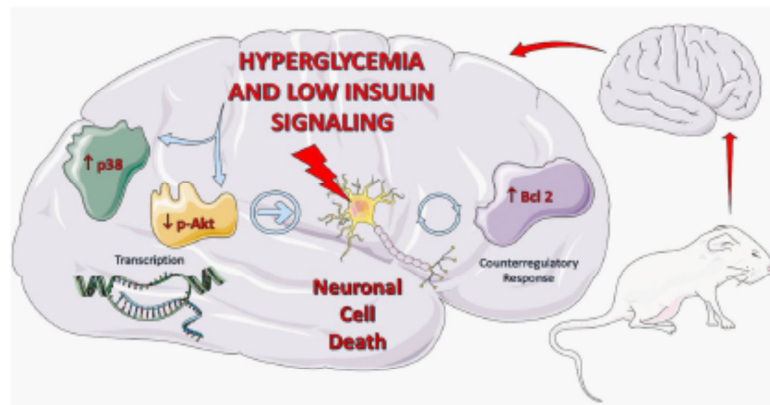


Fig. 5 Overview of the principal effects of hyperglycemia and hypoinsulinemia on the brains of rats with neonatal hyperglycemia. Hyperglycemia and hypoinsulinemia increased the expression of the p38 protein and decreased the levels of the p-Akt protein, both of which could disrupt neuronal survival and proliferation. Neuronal cell death was

verified by FJC staining. Finally, a counter-regulatory response could explain the increased Bcl2 protein expression. p38 - p38 mitogen activated protein kinase; Akt - protein kinase B; Bcl2 - B cell lymphoma 2. The figure was produced using Servier Medical Art (www.servier.com)

promote oxidative stress and brain damage (Yang et al. 2016). In addition, ROS produced during oxidative stress activate various signaling pathways, including MAPKs (Torres and Forman 2003; McCubrey et al. 2006; Cargnello and Roux 2011). Therefore, oxidative stress may also contribute to the neurological effects induced by hyperglycemia during this crucial period of postnatal brain development (Rosa et al. 2015).

In order to evaluate proteins related with apoptosis, Bcl2 and Bax expression were measured in the brain tissue. Bcl2 plays a role in cellular survival and has also been correlated with the regulation of redox state. In relation to oxidative stress, Bcl2 overexpression protects the cells suppressing lipid peroxidation (Hockenbery et al. 1993), increasing total reduced glutathione and NADPH levels (Esposti et al. 1999; Ellerby et al. 1996; Kane et al. 1993) and increasing the levels of catalase, glutathione reductase and peroxidase (Ellerby et al. 1996). Bcl2 family regulates apoptosis by modulating cytochrome C release and their downstream effects (Green and Reed 1998; Hengartner 2000). Although, in our study, hyperglycemia and hypoinsulinemia reduced cell survival, the increased expression of the anti-apoptotic Bcl2 protein could represent a counter-regulatory response to cell death. Bax expression, however, was not altered in this model. In contrast to our results, studies have showed diminished levels of Bcl2 in neuronal cell cultures exposed to high glucose (Ye et al. 2011; Yang et al. 2014). Another study of adult STZ-induced hyperglycemic rats showed that Bax expression was increased and Bcl2 protein expression was significantly reduced in the cortex and hippocampus (Wu et al. 2012). A possible explanation may be that these results were observed in adult rats, whereas our study utilized neonatal rats. Moreover, neuronal cell death represents a continuous process, and these findings reflect the expression of proteins related to cell survival and cell death at one time point. In addition, Caspase 3 expression was not altered in STZ-induced diabetic adult rats (Guo et al. 2014) and rat embryonic brain in some studies (Knuse et al. 2012). Besides that, it is possible that hyperglycemia-induced neuronal cell death observed in our study was not mediated by the mitochondrial pathway. However, other pathways that also trigger neuronal cell death, such as autophagy, could not be excluded.

Finally, as outlined in Fig. 5, the STZ-induced neonatal hyperglycemia model produces a similar metabolic condition observed in patients with neonatal diabetes, namely, hyperglycemia and hypoinsulinemia. Neonatal diabetes increases p38 and decreases p-Akt levels, both of which may disrupt neuronal survival and proliferation. Finally, neuronal cell death occurs in the brains tissue of rats with neonatal diabetes, as evidenced by FJC staining. Based on these results, we postulate that a counter-regulatory response could explain the increased Bcl2 protein expression observed in subjects with neonatal diabetes, although a significant difference in Bax

protein expression was not observed. These effects may suggest possible therapeutic targets and are relevant for a better understanding of this important pathological condition.

Acknowledgements This work was supported by 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) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).


References


Global report on diabetes

- Afrazi S, Esmaili-Mahani S, Sheibani V, Abbasnejad M (2014) Neurosteroid allopregnanolone attenuates high glucose-induced apoptosis and prevents experimental diabetic neuropathic pain: in vitro and in vivo studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 139:98–103. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.10.010>
- Aguilar-Bryan L, Bryan J (2008) Neonatal diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29(3):265–291. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0029>
- Alexander MC, Lomanto M, Nasrin N, Ramaika C (1988) Insulin stimulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression through cis-acting DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14):5092–5096. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5092>
- Aminzadeh A, Dehpour AR, Safa M, Mirzamohammadi S, Sharifi AM (2014) Investigating the protective effect of lithium against high glucose-induced neurotoxicity in PC12 cells: involvements of ROS, JNK and P38 MAPKs, and apoptotic mitochondria pathway. *Cell Mol Neurobiol* 34(8):1143–1150. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0089-y>
- Anilkumar U, Prehn JH (2014) Anti-apoptotic BCL-2 family proteins in acute neural injury. *Front Cell Neurosci* 8:281. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00281>
- Barber AJ, Nakamura M, Wolpert EB, Reiter CE, Seigel GM, Antonetti DA, Gardner TW (2001) Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. *J Biol Chem* 276(35):32814–32821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104738200>
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(1):50–83. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>
- Cavaletti G, Miloso M, Nicolini G, Scuteri A, Tredici G (2007) Emerging role of mitogen-activated protein kinases in peripheral neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* 12(3):175–194. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2007.00138.x>
- Chen J, Guo R, Yan H, Tian L, You Q, Li S, Huang R, Wu K (2014) Naringin inhibits ROS-activated MAPK pathway in high glucose-induced injuries in H9c2 cardiac cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 114(4):293–304. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12153>
- Dhanasekaran DN, Reddy EP (2008) JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27(48):6245–6251. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.301>
- Duarte AI, Santos P, Oliveira CR, Santos MS, Rego AC (2008) Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3beta signaling pathways and changes in protein expression. *Biochim Biophys Acta* 1783(6):994–1002. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2008.02.016>
- Eldar-Finkelman H, Schreyer SA, Shinohara MM, LeBoeuf RC, Krebs EG (1999) Increased glycogen synthase kinase-3 activity in

- diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes* 48(8):1662–1666. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.8.1662>
- Ellerby LM, Ellerby HM, Park SM, Holleran AL, Murphy AN, Fiskum G, Kane DJ, Testa MP, Kayalar C, Bredesen DE (1996) Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J Neurochem* 67(3):1259–1267
- Ertl T, Gyarmati J, Gaál V, Szabó I (2006) Relationship between hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Biol Neonate* 89(1):56–59. <https://doi.org/10.1159/000088199>
- Esposito MD, Hatzinisiriou I, McLennan H, Ralph S (1999) Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes. *J Biol Chem* 274(42):29831–29837. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.29831>
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23(5):599–622. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0039>
- Flanagan SE, Patch AM, Mackay DJ, Edgill EL, Gloyn AL, Robinson D, Shield JP, Temple K, Ellard S, Hattersley AT (2007) Mutations in ATP-sensitive K⁺ channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood. *Diabetes* 56(7):1930–1937. <https://doi.org/10.2337/db07-0043>
- Flechtmner I, Vaxillaire M, Cavé H, Scharfmann R, Froguel P, Polak M (2008) Neonatal hyperglycaemia and abnormal development of the pancreas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22(1):17–40. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.08.003>
- Garg R, Agthe AG, Donohue PK, Lehmann CU (2003) Hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *J Perinatol* 23(3):186–194. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7210879>
- Greeley SA, Tucker SE, Worrell HI, Skowron KB, Bell GI, Philipson LH (2010) Update in neonatal diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17(1):13–19. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328334f158>
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381):1309–1312. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>
- Guo YJ, Wang SH, Yuan Y, Li FF, Ye KP, Huang Y, Xia WQ, Zhou Y (2014) Vulnerability for apoptosis in the hippocampal dentate gyrus of STZ-induced diabetic rats with cognitive impairment. *J Endocrinol Invest* 37(1):87–96. <https://doi.org/10.1007/s40618-013-0030-0>
- Hanada M, Feng J, Hemmings BA (2004) Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1697(1–2):3–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.009>
- Hays SP, Smith EO, Suneltag AL (2006) Hyperglycemia is a risk factor for early death and morbidity in extremely low birth-weight infants. *Pediatrics* 118(5):1811–1818. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-0628>
- Heidenreich KA, Kummer JL (1996) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons. *J Biol Chem* 271(17):9891–9894. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.17.9891>
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770–776. <https://doi.org/10.1038/35037710>
- Ho FM, Liu SH, Liu CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY (2000) High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* 101(22):2618–2624. <https://doi.org/10.1161/01.CTR.101.22.2618>
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75(2):241–251. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80066-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80066-N)
- Hommel DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ (2003) Mitogen-activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* 52(1):144–151. <https://doi.org/10.1136/gut.52.1.144>
- Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275(5296):90–94. <https://doi.org/10.1126/science.275.5296.90>
- Juretic N, Santibáñez JF, Hurtado C, Martínez J (2001) ERK 1,2 and p38 pathways are involved in the proliferative stimuli mediated by urokinase in osteoblastic SaOS-2 cell line. *J Cell Biochem* 83(1):92–98. <https://doi.org/10.1002/jcb.1211>
- Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262(5137):1274–1277. <https://doi.org/10.1126/science.8235659>
- Kao LS, Morris BH, Lally KP, Stewart CD, Huseby V, Kennedy KA (2006) Hyperglycemia and morbidity and mortality in extremely low birth weight infants. *J Perinatol* 26(12):730–736. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211593>
- Kemper P, Klöcker N, Labes M, Bähr M (2000) Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 in vivo. *J Neurosci* 20(2):2–8
- Klein D, Kem RM, Sokol RZ (1995) A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int* 36(1):59–66
- Kruse MS, Barutta J, Vega MC, Coirini H (2012) Down regulation of the proliferation and apoptotic pathways in the embryonic brain of diabetic rats. *Cell Mol Neurobiol* 32(6):1031–1037. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9820-8>
- Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA (1997) Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272(33):20490–20494. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20490>
- Kyosseva SV (2004) Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int Rev Neurobiol* 59:201–220. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(04\)59008-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(04)59008-6)
- Kyriakis JM, Avruch J (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev* 92(2):689–737. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2011>
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li ZG, Sima AA (2004) C-peptide and central nervous system complications in diabetes. *Exp Diabetes Res* 5(1):79–90. <https://doi.org/10.1080/15438600490424550>
- Liu D, Zhang H, Gu W, Liu Y, Zhang M (2013) Neuroprotective effects of ginsenoside Rb1 on high glucose-induced neurotoxicity in primary cultured rat hippocampal neurons. *PLoS One* 8(11):e79399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079399>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275
- McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA (2006) Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 8(9–10):1775–1789. <https://doi.org/10.1089/as.2006.8.1775>
- McLean WG (1997) The role of axonal cytoskeleton in diabetic neuropathy. *Neurochem Res* 22(8):951–956. <https://doi.org/10.1023/A:1022466624223>
- Miyashita K, Kawakami K, Nakada M, Mai W, Shikoori A, Fujisawa H, Hayashi Y, Hamada J, Minamoto T (2009) Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3beta inhibition against human glioblastoma. *Clin Cancer Res* 15(3):887–897. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0760>

5.2 Artigo submetido à revista “Biomedicine and Pharmacotherapy”

BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY 


Andrea Pereira Rosar | Log Out | Help 

[Home](#) [Reports](#)

My Author Tasks

[Start New Submission](#) [Click here to view your submissions with a final decision](#)

My Submissions with Journal (1)

<p>NEONATAL HYPERGLYCEMIA ALTERS THE EXPRESSION OF OXIDATIVE STRESS-RELATED PROTEINS</p> <p>Current status: With Editor  (19/Dec/2017)</p>	<p>BIOPHA_2017_6626 Editor-in-Chief: Danyelle Townsend</p> <p>Article Type: Research Paper Initial submission : 19/Dec/2017</p>
---	---

NEONATAL HYPERGLYCEMIA ALTERS THE EXPRESSION OF OXIDATIVE STRESS-RELATED PROTEINS

¹Andrea Pereira Rosa*, ¹Caroline Paula Mescka, ²Felipe Maciel Catarino, ³Alexandre Luz de Castro, ³Cristina Campos, ⁴Bruna Giaretta Machado, ⁴Angela de Mattos-Dutra, ³Alex Sander da Rosa Araujo and ^{1,2}Carlos Severo Dutra-Filho.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil

⁴Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS – Brazil

* Corresponding Author

Address Correspondence to:

Andrea Pereira Rosa

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: deia1018@gmail.com

Abstract

In the literature, many clinical pediatric works have been conducted on neonatal diabetes, a rare condition in neonates with low birth weight. Moreover, the consequences of hyperglycemia on the central nervous system (CNS) have received considerable attention, also same works have shown that hyperglycemia promote oxidative brain damage in both, the neonate and adult rat brain. In this context, few studies have investigated the injurious effects of hyperglycemia on the rat brain during CNS development. Thus, the present work aimed to investigate the role of oxidative stress in the brain of neonatal rats subjected to a streptozotocin-induced hyperglycemia model. Expression levels of the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), thioredoxin (Trx), heme oxygenase (HO), and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) proteins were quantified by Western blot. The activities of glutathione reductase (GR), glutamate cysteine ligase (GCL) and glutathione S-transferase (GST) and the ratio of oxidized to reduced glutathione concentration (GSSG/GSH) were also measured. No significant difference were detected in all the assays related to glutathione metabolism (GR, GCL, and GST activity and GSSG/GSH ratio). Also, the SOD and GPX levels (protein expression) were not altered by neonatal hyperglycemia. On the other hand, the brains of neonatal hyperglycemic rats exhibited with an increased CAT, HO, and Trx expression levels and with diminished Nrf2 protein expression. Finally, these results suggest that neonatal hyperglycemia promotes a counter-regulatory response to antioxidant proteins induced by oxidative stress, which seems to be insufficient and could explain the nocive effects of neonatal hyperglycemia on the CNS.

Keywords: Neonatal hyperglycemia; oxidative stress; central nervous system; glutathione; thioredoxin; heme oxygenase; nuclear factor erythroid 2-related factor 2

1. Introduction

Diabetes is a chronic disease of carbohydrate metabolism characterized by hyperglycemia that develops either when the pancreatic cells does not produce insulin or when there is a defect in insulin action, eventually resulting in a reduction of uptake and storage of glucose [1-3]. Moreover, diabetes (and its complications) is a public health problem, since actually its prevalence is 8.5 % in the adult population. Therefore, studies on this disease are important, once both the number of cases and the prevalence of diabetes have increased in the last decades [3].

Many pediatric clinical studies have been developed about neonatal diabetes in the last decade. Neonatal diabetes is a rare condition characterized by hyperglycemia diagnosed before the six months of life that may occur in preterm babies with low birth weight [4, 5]. The majority of works about neonatal diabetes focused case reports that describe symptoms, etiology and the consequences of hyperglycemia in patients [5-8]. These studies have helped to better elucidate the complete chain of steps that control glucose homeostasis [9]. However, very few studies have had the objective to understand the damaging effects of hyperglycemia on the CNS during development.

Hyperglycemia is a metabolic condition that is found in all forms of diabetes. Either in patients or in animal models, hyperglycemia promotes oxidative stress by an enhanced production of free radicals [10, 11] and/or a disturbance of antioxidant defenses [12, 13]. Reactive oxygen species produced by hyperglycemia may contribute to the CNS damage [14].

In normal conditions of cellular aerobic metabolism, the production of reactive species was neutralized by the antioxidant defense systems. However, overproduction of reactive species and/or reduction of antioxidant defenses occur in oxidative stress, resulting from cell exposure to several aggressive factors. The imbalance between reactive species production and elimination may lead to cell injury and death through alterations in the enzymatic systems, membrane transport, DNA function and others, due to protein, lipid, and DNA oxidative damage [15].

In a recent study of our group, we reported that neonatal hyperglycemia induces alterations in several parameters of oxidative stress in rat brain such as increase of reactive species (especially superoxide anion), lipid and protein oxidative damage, NADPH oxidase activity which in turn promote a compensatory increase of the antioxidant enzymes activities (SOD, CAT e GPx). In this context, oxidative stress is a possible mechanism that affects the brain in neonatal hyperglycemic rats [16]. Therefore, is important verify if hyperglycemia affect some other parameters of antioxidant defense systems, in particular regarding to the expression of proteins involved in.

In this context, a Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is activate in defense against oxidative stress in pathophysiology of diabetic neuropathy [17]. Nrf2 is a transcription factor, which was considered as primary cellular response against oxidative stress, by inducing the expression of antioxidant enzymes, such as SOD and HO-1 [18, 19]. In addition, the induction of HO-1 is an adaptive cellular defense against redox imbalance and a protection of cells in pathophysiological states including diabetes [20].

Thioredoxin (Trx) and the glutathione antioxidant system are important members of the more general thiol-reduction system. Trx effectively works in cells to control redox status with the help of peroxiredoxin [21]. An important study suggests that Trx has a protective effect on reducing oxidative stress in diabetes type 1 and 2 model [22].

Previous study from our group showed that in this model (neonatal diabetes STZ-induced) the hyperglycemia neonatal was able to induce oxidative stress by increasing reactive species production (especially superoxide anion) and by promoting lipid and protein oxidative damage [16]. Therefore, in the present work, we investigate parameters of the antioxidant system in neonatal hyperglycemic rats to explore the role of oxidative stress as a possible mechanism that may affect the brain in neonatal diabetes.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

All chemicals reagents used in this work were acquired from Sigma/Aldrich (St. Louis, MO, USA). Streptozotocin (STZ) solutions were freshly made with saline solution (70 percent of final volume) and 20mM sodium phosphate buffer pH 7.4 (30 percent of final volume).

2.2 Animals

The study and animal care were approved by the Ethics Committee for animal research at this University (Universidade Federal do Rio Grande do Sul: UFRGS: Process number: 25395). For these experiments, we utilized five-day-old Wistar rats bred in the Animal House of Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Male and female rats were utilized because they have not yet developed secondary sexual characteristics at the age of the experiments. The rats were kept with dams until sacrifice, except by a brief period of starving. The dams had free access to water and a 20 % (w/w) protein commercial chow (Germani, Porto Alegre, RS, Brazil). The rats were maintained in a room with 12:12 h light/dark cycle

(lights on 7:00–19:00 h) and with controlled temperature (22 ± 1 °C). Finally, the sample size was calculated with 80% power at the 0.05 level of significance (MiniTab®).

2.3 Streptozotocin-induced neonatal hyperglycemia and tissue preparation

The induction of neonatal hyperglycemia STZ-induced was cited before by our group [16]. First, 5-days-old Wistar rats were subjugated to eight hours of starving. After, the model of neonatal hyperglycemia was produced by a single intraperitoneal (i.p.) administration of STZ (100 mg/Kg body weight). The control group received vehicle (saline and buffer) instead. Approximately ten hours after STZ injection, rats received an i.p. injection of glucose (2 mg/g body weight) to avoid fatal hypoglycemia developed by the STZ and glucose serum levels were verified daily. Finally, five days after STZ injection the rats were sacrificed. For analyses, the rats were sacrificed by decapitation, and the brain was immediately removed, and we discarded the olfactory bulb, pons, and medulla and the whole brain was utilized.

2.4 Tissue preparation

Samples were homogenized (1:10, w/v) in 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min. at 4 °C to separate nuclei and cell debris (Lissi, Cáceres, and Videla 1986). Protein tissue concentration was determined in brain and liver supernatants using bovine serum albumin as a standard [23].

2.5 Western blot analysis

The brain was homogenized in a buffer (Tris 20 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, EDTA 5mmol/L, glycerol 10 %, phenyl methyl sulphonyl fluoride-PMSF 20 mmol/L, aprotinin 10 μ L/mL and leupeptin 10 μ L/mL). The homogenate was centrifuged to remove the nuclei and cell debris, at $1000 \times g$ for 10 minutes at 0-4 °C and the supernatants were utilized for the blot assay. We used one hundred micrograms of protein to one-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a discontinuous system using 12% (w/v) separating gel and stacking gel [24]. The proteins separated were transferred to nitrocellulose membranes electrophoretically utilizing a buffer with 150 mmol/L glycine, 20 mmol/L Tris pH 8.2 and methanol 20 % (v/v), SDS 0.1 % (w/v), in a cooled Bio-Rad Trans-Blot unit. After, one-hour incubation with non-fat milk in Tris buffer was done to block non-specific protein-binding sites. The membranes were processed for immunodetection using antibodies described in Table 1

and were revealed for chemiluminescence. We utilized an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT) for quantitatively analyze the autoradiographs produced. A standard molecular weight marker was used by reference for determining the molecular weights of the bands (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA).

The tubulin mRNA is expressed at lower levels in peripheral nerves from diabetic patients and animals [25]. Also, insulin influences the expression of the GAPDH protein in other tissues, such as adipose tissues and the liver [26]. Therefore, the STZ-induced diabetic model presented hyperglycemia and hypoinsulinemia, both of which are capable of influencing housekeeping gene expression, such as tubulin, GAPDH and structural cytoskeletal proteins. Since the levels of housekeeping proteins should be influenced by the treatment or the protocol used in this study, their utilization as a normalizer could compromise the quantification and analysis of the data. Therefore, we used the Ponceau method, which is not influenced by the STZ diabetic model [27].

2.6 Glutathione reductase activity

GR activity was measured by the method of Calberg and Manervik (1985), which is based on the reduction of GSSG by NADPH. The assay contained 10mM GSSG, 0.4mM NADPH, brain homogenate with 0.09–0.18 mg of protein, 200 mM sodium phosphate buffer and 6.3 mM EDTA pH 7.5. The consumption of a coenzyme NADPH was measured at 340 nm in a spectrophotometer. Finally, one unit of GR is defined as μmol of GSSG reduced per minute and specific activity is represented as GR units/mg protein [28].

2.7 Glutamate-cysteine ligase activity

GCL activity was measured based on the reaction of naphthalene-2,3 dicarboxialdehyde (NDA) with the γ -glutamylcysteine. The assay contained 40 mM ATP, 20 mM glutamic acid, 2 mM cysteine and brain homogenate with 0.075–0.15 mg protein. The product formed is measured at 472 nm excitation and 528 nm emission in the spectrofluorometer according to White et al (2003). One unit of GCL is defined as μmol of GSH formed per minute and specific activity is represented as GCL units/mg protein [29].

2.8 Glutathione S-transferase activity

Activity of GST was measured by the method of Habig et al. (1974), based on the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) to GSH. The product formed is measured at 340 nm in a spectrophotometer. The assay contained 100 mM potassium phosphate buffer, 50 mM CDNB, 25 mM GSH and 30 μ L of brain homogenate sample with 0.09–0.18 mg of protein. One unit of GST was defined as μ mol of CDNB conjugated to GSH per minute and the specific activity is represented as GST units/mg protein [30].

2.9 Determination of oxidized and reduced glutathione concentration

To determine of oxidized (GSSG) and reduced glutathione (GSH) concentration, the brain tissue was deproteinized with 2 mol/L perchloric acid, centrifuged for 10 min at 1,000 g, and the supernatant was neutralized with 2 mol/L potassium hydroxide. The assay of GSH determination was based on the reaction with 5.50 dithiobis (2-nitrobenzoic acid), which was catalyzed by glutathione reductase and the absorbance were measured at 420 nm in spectrophotometer. To GSSG assay determination, the n-ethylmaleimide was used to neutralize the supernatant as above described [31].

2.10 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM and compared using the Student's t-test. All analyses performed using the GraphPad Prism 5 software on a PC-compatible computer. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

First, it was necessary to prove that the model is valid; therefore, neonatal rats were considered diabetic when they presented with a significant increase in blood glucose concentration (222 ± 29 mg/dL glucose) compared to that of the control rats (122 ± 3 mg/dL glucose) $p < 0.05$. To further characterize the diabetic metabolic condition of the animals, insulin levels were measured and were found to be reduced, approximately five times lower [$t(6) = 4.63$; $p < 0.01$] (data not shown), compared to those of the control animals.

In this study, glutathione metabolism was evaluated through the activities of the GR, GST, and GCL enzymes and by the GSSG/GSH concentration. Figure 1 shows the GST (1A), GR (1B), and GCL (1C)

activities and the GSSG/GSH (1D) concentration in brain tissue. None of the glutathione metabolism parameters were significantly different in the diabetic rats compared to those of the control rats (GST: [t(14) = 0.66; p = 0.52]; GR: [t(15) = 0.35; p = 0.73]; GCL: [t(9) = 1.56; p = 0.15] and GSSG/GSH: [t(15) = 1.10; p = 0.30]).

Next, this work analysed the effect of neonatal hyperglycemia on protein involved in the antioxidant response in the rat brain, through of protein expression of Nrf2, HO, and Trx by western blot. Nrf2 protein expression was significantly decreased in the hyperglycemic group compared to that of the control group (Figure 2A) [t(6) = 2.84; p = 0.02]. HO protein expression was significantly increased in the hyperglycemic group compared to that of the control group (Figure 2B) [t(4) = 7.09; p = 0.002]. Trx protein expression was significantly increased in the hyperglycemic group compared to that of the control group (Figure 2C) [t(4) = 6.27; p = 0.003].

Finally, the effect of neonatal hyperglycemia on the protein expression of the major antioxidant enzymes CAT, SOD and GPx were investigated in the brain tissue. CAT protein expression was increased in the hyperglycemic diabetic group compared to that of the control group (Figure 3A) [t(12) = 2.35; p = 0.04]. SOD and GPx protein expression were not altered by neonatal hyperglycemia compared to the expression in the control group respectively (Figure 3B and Figure 3C) [t(12) = 0.56; p = 0.59] and [t(14) = 1.03; p = 0.32].

3. *Theory/Calculation*

The neonatal diabetes is a rare metabolic disease characterized by hyperglycemia that occurs in preterm babies and most studies of this condition focus on its etiology, symptoms, and treatments. On the other hand, few studies of neonatal rats have focused on the impact of this disease on the CNS. Based on previous findings, diabetes may lead to neuronal alterations. Thus, the molecular mechanisms by which neonatal hyperglycemia and hypoinsulinemia cause brain damage remain poorly understood. Therefore, it is important explore the antioxidant system in neonatal hyperglycemic rats to explore the role of oxidative stress as a possible mechanism that may affect the brain in neonatal diabetes.

4. *Discussion*

Diabetes was correlated with metabolic, microvascular, and neuronal tissue damage and causes pathological impact in the peripheral and central nervous system (CNS) (Reijmer et al. 2010). In both

human diabetic patients and animal models, there are impaired cognitive function, neurochemical and brain structural abnormalities [32-36].

The reactive oxygen species produced by hyperglycemia may contribute to the CNS damage [14]. Hyperglycemia, which is a metabolic condition found in all forms of diabetes, was able to cause oxidative stress by an enhanced production of free radicals [10, 11] and/or the injury of antioxidant defenses [12, 13].

Based on the fact that a previous work in our group was evidenced that the diabetic neonatal model induces an increase in reactive species (superoxide anion), promote lipid and protein oxidative damage neither. Therefore, it is important to evaluate the antioxidant system in neonatal hyperglycemic rats to analyze if the oxidative stress is a possible mechanism that affects the brain normal function [16].

In the present work, we analyzed the protein expression of the three main antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx, based on our previous study in which these enzymes showed increased activities using the same animal model [16]. Cells are equipped with an elaborated antioxidant defense system, represented by SOD, GPx and CAT enzymes, major endogenous antioxidant defenses, which directly neutralize reactive oxygen species, avoiding possible cellular damage. In this context, we found that the protein expression of CAT was increased in the brains of the diabetic group, whereas the expressions of the SOD and GPx enzymes were not different in the analyzed groups. A recent study showed a protective effect by an increase in expression and activity of antioxidant enzymes such as CAT, HO-1 and GST on dorsal root ganglion (DRG) neurons subjected to a pro-oxidant conditioning (hydrogen peroxide and glucose) [37]. In addition, although the hydrogen peroxide content did not show significant difference between the analyzed groups (data not shown), in previous studies conducted by our group, using the same experimental model, diabetic rats have presented damage to both lipids and proteins. This data indicate that reactive species were not only formed, but also capable of causing damage to the brain tissue of these animals [16].

Alterations of the activity and the expression of CAT, SOD and GPx enzymes have been reported in diabetes. Nevertheless, the literature seems to be contradictory, since it presented results about antioxidant response which permeate values of diminution, enhance or unchanged [38-40]. Such variations can be justified by differences in the age of the animals, the duration of the treatment and/or the tissue studied. In addition to changes in antioxidant enzyme activities, changes in mRNA expression of these enzymes have also been reported in several tissues [41, 42].

Against foregoing, the present study explored the role of thiol antioxidant system including glutathione and Trx system, which have an important role on controlling cellular redox status in this model [43]. Neonatal hyperglycemia did not alter the parameters of glutathione metabolism in rat brain (GR, GCL and GST activities and GSSG/GSH levels). A possible explanation for these results can involve increasing the pentose phosphate pathway, consequently elevating NADPH levels and, in this way, promote the GSH regeneration [16].

Trx protein expression may be induced by stress in order to protect tissue against apoptosis [44]. Thus, in this study we analyzed Trx protein expression in a model of STZ-induced neonatal diabetes. The increased protein expression of Trx, in the brains of diabetic rats may promote a protector effect on CNS subjected to oxidative stress. In the brain tissue, the thioredoxin system comprises Trx and Trx reductase (TrxR), a NADPH-dependent enzyme, whereas it is able to provide protection against ROS formed during various hypoxic or ischemic events [45]. In contrast to our results, one study showed that in diabetes there was a decrease in TrxR activity without changes in Trx protein levels [46]. Another study in diabetic rats shows no change in Trx activity and expression [47]. In spite of these contradictions, it is believed that the increase in the production of reactive species present in this model (superoxide anion) may contribute to this increase in the protein expression of Trx, as a protective mechanism. In addition, different treatment times (acute or chronic) may influence tissue response and can be responsible for the apparent discrepancy when comparing our results to others.

Nrf2 transcription factor is responsible for several biological functions and plays an important role in cellular redox balance by regulating the expression of genes encoding detoxification proteins and antioxidants [18, 19, 48]. Nrf2 molecules are mainly in the cytoplasm, anchored to the Kelch-like ECH-associated 1 protein (Keap1). When the cell presents some oxidative damage, the lysine residues of the Keap1 protein are modified, resulting in the breakdown of the Nrf2-Keap1 complex and the increase of free Nrf2 molecules. Nrf2 can now be translocated to the nucleus and binds to a nucleotide sequence namely antioxidant response element (ARE) in the promoter region of a battery of genes encoding antioxidant enzymes [19, 49]. The major antioxidant enzymes regulated by Nrf2 include heme oxygenase-1, Mn-superoxide dismutase, sequestosome 1, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase A1 and glutamate-cysteine ligase [50]. Recently, Nrf2 has received great attention regarding its important role against the formation of reactive species and the eventually oxidative insult promoted by hyperglycemia [17, 51-54].

In this study, levels of Nrf2 in the cytosolic portion of cells from diabetic rats were reduced when compared to the control group. Since we used the supernatant of the total brain homogenate after centrifugation, the results of Nrf2 represent the cytosolic fraction of this protein. Recent studies in brains of adult diabetic rats are in accordance with our study showing a decrease of the levels of cytosolic Nrf2 [17, 52, 54]. These results may possibly be explained by the translocation of Nrf2. In order to reinforce this hypothesis it should be pointed out that Takahashi S et al, 2012 showed that chronic hyperglycemia was able to promote the translocation of Nrf2 to the nucleus in neuronal culture verified by histochemical analysis [55]. Accordingly, when Nrf2 is translocated to the nucleus it induces the expression of various detoxification proteins and antioxidants.

Another protein that has an important correlation with the expression of Nrf2 is HO-1, which in this study had its expression increased in the diabetic group when compared to the control group. HO-1 is an EO-inducible protein, and plays a key role in protecting against oxidative damage in diabetes and cardiovascular diseases [56]. Several studies have demonstrated that brain HO-1 expression is markedly induced by several factors including brain lesions [57, 58]. A recent study has shown that the expression of HO-1 induced by hyperglycemia is mediated by the ROS signal derived from both NADPH oxidase and mitochondria in astrocytes. Consequently, these ROS activate MAPK proteins and NF- κ B and AP-1 transcription factors. These findings suggest that these astrocyte responses may exacerbate neuroinflammation or neurodegeneration derived from diabetes and hyperglycemia through hyperglycemia-induced expression of ROS-dependent HO-1 [59]. In view of these findings and based on our previous study that showed an increase of the activity of NADPH oxidase, it can be said that hyperglycemia is capable of inducing the expression of HO-1, possibly by the production of ROS (superoxide anion) in order to minimize oxidative damage to this tissue [16]. In addition, according to Yang CM et al, 2016 the activation of HO-1 expression by hyperglycemia may trigger neuroinflammatory changes and even activates signal cascades that induce neuronal apoptosis [59].

5. *Conclusions*

Finally, the STZ-induced neonatal hyperglycemia model produces a similar metabolic conditional observed in patients with neonatal diabetes (hyperglycemia and hypoinsulinemia). Likewise, we postulated that the neonatal hyperglycemia promotes a counter regulatory response by increase CAT, Trx and HO-1 and decrease Nrf2 levels. The counter regulatory response of the antioxidant proteins induced

by oxidative stress, which in turn seems to be insufficient, that could explain the harmful effects of neonatal hyperglycemia on the CNS.

6. Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

7. References

1. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. **27**(5): p. 1047-53.
2. Quinn, L., *Type 2 diabetes: epidemiology, pathophysiology, and diagnosis*. Nurs Clin North Am, 2001. **36**(2): p. 175-92, v.
3. (NCD-RisC), N.R.F.C., *Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants*. Lancet, 2016. **387**(10027): p. 1513-30.
4. Srinivasan, V., et al., *Association of timing, duration, and intensity of hyperglycemia with intensive care unit mortality in critically ill children*. Pediatr Crit Care Med, 2004. **5**(4): p. 329-36.
5. Hays, S.P., E.O. Smith, and A.L. Sunchag, *Hyperglycemia is a risk factor for early death and morbidity in extremely low birth-weight infants*. Pediatrics, 2006. **118**(5): p. 1811-8.
6. Ertl, T., et al., *Relationship between hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants*. Biol Neonate, 2006. **89**(1): p. 56-9.
7. Garg, R., et al., *Hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants*. J Perinatol, 2003. **23**(3): p. 186-94.
8. Kao, L.S., et al., *Hyperglycemia and morbidity and mortality in extremely low birth weight infants*. J Perinatol, 2006. **26**(12): p. 730-6.
9. Aguilar-Bryan, L. and J. Bryan, *Neonatal diabetes mellitus*. Endocr Rev, 2008. **29**(3): p. 265-91.
10. Baynes, J.W., *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes*. Diabetes, 1991. **40**(4): p. 405-12.
11. Baynes, J.W. and S.R. Thorpe, *Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm*. Diabetes, 1999. **48**(1): p. 1-9.
12. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 1-85.
13. McLennan, S.V., et al., *Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes*. Diabetes, 1991. **40**(3): p. 344-8.
14. Ye, L., F. Wang, and R.H. Yang, *Diabetes impairs learning performance and affects the mitochondrial function of hippocampal pyramidal neurons*. Brain Res, 2011. **1411**: p. 57-64.
15. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Free Radical Biology and Medicine*. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. 2007, England: Oxford.
16. Rosa, A.P., et al., *Neonatal hyperglycemia induces oxidative stress in the rat brain: the role of pentose phosphate pathway enzymes and NADPH oxidase*. Mol Cell Biochem, 2015. **403**(1-2): p. 159-67.
17. Negi, G., A. Kumar, and S.S. Sharma, *Nrf2 and NF- κ B modulation by sulforaphane counteracts multiple manifestations of diabetic neuropathy in rats and high glucose-induced changes*. Curr Neurovasc Res, 2011. **8**(4): p. 294-304.
18. Jaiswal, A.K., *Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(10): p. 1199-207.
19. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 76-86.
20. Song, F., et al., *Effect of Momordica grosvenori on oxidative stress pathways in renal mitochondria of normal and alloxan-induced diabetic mice. Involvement of heme oxygenase-1*. Eur J Nutr, 2007. **46**(2): p. 61-9.

21. Rhee, S.G., H.Z. Chae, and K. Kim, *Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(12): p. 1543-52.
22. Yamamoto, M., et al., *Transgenic expression of antioxidant protein thioredoxin in pancreatic beta cells prevents progression of type 2 diabetes mellitus*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(1): p. 43-9.
23. LOWRY, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
24. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
25. McLean, W.G., *The role of axonal cytoskeleton in diabetic neuropathy*. Neurochem Res, 1997. **22**(8): p. 951-6.
26. Alexander, M.C., et al., *Insulin stimulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression through cis-acting DNA sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5092-6.
27. Klein, D., R.M. Kern, and R.Z. Sokol, *A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes*. Biochem Mol Biol Int, 1995. **36**(1): p. 59-66.
28. Carlberg, I. and B. Mannervik, *Glutathione reductase*. Methods Enzymol, 1985. **113**: p. 484-90.
29. White, C.C., et al., *Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity*. Anal Biochem, 2003. **318**(2): p. 175-80.
30. Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem, 1974. **249**(22): p. 7130-9.
31. Akerboom, T.P. and H. Sies, *Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples*. Methods Enzymol, 1981. **77**: p. 373-82.
32. Biessels, G.J., et al., *Ageing and diabetes: implications for brain function*. Eur J Pharmacol, 2002. **441**(1-2): p. 1-14.
33. Biessels, G.J. and W.H. Gispen, *The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models?* Neurobiol Aging, 2005. **26 Suppl 1**: p. 36-41.
34. Drel, V.R. and N. Sybirna, *Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats*. Cell Biol Int, 2010. **34**(12): p. 1147-53.
35. Reijmer, Y.D., et al., *Cognitive dysfunction in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 2010. **26**(7): p. 507-19.
36. Navaratna, D., et al., *Decreased cerebrovascular brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection in the diabetic brain*. Diabetes, 2011. **60**(6): p. 1789-96.
37. Vincent, A.M., et al., *Sensory neurons and schwann cells respond to oxidative stress by increasing antioxidant defense mechanisms*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(3): p. 425-38.
38. Tripathi, U.N. and D. Chandra, *Anti-hyperglycemic and anti-oxidative effect of aqueous extract of Momordica charantia pulp and Trigonella foenum graecum seed in alloxan-induced diabetic rats*. Indian J Biochem Biophys, 2010. **47**(4): p. 227-33.
39. Jabeen, R. and M. Saleemuddin, *Polyclonal antibodies inhibit the glycation-induced inactivation of bovine Cu,Zn-superoxide dismutase*. Biotechnol Appl Biochem, 2006. **43**(Pt 1): p. 49-53.
40. Scott, J.A. and G.L. King, *Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1031**: p. 204-13.
41. Sadi, G., et al., *Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys*. Diabetes Metab Res Rev, 2012. **28**(3): p. 228-35.
42. Matsunami, T., et al., *Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure*. Int J Clin Exp Pathol, 2009. **3**(2): p. 177-88.
43. Holmgren, A., *Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems*. Antioxid Redox Signal, 2000. **2**(4): p. 811-20.
44. Nakamura, H., K. Nakamura, and J. Yodoi, *Redox regulation of cellular activation*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 351-69.
45. Siu, F.K., S.C. Lo, and M.C. Leung, *Electroacupuncture reduces the extent of lipid peroxidation by increasing superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in ischemic-reperfused rat brains*. Neurosci Lett, 2004. **354**(2): p. 158-62.
46. Schulze, P.C., et al., *Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30369-74.
47. Lappalainen, Z., et al., *Diabetes impairs exercise training-associated thioredoxin response and glutathione status in rat brain*. J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(2): p. 461-7.

48. Venugopal, R. and A.K. Jaiswal, *Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14960-5.
49. Li, W. and A.N. Kong, *Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response*. Mol Carcinog, 2009. **48**(2): p. 91-104.
50. Nguyen, T., P. Nioi, and C.B. Pickett, *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13291-5.
51. Zhao, S., et al., *Neurotoxic effects of iron overload under high glucose concentration*. Neural Regen Res, 2013. **8**(36): p. 3423-33.
52. Agca, C.A., et al., *Taurine ameliorates neuropathy via regulating NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling cascades in diabetic rats*. Food Chem Toxicol, 2014. **71**: p. 116-21.
53. Liu, Y.W., et al., *Mangiferin Upregulates Glyoxalase 1 Through Activation of Nrf2/ARE Signaling in Central Neurons Cultured with High Glucose*. Mol Neurobiol, 2016.
54. Sahin, K., et al., *The effects of chromium picolinate and chromium histidinate administration on NF- κ B and Nrf2/HO-1 pathway in the brain of diabetic rats*. Biol Trace Elem Res, 2012. **150**(1-3): p. 291-6.
55. Takahashi, S., Y. Izawa, and N. Suzuki, *Astroglial pentose phosphate pathway rates in response to high-glucose environments*. ASN Neuro, 2012. **4**(2).
56. Cao, J., et al., *Physiological significance of heme oxygenase in hypertension*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(5): p. 1025-33.
57. Syapin, P.J., *Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders*. Br J Pharmacol, 2008. **155**(5): p. 623-40.
58. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications*. Physiol Rev, 2006. **86**(2): p. 583-650.
59. Yang, C.M., C.C. Lin, and H.L. Hsieh, *High-Glucose-Derived Oxidative Stress-Dependent Heme Oxygenase-1 Expression from Astrocytes Contributes to the Neuronal Apoptosis*. Mol Neurobiol, 2016.

Table 1: Description of the antibodies and the respective dilutions utilized for Western blot analysis.

Primary Antibodies from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	Secondary Antibodies from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	Dilution
Rabbit anti-Cu/Zn SOD polyclonal	Goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate	1:500
Rabbit anti-CAT polyclonal	Goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate	1:500
Rabbit anti-GPx polyclonal	Goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate	1:500
Rabbit anti-Trx 1 polyclonal	Goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate	1:1000
Rabbit anti-HO-1 polyclonal	Goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate	1:1000
Rabbit anti-Nrf2 polyclonal	Goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate	1:500

Figure caption list

Figure 1: Effect of neonatal hyperglycemia on the activities of glutathione s-transferase (GST) (A), glutathione reductase (GR) (B), glutamate cysteine ligase (GCL) (C) and the content of oxidized and reduced glutathione concentration (GSSG/GSH) (D) in the rat brain. Results are the mean \pm SEM (n =8-14) of independent experiments performed in duplicate. *p<0.05 and **p<0.01 compared to control (Student's t test).

Figure 2: Western blot analyses on STZ-induced neonatal hyperglycemia using Nrf2 antibody (A) HO antibody (B) and Trx antibody (C). Results are mean \pm SEM (n=6-8) for independent experiments performed in duplicate *p<0.05 and **p<0.01 compared to control (Student's t test).

Figure 3: Western blot analyses on STZ-induced neonatal hyperglycemia using CAT antibody (A), SOD antibody (B) and GPx antibody (C). Results are mean \pm SEM (n=6-8) for independent experiments performed in duplicate *p<0.05 and **p<0.01 compared to control (Student's t test).

Figure 1

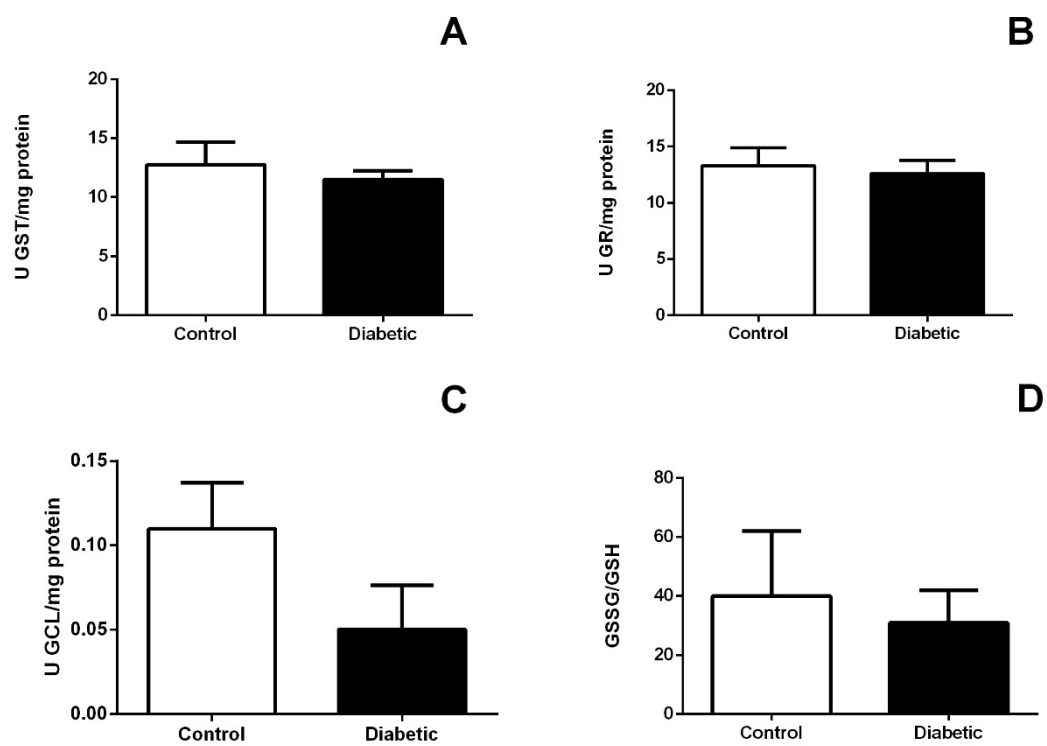


Figure 2

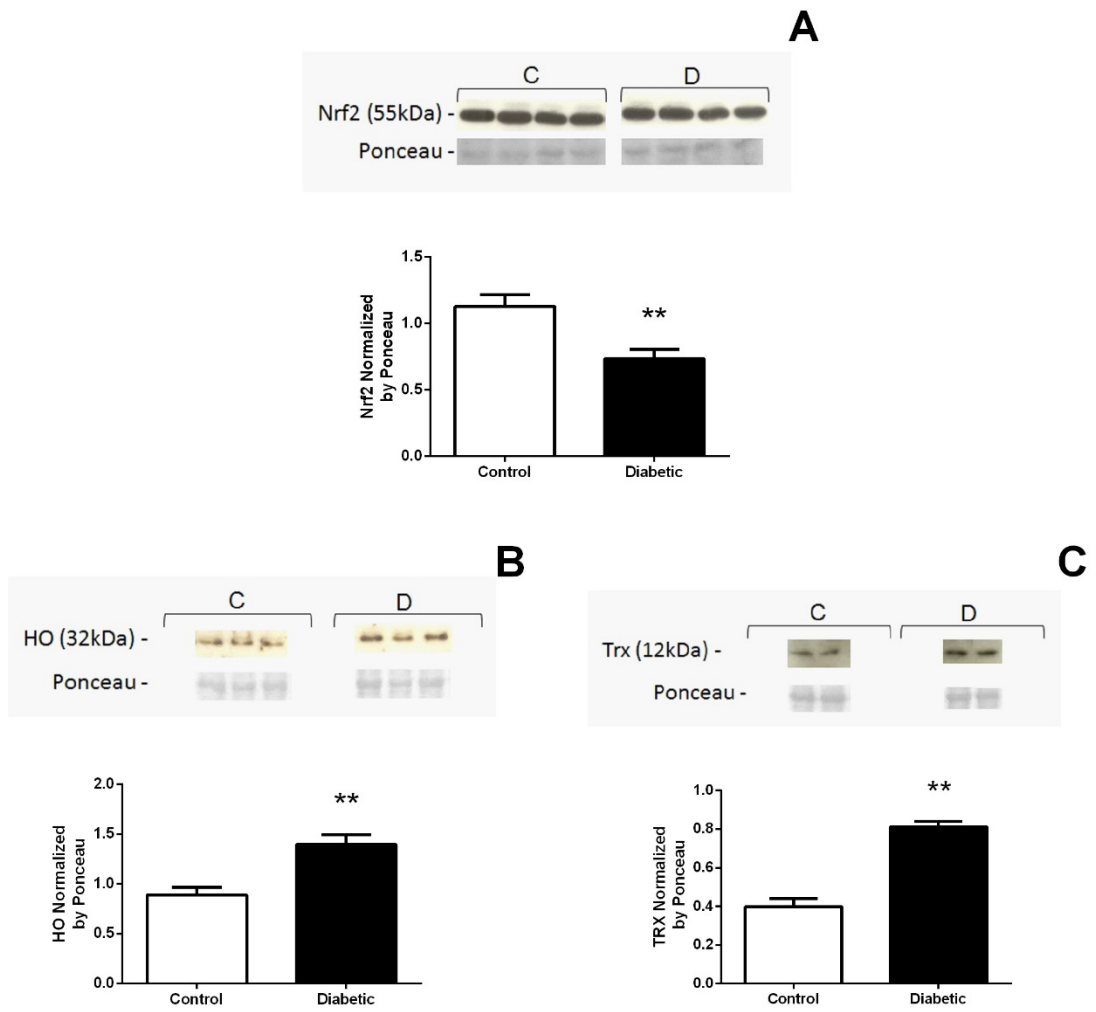
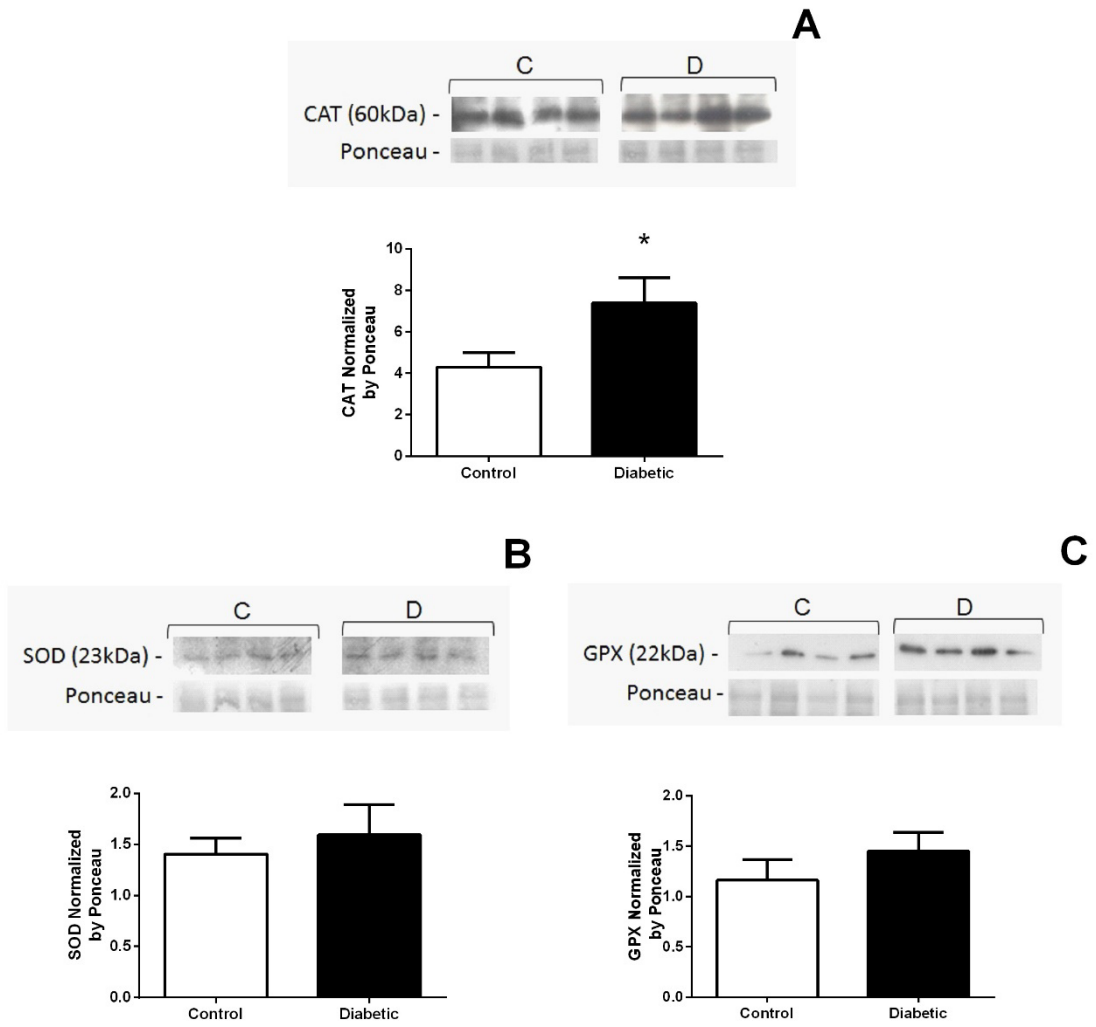


Figure 3



5.3 Resultados da Medida do Peróxido de Hidrogênio

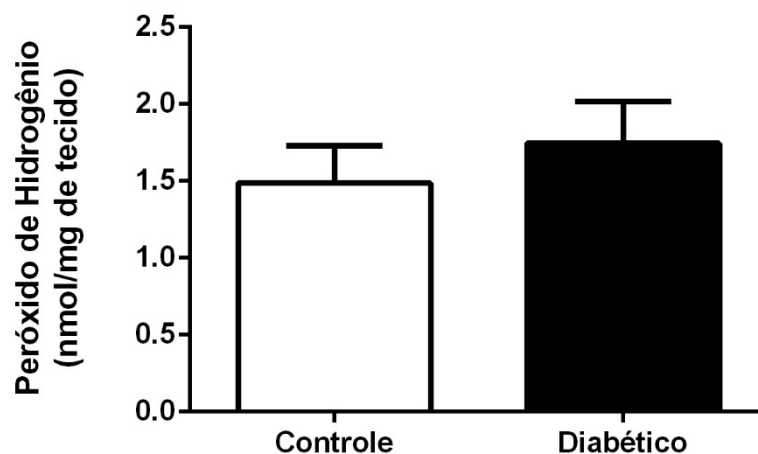


Figura 1: Efeito da hiperglicemia neonatal sobre a medida do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão ($n= 10-16$) para experimentos independentes realizados em duplicata. Resultados com valores de $*p<0,05$ foram considerados significativos (teste t student).

PARTE III

6. DISCUSSÃO

O nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores desenvolveu um modelo animal com o intuito de mimetizar os efeitos hiperglicemia encontrada em humanos durante os seis primeiros meses de vida para, finalmente, investigar alguns dos efeitos deletérios da hiperglicemia com enfoque principal no tecido cerebral (Rosa *et al.*, 2015). Mesmo assim, vistos os poucos relatos a respeito de diabetes induzida por STZ no período neonatal de ratos (Portha *et al.*, 1974; Takada *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2015). Sendo que, a maioria das pesquisas clínicas e experimentais existentes na literatura sobre a diabetes é realizada, tanto em pacientes quanto em animais na idade adulta e mimetiza, principalmente, as diabetes melito tipo 1 e tipo 2 (Ulusu *et al.*, 2003; Kabay *et al.*, 2009; Nakhaee *et al.*, 2010; Cumaoglu *et al.*, 2011). Diante destes fatores, cabe ressaltar que grande parte das comparações e discussões realizadas neste trabalho foram feitas com animais (ratos) na idade adulta.

Os estudos com animais que utilizam 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 na sua estrutura química 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 metil nitrosourea, 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 (Yamamoto *et al.*, 1981; Pieper *et al.*, 1999). Na tentativa de reparo ao DNA, a enzima poli-ADP-ribose polimerase (PARP) é superestimulada, levando à diminuição dos estoques de NAD⁺ e, posteriormente, ATP (Schein e Loftus, 1968; Yamamoto *et al.*, 1981; Uchigata *et al.*, 1982). O esgotamento da energia celular resulta finalmente em apoptose das células β (Heller *et al.*, 1994; Elsner *et al.*, 2002). A propriedade de alquilação ao DNA é o principal mecanismo relacionado a toxicidade da STZ (Szkudelski, 2001).

Recentemente, as consequências neurológicas da hiperglicemia no sistema nervoso central (SNC) têm recebido maior atenção. Alguns estudos mostram que a hiperglicemia é capaz de produzir alterações moleculares, celulares e morfológicas no SNC (Reagan *et al.*, 1999). No entanto, os mecanismos responsáveis pelo dano cerebral permanecem ainda pouco esclarecidos, principalmente, relativo ao período neonatal.

Várias evidências indicam que o dano oxidativo induzido pela hiperglicemia possa contribuir para os danos ao SNC. As espécies reativas produzidas pelo quadro hiperglicêmico podem prejudicar as estruturas do tecido nervoso, pois reagem com os neurônios e células de Schwann, devido ao seu alto teor de lipídeos poli-insaturados (Kumar e Menon, 1993; Aragno *et al.*, 2000). Estudos em humanos e em ratos diabéticos têm mostrado que a hiperglicemia induz EO, apontando o aumento da produção de radicais livres como um mecanismo na neurotoxicidade da hiperglicemia gerada na diabetes (Baynes, 1991; Chang *et al.*, 1993; Baynes e Thorpe, 1999) e/ou do prejuízo das defesas antioxidantes (McLennan *et al.*, 1991; Biessels *et al.*, 2002). Com

relação ao papel do EO na diabetes, um estudo recente desenvolvido pelo nosso grupo neste mesmo modelo agudo, em tecido cerebral, vai ao encontro com os resultados citados acima e mostra 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 e a carbonilação proteica, apesar da elevação das atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) (Rosa *et al.*, 2015).

Diante destes resultados, com o intuito de aprofundar as análises de parâmetros de EO analisamos no presente trabalho o conteúdo de H_2O_2 e verificamos que não houve diferença significativa entre o grupo diabético e controle (Figura 1). O ânion superóxido pode originar o H_2O_2 mediante reação de dismutação catalisada pela enzima SOD, (Mccord e Fridovich, 1969). Posteriormente, o H_2O_2 é degradado pelas enzimas CAT e pela GPx, as quais se mostraram com atividades elevadas no nosso trabalho anterior, o que pode explicar o fato de não haver o acúmulo desta espécie reativa no cérebro de ratos diabéticos quando comparado ao grupo controle (Rosa *et al.*, 2015).

Já com relação à avaliação das defesas antioxidantes avaliamos parâmetros relacionados ao metabolismo da glutathiona. Primeiramente, foi analisada a atividade da enzima GR, esta não atua diretamente na remoção de espécies reativas, porém é fundamental para a regeneração da GSH (Carlberg e Mannervik, 1985). Com relação a esta enzima não foi observada diferença significativa no grupo diabético quando comparado ao grupo controle. A GR é uma enzima dependente de NADPH e, conseqüentemente, também dependente da integridade da via das pentoses (Carlberg e Mannervik, 1985). No nosso estudo anterior, verificou-se um aumento da atividade de duas

enzimas fundamentais da via das pentoses fosfato (G6PD e 6PDG), sendo que ambas produzem NADPH, uma coenzima necessária em vários sistemas redutores, inclusive na regeneração da GSH pela GR. Portanto, sugere-se que o sistema de regeneração da GSH deste modelo agudo pode estar em equilíbrio, pois o NADPH, substrato da GR, está sendo produzido em quantidades adequadas (Rosa *et al.*, 2015).

No ensaio da GST, uma enzima que catalisa a detoxificação de vários compostos, xenobióticos e peróxidos (Ramsay e Dilda, 2014), também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos diabético e controle. Com relação ao ensaio da enzima GCL não foi encontrada diferença significativa entre os grupos estudados. A GCL é responsável pela etapa limitante da síntese de GSH, ou seja, quando a concentração intracelular de GSH está baixa, a GCL é estimulada por retroalimentação negativa e mais GSH é produzida (Lu, 2013). Nossos resultados se mostraram diferentes dos obtidos por alguns estudos, nos quais foi observada a redução tanto da GR, quanto da GST na diabetes induzida por STZ (Raza e John, 2004; Ashafaq *et al.*, 2014). No entanto, a possível justificativa seria o tempo de tratamento e a idade dos animais, já que estes estudos realizaram as análises em um modelo de hiperglicemia crônica em ratos adultos, enquanto que as análises deste trabalho foram realizadas em um modelo agudo e em ratos neonatos, o que pode ter contribuído para esta diferença nos resultados.

Quando o organismo apresenta um excesso de oxidantes e/ou uma deficiência do sistema de defesa ocorre um desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG. Portanto, a razão dessas duas moléculas é utilizada para medir o nível de dano oxidativo ao qual o tecido está submetido

(Ferreira e Matsubara, 1997). Neste ensaio citado não foi verificada diferença significativa entre os grupos analisados. Estes resultados estão de acordo com os resultados que mostraram que a atividade da GR também se mostrou inalterada neste modelo agudo. A GR é a enzima responsável pela regeneração da GSH e neste estudo verificou-se que ambas GSSG/GSH estão em equilíbrio. Podemos justificar este equilíbrio neste modelo agudo pela hipótese de que GR não apresentou alteração significativa em sua atividade e teve suprimento adequado de NADPH, a partir da via das pentoses. Desta forma podemos considerar que a GSH também se apresentou inalterada, pois a manutenção da forma reduzida da glutathiona depende da atividade da GR e dos níveis de NADPH (Rosa *et al.*, 2015). Finalmente, nossos resultados mostram que o metabolismo da glutathiona parece não estar alterado no modelo de hiperglicemia neonatal, visto que as enzimas GST, GR, GCL e a razão GSSG/GSH não mostram diferença estatística entre os grupos analisados.

Como já dito anteriormente, a situação metabólica encontrada no diabetes pode tornar os tecidos mais suscetíveis ao EO (Atalay *et al.*, 2004). A expressão da proteína TRX é afetada pelo estresse e tem a capacidade de proteger o tecido contra a apoptose induzida pelo EO (Nakamura *et al.*, 1997). Portanto, a expressão proteica da TRX mostrou-se aumentada no cérebro dos ratos diabéticos quando comparada a expressão proteica no cérebro dos animais pertencentes ao grupo controle. No tecido cerebral, o sistema tiorredoxina compreende a TRX e TRX redutase, enzima dependente de NADPH, podendo proporcionar uma proteção as ERO formadas durante vários eventos de hipóxia ou isquemia (Siu *et al.*, 2004; Stroeve *et al.*, 2004). Em contraste com o nosso resultado, um estudo mostrou que no diabetes houve

uma diminuição na atividade da TxrR sem alterações nos níveis da proteína TRX (Schulze *et al.*, 2004). Já outro estudo realizado em ratos diabéticos não mostra alterações na atividade e na expressão da TRX (Lappalainen *et al.*, 2009). Apesar dessas contrariedades, acredita-se que o aumento na produção de espécies reativas, já mostrado neste modelo (ânion superóxido), possa colaborar para este resultado de aumento na expressão proteica da TRX, com o intuito protetor exercido por essa molécula. Além disso, o tempo de tratamento influencia na resposta do tecido, estes estudos com resultados diferentes dos nossos são considerados crônicos, enquanto que o nosso estudo é considerado agudo e, portanto mais compatível com o mecanismo de resposta citado acima como uma justificativa para o nosso resultado.

Ainda com relação às defesas antioxidantes, avaliamos neste trabalho a expressão do fator de transcrição Nrf2, que é responsável por diversas funções biológicas e desempenha um importante papel no equilíbrio redox celular através da regulação da expressão de genes que codificam proteínas de detoxificação e antioxidantes (Venugopal e Jaiswal, 1996; Itoh *et al.*, 1999; Jaiswal, 2004). Quando a célula se encontra sem estímulo de alteração redox as moléculas de Nrf2 estão principalmente no citoplasma, ancoradas à proteína Kelch-like associada ao ECH 1 (Keap1) e normalmente ocorre a ubiquitinação de Nrf2 e subsequente degradação no proteossoma. Já quando a célula se encontra em resposta ao dano oxidativo, os resíduos de lisina da proteína Keap1 são modificados, resultando na ruptura do complexo e no aumento de moléculas de Nrf2 livres. As moléculas livres de Nrf2 serão então translocadas para o núcleo e o Nrf2 liga-se à sequência de nucleotídeos, nomeadamente o elemento de resposta antioxidante (ARE), na região promotora de uma bateria

de genes que codificam enzimas antioxidantes (Itoh *et al.*, 1999; Li e Kong, 2009). As principais enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2 incluem heme oxigenase 1, Mn-superóxido dismutase, sequestossome 1, NAD(P)H quinona oxidorreductase 1, glutatona peroxidase, glutatona S-transferase A1 e glutamato-cisteína ligase (Nguyen *et al.*, 2009). Além disso, várias outras proteínas cinases incluindo MAPK, PERK e AKT, também podem ser capazes de fosforilar Nrf2 e estimular sua translocação e ação nucleares (Huang *et al.*, 2000; Cullinan *et al.*, 2003; Brunt *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). No diabetes ele pode ser avaliado como um parâmetro importante de defesa diante da hiperglicemia e a consequente formação de espécies reativas (Negi *et al.*, 2011; Sahin *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013; Agca *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016).

No presente trabalho, verificou-se a diminuição da expressão do Nrf2 na porção citosólica de ratos diabéticos quando comparado ao grupo controle. Cabe ressaltar que a amostra utilizada no nosso trabalho é o sobrenadante do homogeneizado de cérebro total após centrifugação; portanto, correspondente a porção citosólica celular, já que todos os estudos anteriores do nosso grupo avaliaram este mesmo compartimento celular. Estudos recentes realizados em cérebros de ratos adultos diabéticos estão de acordo com o nosso trabalho mostrando a diminuição da expressão de Nrf2, sendo que em todos estes estudos as amostras de cérebro foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado nas análises de expressão proteica (Negi *et al.*, 2011; Sahin *et al.*, 2012; Agca *et al.*, 2014). Desse modo, esses resultados nos levaram a criar uma hipótese na qual os níveis mais baixos de Nrf2 no grupo diabético, quando comparados ao grupo controle, podem ser possivelmente explicados pela sua translocação ao núcleo graças a um estímulo celular que requisitou a transcrição de diversas

enzimas que participam dos processos de proteção tecidual. Com o intuito de reforçar esta hipótese cabe ressaltar que Takahashi *et al*, 2012 mostrou que a hiperglicemia crônica foi capaz de promover a translocação do Nrf2 para o núcleo em cultura neuronal, verificado através de análises histoquímicas. Conseqüentemente, o Nrf2 quando translocado para o núcleo tem a finalidade de induzir a expressão de várias proteínas de detoxificação e antioxidantes (Takahashi *et al.*, 2012).

Ainda no cenário das defesas antioxidantes, as células são equipadas com um elaborado sistema enzimático, sendo que a primeira linha de defesa é constituída pelas enzimas antioxidantes, SOD, GPx e CAT, que diretamente neutralizam os radicais livres, evitando possíveis danos celulares (Halliwell e Gutteridge, 2007). No presente trabalho, analisou-se a expressão proteica dessas três principais enzimas antioxidantes, uma vez que suas atividades enzimáticas estavam aumentadas, como observado em estudos anteriores usando o mesmo modelo animal (Rosa *et al.*, 2015). Diante disso, verificamos que a expressão proteica da CAT se mostrou aumentada no cérebro do grupo diabético quando comparado ao grupo controle, enquanto que as expressões das enzimas SOD e GPx não se mostraram diferentes nos grupos analisados. Este resultado corrobora com o nosso resultado relativo ao conteúdo de peróxido de hidrogênio, que não mostrou diferença significativa entre os grupos analisados, ou seja, no grupo hiperglicêmico o H₂O₂ pode estar sendo formado, mas não sofre um acúmulo detectável na técnica analisada possivelmente devido à expressão e atividade aumentadas da catalase. Além disso, reforçando esta ideia um estudo recente apresentou um efeito protetor da elevação da expressão e atividade da catalase em neurônios da raiz dorsal do

gânglio, submetidos a condicionamento pró-oxidante (peróxido de hidrogênio e glicose) (Vincent *et al.*, 2009).

O diabetes é uma condição conhecida por induzir alterações nas atividades e expressão das enzimas CAT, SOD e GPx; entretanto, os resultados existentes na literatura são variados (Scott e King, 2004; Jabeen e Saleemuddin, 2006; Tripathi e Chandra, 2010). Os diferentes dados incluem diminuição, aumento ou nenhuma alteração nas atividades e expressão de enzimas antioxidantes em animais diabéticos. Estas variações podem ser justificadas pelas diferenças na idade dos animais, na duração do tratamento e ou no tecido a ser estudado. Além das alterações na atividade das enzimas antioxidantes, alterações na expressão de mRNA destas enzimas também foram relatados em vários tecidos (Matsunami *et al.*, 2009; Sadi *et al.*, 2012).

Outra proteína, regulada pelo Nrf2, é a HO-1, a qual neste trabalho, teve sua expressão aumentada no grupo diabético quando comparado ao grupo controle. A HO-1 é uma proteína induzível pelo EO, e possui um papel fundamental na proteção contra danos oxidativos no diabetes e em doenças cardiovasculares (Cao *et al.*, 2009). Vários estudos demonstraram que a expressão de HO-1 cerebral é marcadamente induzida por diversos fatores incluindo lesões cerebrais (Ryter *et al.*, 2006; Syapin, 2008). Um estudo recente mostrou que em astrócitos a expressão de HO-1 induzida por hiperglicemia é mediada pelo sinal de ERO derivado tanto da NADPH oxidase quanto da mitocôndria. Estas espécies podem ativar as proteínas MAPK e os fatores de transcrição NFκB e AP-1 e exacerbar a neuroinflamação ou neurodegeneração derivada de diabetes e hiperglicemia. Neste contexto, a ruptura dessa homeostase pode provocar a modulação da expressão de HO-1,

tendo como mediadores as ERO induzida por hiperglicemia (Yang *et al.*, 2016). Diante desses achados e baseado no nosso estudo anterior (que mostra o aumento da atividade da NADPH oxidase), podemos sugerir que a hiperglicemia é capaz de induzir a expressão da HO-1 possivelmente pela produção de ERO (ânion superóxido), como uma resposta contrarregulatória para minimizar o dano oxidativo a este tecido (Rosa *et al.*, 2015). Além disso, segundo Yang CM *et al.*, 2016 a ativação da expressão da HO-1 pela hiperglicemia pode desencadear alterações neuroinflamatórias e até ativar vias que induzem a apoptose neuronal.

Evidências recentes mostram que a hiperglicemia, condição metabólica presente em todas as formas de diabetes, parece estar envolvida em danos ao SNC devido aos altos níveis de glicose, assim como alterar vias de sinalização envolvidas com a sobrevivência e morte celular neuronal (Kummer *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016).

A via das MAPKs parece estar alterada em condições hiperglicêmicas e tem sido correlacionada com os danos ao cérebro induzidos pela hiperglicemia (Evans *et al.*, 2002; Venkatachalam *et al.*, 2008; Soetikno *et al.*, 2012). Diante disso, o presente trabalho analisou a expressão proteica da p38 e JNK, visto que, segundo alguns estudos, estas proteínas parecem sofrer alterações mais expressivas na condição diabética (Ho *et al.*, 2000; Cavaletti *et al.*, 2007). A hiperglicemia neonatal foi capaz de aumentar a expressão proteica da p38 e não foi capaz de alterar a expressão proteica da JNK e p-JNK, apesar do grupo diabético mostrar valores de JNK 1,75 vezes maior que os controles. Diante disso, cabe ressaltar que o modelo de hiperglicemia neonatal induzido por STZ, utilizado neste trabalho, foi capaz de produzir nos animais: hiperglicemia e uma

baixa sinalização de insulina, a fim de mimetizar nos animais a condição metabólica presente nos recém-nascidos com DN (Rosa *et al.*, 2015). Portanto, baseado no fato de que a proteína p38 é negativamente regulada pela insulina no cérebro (Kummer *et al.*, 1997) podemos sugerir que a falha na sinalização da insulina presente neste modelo pode ter um papel no aumento da expressão proteica da p38. Estudos recentes realizados em ratos diabéticos (induzidos com STZ) estão de acordo com os nossos resultados, nos quais foi observado o aumento na expressão da p38 em várias estruturas cerebrais (Ramakrishnan *et al.*, 2005; Cavaletti *et al.*, 2007). Além disso, Ramakrishnan R *et al.*, (2005) realizaram a administração de insulina e o efeito de aumento da expressão da p38 foi revertido.

Sequencialmente, a ativação da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) pela sinalização de insulina é capaz de evitar a apoptose em células da retina e gânglios (Kermer *et al.*, 2000; Barber *et al.*, 2001; Politi *et al.*, 2001). Pois a sinalização da via PI3K/AKT é responsável pelos efeitos de sobrevivência e função neuronal desenvolvidos pela insulina e IGF (Duarte *et al.*, 2008). Diante disso, estudamos neste modelo a expressão da AKT, proteína chave envolvida nos processos de sobrevivência e crescimento celular (Scheid e Woodgett, 2001; Hanada *et al.*, 2004). Neste sentido, os cérebros dos ratos com hiperglicemia neonatal não mostraram alteração na expressão proteica de AKT total e apresentaram uma diminuição na expressão da proteína p-AKT, provavelmente pela diminuição na sinalização de insulina. Em acordo com os nossos resultados, um estudo realizado em células da retina mostrou que elevados níveis de glicose diminuem a expressão da p-AKT *in vitro* e *in vivo*. Além disso, neste mesmo estudo a diminuição da sinalização de sobrevivência

da p-AKT foi responsável em parte pela apoptose causada pela hiperglicemia (Xi *et al.*, 2005).

Outra proteína envolvida na via de sinalização da insulina através do PI3K é a GSK3 β . O aumento da atividade dessa proteína está correlacionado com alterações cerebrais presentes em doenças neurodegenerativas (Jope e Johnson, 2004). Um estudo recente, que utilizou um tratamento de diabetes com nove semanas sem insulina, mostrou uma diminuição significativa na fosforilação do receptor de insulina, essa diminuição na fosforilação promove a fosforilação e o consequente aumento na atividade da GSK3 β (Jolivalt *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2013). No entanto, no presente estudo a expressão da proteína GSK3 β não foi alterada no modelo de hiperglicemia neonatal. Diante disso, torna-se importante ressaltar que o nosso trabalho verificou um curto período de tempo (5 dias de tratamento) que pode não ter sido suficiente para alterar a expressão dessa proteína.

Estudos recentes mostram que a morte celular por apoptose tem um importante papel na neurotoxicidade do diabetes (Zhang *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2011). Baseado nessa evidência e nas alterações acima citadas em proteínas que estão envolvidas em vias de sobrevivência e morte celular, o presente estudo analisou a morte celular neuronal através da técnica de FluoroJade C em cérebro de ratos com hiperglicemia neonatal induzida por STZ. Nossos resultados mostraram que os cérebros de ratos com hiperglicemia neonatal possuem cerca de três vezes mais neurônios mortos com marcação fluorescente quando comparado aos cérebros de ratos controles. Este resultado está de acordo com estudos realizados em cultura de células neuronais, que quando submetidas a altos níveis de glicose apresentam uma

diminuição na viabilidade celular (Liu *et al.*, 2013; Afrazi *et al.*, 2014; Aminzadeh *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016). Ao encontro com estes resultados, Wu KJ *et al.* (2012) mostraram um aumento no número de células positivas através de uma técnica de morte celular (TÚNEL) em córtex e hipocampo de ratos com diabetes induzida por STZ (Wu *et al.*, 2012). Além disso, um estudo recente mostrou que a hiperglicemia é capaz de promover morte celular neuronal através da produção de ERO via NADPH oxidase e via mitocondrial, sugerindo então o potencial da hiperglicemia em promover dano oxidativo e conseqüentemente dano neuronal (Yang *et al.*, 2016). De acordo com o contexto, ERO que são produzidas durante o EO parecem estar envolvidas na ativação de algumas vias de sinalização para morte celular.

Nesse sentido, modelos de superexpressão do gene da Bcl2 mostram a proteção das células através da supressão da lipoperoxidação (Hockenbery *et al.*, 1993), do aumento do conteúdo da GSH e NADPH em dois tipos de células neuronais (Kane *et al.*, 1993; Ellerby *et al.*, 1996; Esposti *et al.*, 1999) e do aumento de CAT, GR e GPx (Ellerby *et al.*, 1996). No presente trabalho, a expressão proteica da proteína Bcl2 foi aumentada no cérebro de ratos com hiperglicemia neonatal quando comparado ao cérebro dos animais do grupo controle. Segundo Ellerby LM *et al.*, 1996 a superexpressão da Bcl2 é capaz de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, cabendo ressaltar neste momento, que é o resultado que temos em estudos anteriores neste mesmo modelo (aumento da atividade da SOD, CAT e GPx) (Rosa *et al.*, 2015).

No nosso estudo, os ratos com diabetes neonatal apresentaram hiperglicemia e baixa sinalização de insulina, sendo que nestas condições os cérebros dos ratos mostraram uma diminuição na expressão da proteína de

sobrevivência p-AKT e um aumento na expressão da proteína p38, direcionando assim a célula à morte celular, que foi constatada no cérebro dos ratos com hiperglicemia neonatal. Diante desses fatos, acreditamos na possibilidade do resultado de aumento na expressão da proteína Bcl2 encontrado no cérebro dos animais diabéticos possa ser devido a um efeito contra regulatório ao processo de morte celular, enquanto que a proteína Bax não mostrou alteração nos níveis de expressão proteica. Existem estudos recentes que mostram resultados contrários aos nossos, nos quais a expressão da Bcl2 está diminuída em cultura celular neuronal submetida a altos níveis de glicose (Liu *et al.*, 2013; Afrazi *et al.*, 2014). Outro estudo que utilizou ratos diabéticos induzidos por STZ apresentou uma diminuição na expressão da proteína Bcl2 e um aumento na expressão da proteína Bax em córtex e hipocampo (Wu *et al.*, 2012). As diferenças experimentais tais como a utilização de ratos adultos e os diversos tempos de indução de diabetes, podem explicar as divergências dos nossos resultados em relação aos dados da literatura.

Existem estudos que mostram a expressão da proteína caspase 3 sem alterações significativas em cérebro de ratos com hiperglicemia induzida por STZ (Guo *et al.*, 2014) e em cérebro de embriões submetidos a altos níveis de glicose (Kruse *et al.*, 2012), mas devemos assumir como uma limitação do estudo não termos avaliado a expressão da proteína caspase 3. No entanto, baseado nestes estudos que mostram a ausência de alterações na caspase 3 e no fato de que a hiperglicemia neonatal foi capaz de induzir morte neuronal sem a ativação da Bax e com a ativação da Bcl2, nós podemos pensar na possibilidade da morte celular induzida pela hiperglicemia no cérebro dos ratos

diabéticos não ser ativada pela via mitocondrial. Todavia, existem outras formas de ativar a morte celular, por exemplo através da autofagia.

A autofagia tem sido correlacionada com a de morte celular em vários processos patológicos incluindo a diabetes (Singh *et al.*, 2009; Wang e Miao, 2012). Portanto, o papel da autofagia na patogênese da diabetes está sobre recentes investigações, e dentre as explicações para o início do processo de autofagia na diabetes estão: a baixa sinalização de insulina (Barrett *et al.*, 1982); a deficiência do IGF e a expressão do receptor de IGF (Hoffman *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010); a hiperglicemia (Liu *et al.*, 2010); o dano proteico e alterações no metabolismo lipídico (Kim *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009); e finalmente o dano a lipídeos (Hoffman *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2011). Ou seja, no presente estudo os cérebros de ratos diabéticos mostraram baixa sinalização de insulina, hiperglicemia e dano lipídico e a proteínas, estes resultados poderiam estar colaborando para o início do processo de dano celular por autofagia.

Com relação a avaliação dos parâmetros que envolvem sobrevivência e morte celular (expressão proteica e morte celular) podemos supor que o modelo de hiperglicemia neonatal induzido por STZ produziu hiperglicemia e baixa sinalização de insulina, condição metabólica semelhante aos recém-nascidos que possuem diabetes neonatal. Os cérebros de ratos com hiperglicemia neonatal apresentaram um aumento na expressão da proteína p38 e uma diminuição na expressão da p-AKT, ambas as alterações de expressão proteicas rompem com o processo fisiológico de sobrevivência e proliferação celular, além disso, finalmente o cérebro destes ratos diabéticos apresentaram três vezes mais morte celular que o grupo controle. Portanto, nós

supomos um efeito contra regulatório à morte celular neuronal através do aumento da expressão da Bcl2, enquanto que a Bax não mostrou mudanças significativas nos grupos estudados. Estes resultados nos mostram possíveis alvos terapêuticos a serem estudados a fim de tratar pacientes com esta condição patológica.

Finalmente o conjunto destes dados aponta para alterações relevantes tanto em parâmetros de morte celular neuronal quanto em parâmetros de EO no cérebro de ratos com hiperglicemia neonatal, sendo que estas ERO podem ter um importante papel na neurotoxicidade induzida pela hiperglicemia, principalmente com relação a morte celular encontrada neste modelo de hiperglicemia neonatal induzida por STZ. Portanto, o tratamento preventivo dos danos oxidativos pode auxiliar significativamente como alvo terapêutico contra os danos nocivos da hiperglicemia em um período crucial de desenvolvimento do SNC.

7. CONCLUSÕES

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

- a) Identificou-se a existência de morte celular neuronal no cérebro de ratos submetidos ao modelo agudo de hiperglicemia neonatal através da técnica de FluoroJade C, enquanto que no grupo controle não se verificou a marcação fluorescente de morte celular neuronal.
- b) Os cérebros dos ratos hiperglicêmicos apresentaram um aumento da expressão das proteínas p38 e da Bcl2 e uma diminuição expressão da proteína p-AKT quando comparadas aos cérebros dos ratos controles. Já com relação à expressão das proteínas AKT, JNK, p-JNK, GSK3 β e Bax não foi verificada diferença entre os grupos hiperglicêmicos e controles. Portanto, verificou-se que a hiperglicemia neonatal foi capaz de alterar algumas proteínas responsáveis pelas vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e morte celular no cérebro (p38 e p-AKT).
- c) Por outro lado, ratos com hiperglicemia neonatal apresentaram uma diminuição na expressão proteica do Nrf2, enquanto que apresentaram um aumento na expressão proteica da CAT, TRX e HO quando comparados ao grupo controle. Já com relação a SOD e GPx não houve diferença na expressão dessas proteínas quando comparada ao grupo controle. Portanto, a hiperglicemia neonatal pode ter provocado a translocação do Nrf2 para o núcleo, que também pode ter contribuído para o aumento da expressão das enzimas antioxidantes CAT, TRX e HO.

d) Foi verificado que em cérebro de ratos submetidos a um modelo de hiperglicemia neonatal aguda tanto o metabolismo da glutatona quanto o conteúdo de peróxido de hidrogênio não se apresentaram se alterados. Portanto, no cérebro de ratos hiperglicêmicos não se verificou diferença estatística nos parâmetros razão do conteúdo de glutatona oxidada e reduzida, nas atividades das enzimas GST, GR, GCL e na medida de H₂O₂ quando comparados aos ratos do grupo controle.

Finalmente a figura 2 ilustra esquematicamente os principais resultados obtidos no modelo animal de hiperglicemia induzido por STZ. O modelo foi capaz de promover hiperglicemia e baixa sinalização da insulina, condições presentes em pacientes com diabetes neonatal. A hiperglicemia e baixa sinalização da insulina colaboram para o aumento na expressão da proteína p38 e diminuição na expressão da p-AKT, portanto possivelmente direcionando a célula para a morte celular, que foi verificada neste mesmo modelo através da técnica de FluoroJade C. Diante disso, verificou-se um possível efeito contra regulatório através do aumento na expressão da proteína Bcl2, que tem seu efeito antiapoptótico comprovado, da diminuição do Nrf2 no citosol e sua possível translocação pro núcleo, ajudando também no aumento da expressão de enzimas como a CAT, Trx e HO-1. Portanto, a busca por estratégias terapêuticas para a prevenção das alterações encontradas neste trabalho pode auxiliar no tratamento da diabetes neonatal a fim de evitar, principalmente, a morte celular observada no cérebro em um período crucial de desenvolvimento do SNC.

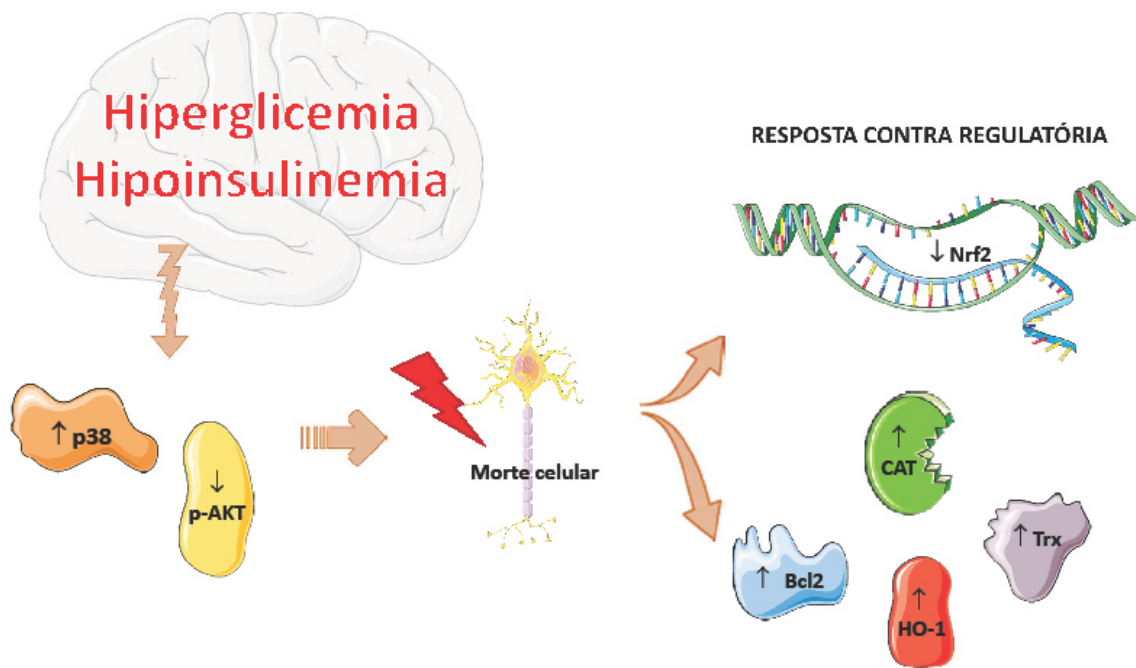


Figura 2: Esquema dos principais resultados obtidos no modelo de hiperglicemia neonatal induzido por estreptozotocina (STZ). (p38) p38 proteína cinase ativada por mitógeno; (p-AKT) proteína cinase B fosforilada; (Nrf2) fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2; (CAT) catalase; (Bcl2) célula-B de linfoma 2; (Trx) tiorredoxina; (HO-1) heme oxigenase 1.

8. REFERÊNCIAS

(NCD-RISC), N. R. F. C. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1513-30, Apr 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27061677> >.

AFRAZI, S. et al. Neurosteroid allopregnanolone attenuates high glucose-induced apoptosis and prevents experimental diabetic neuropathic pain: in vitro and in vivo studies. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 139, p. 98-103, Jan 2014. ISSN 1879-1220. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176764> >.

AGCA, C. A. et al. Taurine ameliorates neuropathy via regulating NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling cascades in diabetic rats. **Food Chem Toxicol**, v. 71, p. 116-21, Sep 2014. ISSN 1873-6351. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24907624> >.

AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J. Neonatal diabetes mellitus. **Endocr Rev**, v. 29, n. 3, p. 265-91, May 2008. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436707> >.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 373-82, 1981. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7329314> >.

ALLEN, D. A.; YAQOUB, M. M.; HARWOOD, S. M. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. **J Nutr Biochem**, v. 16, n. 12, p. 705-13, Dec 2005. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169208> >.

AMINZADEH, A. et al. Investigating the protective effect of lithium against high glucose-induced neurotoxicity in PC12 cells: involvements of ROS, JNK and P38 MAPKs, and apoptotic mitochondria pathway. **Cell Mol Neurobiol**, v. 34, n. 8, p. 1143-50, Nov 2014. ISSN 1573-6830. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25073869> >.

ANILKUMAR, U.; PREHN, J. H. Anti-apoptotic BCL-2 family proteins in acute neural injury. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 281, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25324720> >.

ARAGNO, M. et al. Oxidative derangement in rat synaptosomes induced by hyperglycaemia: restorative effect of dehydroepiandrosterone treatment. **Biochem Pharmacol**, v. 60, n. 3, p. 389-95, Aug 2000. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856434> >.

ARIMA, T. et al. A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. **Hum Mol Genet**, v.

10, n. 14, p. 1475-83, Jul 2001. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448939> >.

ASANO, T. et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation on insulin action and its alteration in diabetic conditions. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 9, p. 1610-6, Sep 2007. ISSN 0918-6158. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17827708> >.

ASHAFAQ, M. et al. Neuromodulatory effects of hesperidin in mitigating oxidative stress in streptozotocin induced diabetes. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 249031, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25050332> >.

ASMAT, U.; ABAD, K.; ISMAIL, K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. **Saudi Pharm J**, v. 24, n. 5, p. 547-553, Sep 2016. ISSN 1319-0164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27752226> >.

ATALAY, M. et al. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 97, n. 2, p. 605-11, Aug 2004. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075301> >.

BAEHRECKE, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 6, p. 505-10, Jun 2005. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15928714> >.

BARBER, A. J. et al. Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3. **J Biol Chem**, v. 276, n. 35, p. 32814-21, Aug 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11443130> >.

BARRETT, E. J. et al. Insulin resistance in diabetic ketoacidosis. **Diabetes**, v. 31, n. 10, p. 923-8, Oct 1982. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6818069> >.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405-12, Apr 1991. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2010041> >.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 1-9, Jan 1999. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892215> >.

BEHL, C.; MOOSMANN, B. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 2, p. 182-91, Jul 2002. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106814> >.

BERGENDI, L. et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci**, v. 65, n. 18-19, p. 1865-74, 1999. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10576429> >.

BIESSELS, G. J. et al. Ageing and diabetes: implications for brain function. **Eur J Pharmacol**, v. 441, n. 1-2, p. 1-14, Apr 2002. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007915> >.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina (B Aires)**, v. 58, n. 4, p. 350-6, 1998. ISSN 0025-7680. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9816695> >.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v. 134, n. 3, p. 707-16, Jul 1973. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4749271> >.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-20, Dec 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742414> >.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-25, Jun 2005. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15919781> >.

BRUNT, K. R. et al. Protection of human vascular smooth muscle cells from H₂O₂-induced apoptosis through functional codependence between HO-1 and AKT. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 9, p. 2027-34, Sep 2006. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840713> >.

BRYAN, J. et al. Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 21, p. 2699-716, 2005. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101450> >.

CAO, J. et al. Physiological significance of heme oxygenase in hypertension. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 5, p. 1025-33, May 2009. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027871> >.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-90, 1985. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3003504> >.

CAVALETTI, G. et al. Emerging role of mitogen-activated protein kinases in peripheral neuropathies. **J Peripher Nerv Syst**, v. 12, n. 3, p. 175-94, Sep 2007. ISSN 1085-9489. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868245> >.

CERIELLO, A.; QUATRARO, A.; GIUGLIANO, D. Diabetes mellitus and hypertension: the possible role of hyperglycaemia through oxidative stress.

Diabetologia, v. 36, n. 3, p. 265-6, Mar 1993. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8462777> >.

CHANG, K. C. et al. Possible superoxide radical-induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 266, n. 2, p. 992-1000, Aug 1993. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8394927> >.

CHEN, J. et al. Naringin inhibits ROS-activated MAPK pathway in high glucose-induced injuries in H9c2 cardiac cells. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 114, n. 4, p. 293-304, Apr 2014. ISSN 1742-7843. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24118820> >.

CLARK, J. B. et al. Development of enzymes of energy metabolism in the neonatal mammalian brain. **Dev Neurosci**, v. 15, n. 3-5, p. 174-80, 1993. ISSN 0378-5866. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7805569> >.

CLARKE, P. G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anat Embryol (Berl)**, v. 181, n. 3, p. 195-213, 1990. ISSN 0340-2061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2186664> >.

CULLINAN, S. B. et al. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 20, p. 7198-209, Oct 2003. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517290> >.

CUMAOĞLU, A. et al. 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**, v. 654, n. 1, p. 80-5, Mar 2011. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21172345> >.

DALLE-DONNE, I. et al. **Biomarkers of oxidative damage in human disease** Clinical Chemistry. 52: 621-623 p. 2006.

DAVEY, G. C. et al. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 5, p. 86, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24936198> >.

DHANASEKARAN, D. N.; REDDY, E. P. JNK signaling in apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6245-51, Oct 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931691> >.

DUARTE, A. I. et al. Insulin neuroprotection against oxidative stress is mediated by Akt and GSK-3beta signaling pathways and changes in protein expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1783, n. 6, p. 994-1002, Jun 2008. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18348871> >.

EDGHILL, E. L. et al. HLA genotyping supports a nonautoimmune etiology in patients diagnosed with diabetes under the age of 6 months. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1895-8, Jun 2006. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731860> >.

ELLERBY, L. M. et al. Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. **J Neurochem**, v. 67, n. 3, p. 1259-67, Sep 1996. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8752134> >.

ELSNER, M. et al. Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. **Diabetologia**, v. 45, n. 11, p. 1542-9, Nov 2002. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12436338> >.

ESPOSTI, M. D. et al. Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. New approaches with reactive oxygen species-sensitive probes. **J Biol Chem**, v. 274, n. 42, p. 29831-7, Oct 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10514462> >.

EVANS, J. L. et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev**, v. 23, n. 5, p. 599-622, Oct 2002. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372842> >.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997 Jan-Mar 1997. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224995> >.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochim Biophys Acta**, v. 1757, n. 9-10, p. 1371-87, 2006 Sep-Oct 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950166> >.

FLANAGAN, S. E. et al. Mutations in ATP-sensitive K⁺ channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1930-7, Jul 2007. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446535> >.

FLECHTNER, I. et al. Neonatal hyperglycaemia and abnormal development of the pancreas. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 22, n. 1, p. 17-40, Feb 2008. ISSN 1521-690X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18279778> >.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem**, v. 44, p. 147-59, 1975. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1094908> >.

FROSALI, S. et al. Glutathione recycling and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of term and preterm newborns at birth. **Biol Neonate**, v. 85, n. 3, p. 188-94, 2004. ISSN 0006-3126. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707431> >.

FÖSEL, S. Transient and permanent neonatal diabetes. **Eur J Pediatr**, v. 154, n. 12, p. 944-8, Dec 1995. ISSN 0340-6199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8801100> >.

GACH, A. et al. Islet-specific antibody seroconversion in patients with long duration of permanent neonatal diabetes caused by mutations in the KCNJ11 gene. **Diabetes Care**, v. 30, n. 8, p. 2080-2, Aug 2007. ISSN 1935-5548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475937> >.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 7, p. 1237-43, Jul 2007. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17431418> >.

GARRIS, D. R. Diabetes-associated, ventromedial hypothalamic neuronal degeneration in the Chinese hamster. **Neurosci Lett**, v. 44, n. 3, p. 287-91, Feb 1984. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6728298> >.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res**, v. 107, n. 9, p. 1058-70, Oct 2010. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030723> >.

GLASER, B. et al. Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. **N Engl J Med**, v. 338, n. 4, p. 226-30, Jan 1998. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435328> >.

GLOYN, A. L. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. **Hum Mutat**, v. 22, n. 5, p. 353-62, Nov 2003. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517946> >.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci**, v. 32, n. 1, p. 37-43, Jan 2007. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17141506> >.

GORMAN, A. M. et al. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. **J Neurol Sci**, v. 139 Suppl, p. 45-52, Aug 1996. ISSN 0022-510X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8899658> >.

GREELEY, S. A. et al. Update in neonatal diabetes. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 17, n. 1, p. 13-9, Feb 2010. ISSN 1752-2978. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19952737> >.

GREENE, D. A. et al. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. **Eur J Pharmacol**, v. 375, n. 1-3, p. 217-23, Jun 1999. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10443578> >.

GRULICH-HENN, J. et al. Entities and frequency of neonatal diabetes: data from the diabetes documentation and quality management system (DPV). **Diabet Med**, v. 27, n. 6, p. 709-12, Jun 2010. ISSN 1464-5491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20546293> >.

GUO, Y. J. et al. Vulnerability for apoptosis in the hippocampal dentate gyrus of STZ-induced diabetic rats with cognitive impairment. **J Endocrinol Invest**, v. 37, n. 1, p. 87-96, Jan 2014. ISSN 1720-8386. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24464455> >.

GUPTE, S. A. et al. Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 1, p. H13-21, Jan 2005. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15345489> >.

GUPTE, S. A. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart. **J Mol Cell Cardiol**, v. 41, n. 2, p. 340-9, Aug 2006. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828794> >.

GURGEL, L. C.; MOISÉS, R. S. [Neonatal diabetes mellitus]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 2, p. 181-7, Mar 2008. ISSN 1677-9487. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18438528> >.

HABEB, A. M. et al. Incidence, genetics, and clinical phenotype of permanent neonatal diabetes mellitus in northwest Saudi Arabia. **Pediatr Diabetes**, v. 13, n. 6, p. 499-505, Sep 2012. ISSN 1399-5448. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22060631> >.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, n. 22, p. 7130-9, Nov 1974. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4436300> >.

HALLIWELL, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem Soc Trans**, v. 24, n. 4, p. 1023-7, Nov 1996. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968505> >.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001. ISSN 1170-229X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11599635> >.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr Rev**, v. 70, n. 5, p. 257-65, May 2012. ISSN 1753-4887. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22537212> >.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radical Biology and Medicine**. England: Oxford, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2172697> >.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. 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**, v. 142, n. 2, p. 231-55, May 2004. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155533> >.

HANADA, M.; FENG, J.; HEMMING, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. **Biochim Biophys Acta**, v. 1697, n. 1-2, p. 3-16, Mar 2004. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023346> >.

HANSCHMANN, E. M. et al. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 13, p. 1539-605, Nov 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23397885> >.

HE, X. et al. Nrf2 is critical in defense against high glucose-induced oxidative damage in cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 46, n. 1, p. 47-58, Jan 2009. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007787> >.

HEIDENREICH, K. A.; KUMMER, J. L. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons. **J Biol Chem**, v. 271, n. 17, p. 9891-4, Apr 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626622> >.

HELLER, B. et al. Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. **Biol Chem Hoppe Seyler**, v. 375, n. 9, p. 597-602, Sep 1994. ISSN 0177-3593. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7840901> >.

HO, F. M. et al. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. **Circulation**, v. 101, n. 22, p. 2618-24, Jun 2000. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840014> >.

HOCKENBERY, D. M. et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 241-51, Oct 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7503812> >.

HOFFMAN, W. H. et al. Insulin and IGF-1 receptors, nitrotyrosin and cerebral neuronal deficits in two young patients with diabetic ketoacidosis and fatal brain edema. **Brain Res**, v. 1343, p. 168-77, Jul 2010. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20420811> >.

HOFFMAN, W. H. et al. Oxidative damage is present in the fatal brain edema of diabetic ketoacidosis. **Brain Res**, v. 1369, p. 194-202, Jan 2011. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040714> >.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from escherichia coli B. **Eur J Biochem**, v. 6, n. 4, p. 475-84, Dec 1968. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4883076> >.

HOMMES, D. W.; PEPPELENBOSCH, M. P.; VAN DEVENTER, S. J. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 144-51, Jan 2003. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477778> >.

HUANG, H. C.; NGUYEN, T.; PICKETT, C. B. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 23, p. 12475-80, Nov 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035812> >.

IAFUSCO, D. et al. Minimal incidence of neonatal/infancy onset diabetes in Italy is 1:90,000 live births. **Acta Diabetol**, v. 49, n. 5, p. 405-8, Oct 2012. ISSN 1432-5233. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953423> >.

INAGAKI, N. et al. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. **Science**, v. 270, n. 5239, p. 1166-70, Nov 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7502040> >.

ITOH, K. et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes Dev**, v. 13, n. 1, p. 76-86, Jan 1999. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887101> >.

JABEEN, R.; SALEEMUDDIN, M. Polyclonal antibodies inhibit the glycation-induced inactivation of bovine Cu,Zn-superoxide dismutase. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 43, n. Pt 1, p. 49-53, Jan 2006. ISSN 0885-4513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16086668> >.

JAISWAL, A. K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 10, p. 1199-207, May 2004. ISSN

0891-5849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15110384> >.

JAKOBSEN, J. et al. Quantitative changes of cerebral neocortical structure in insulin-treated long-term streptozocin-induced diabetes in rats. **Diabetes**, v. 36, n. 5, p. 597-601, May 1987. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3552791> >.

JOLIVALT, C. G. et al. Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. **J Neurosci Res**, v. 86, n. 15, p. 3265-74, Nov 2008. ISSN 1097-4547. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18627032> >.

JOPE, R. S.; JOHNSON, G. V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 2, p. 95-102, Feb 2004. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102436> >.

JOSHI, S. R.; PARIKH, R. M.; DAS, A. K. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. **J Assoc Physicians India**, v. 55 Suppl, p. 19-25, Jul 2007. ISSN 0004-5772. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17927007> >.

JURETIC, N. et al. ERK 1,2 and p38 pathways are involved in the proliferative stimuli mediated by urokinase in osteoblastic SaOS-2 cell line. **J Cell Biochem**, v. 83, n. 1, p. 92-8, 2001 Jun 26-Jul 25 2001. ISSN 0730-2312. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500957> >.

KABAY, S. C. et al. Protective effects of vitamin E on central nervous system in streptozotocin-induced diabetic rats. **Clin Invest Med**, v. 32, n. 5, p. E314-21, Oct 2009. ISSN 1488-2353. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796571> >.

KANE, D. J. et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, v. 262, n. 5137, p. 1274-7, Nov 1993. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8235659> >.

KARUNANAYAKE, E. H.; HEARSE, D. J.; MELLOWS, G. Streptozotocin: its excretion and metabolism in the rat. **Diabetologia**, v. 12, n. 5, p. 483-8, Oct 1976. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/135705> >.

KERMER, P. et al. Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 In vivo. **J Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 2-8, Jan 2000. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10632601> >.

KIM, D. S. et al. Effects of triglyceride on ER stress and insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 363, n. 1, p. 140-5, Nov 2007. ISSN

0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868644> >.

KIM, M. J. et al. Depletion of end-binding protein 1 (EB1) promotes apoptosis of human non-small-cell lung cancer cells via reactive oxygen species and Bax-mediated mitochondrial dysfunction. **Cancer Lett**, v. 339, n. 1, p. 15-24, Oct 2013. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23900080> >.

KIM, Y. C. et al. Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. **J Biol Chem**, v. 276, n. 21, p. 18399-406, May 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11279008> >.

KLEIN, D.; KERN, R. M.; SOKOL, R. Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochem Mol Biol Int**, v. 36, n. 1, p. 59-66, May 1995. ISSN 1039-9712. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545052> >.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, Jan 2009. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846107> >.

KRUSE, M. S. et al. Down regulation of the proliferation and apoptotic pathways in the embryonic brain of diabetic rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 32, n. 6, p. 1031-7, Aug 2012. ISSN 1573-6830. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410672> >.

KUMAR, J. S.; MENON, V. P. Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. **Metabolism**, v. 42, n. 11, p. 1435-9, Nov 1993. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8231839> >.

KUMMER, J. L.; RAO, P. K.; HEIDENREICH, K. A. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 272, n. 33, p. 20490-4, Aug 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9252360> >.

KWEON, M. H. et al. The novel antioxidant 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid induces Nrf2-dependent phase II detoxifying genes and alters intracellular glutathione redox. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 8, p. 1349-61, Apr 2006. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631525> >.

KYOSSEVA, S. V. Mitogen-activated protein kinase signaling. **Int Rev Neurobiol**, v. 59, p. 201-20, 2004. ISSN 0074-7742. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15006489> >.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. **Physiol Rev**, v. 92, n. 2, p. 689-737, Apr 2012. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22535895> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LAPPALAINEN, Z. et al. Diabetes impairs exercise training-associated thioredoxin response and glutathione status in rat brain. **J Appl Physiol** (1985), v. 106, n. 2, p. 461-7, Feb 2009. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074570> >.

LELKES, E.; UNSWORTH, B. R.; LELKES, P. I. Reactive oxygen species, apoptosis and altered NGF-induced signaling in PC12 pheochromocytoma cells cultured in elevated glucose: an in vitro cellular model for diabetic neuropathy. **Neurotox Res**, v. 3, n. 2, p. 189-203, Apr 2001. ISSN 1029-8428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715473> >.

LI, W.; KONG, A. N. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. **Mol Carcinog**, v. 48, n. 2, p. 91-104, Feb 2009. ISSN 1098-2744. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18618599> >.

LI, X. et al. Enhanced cytotoxicity and activation of ROS-dependent c-Jun NH2-terminal kinase and caspase-3 by low doses of tetrandrine-loaded nanoparticles in Lovo cells—a possible Trojan strategy against cancer. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 75, n. 3, p. 334-40, Aug 2010. ISSN 1873-3441. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20438840> >.

LIPINSKI, B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. **J Diabetes Complications**, v. 15, n. 4, p. 203-10, 2001 Jul-Aug 2001. ISSN 1056-8727. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457673> >.

LIU, D. et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rb1 on high glucose-induced neurotoxicity in primary cultured rat hippocampal neurons. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79399, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24223941> >.

LIU, M. et al. The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. **J Clin Invest**, v. 120, n. 6, p. 1914-24, Jun 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484814> >.

LIU, Y. W. et al. Mangiferin Upregulates Glyoxalase 1 Through Activation of Nrf2/ARE Signaling in Central Neurons Cultured with High Glucose. **Mol Neurobiol**, Jun 2016. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27318675> >.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143-53, May 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995213> >.

MA, Q.; HE, X. Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2. **Pharmacol Rev**, v. 64, n. 4, p. 1055-81, Oct 2012. ISSN 1521-0081. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966037> >.

MARTINS, R. N.; STOKES, G. B.; MASTERS, C. L. Regulation of liver and brain hexose monophosphate dehydrogenases by insulin and dietary intake in the female rat. **Mol Cell Biochem**, v. 70, n. 2, p. 169-75, May 1986. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3523210> >.

MATSUNAMI, T. et al. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 3, n. 2, p. 177-88, Nov 2009. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20126586> >.

MAXWELL, S. R. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, v. 49, n. 3, p. 345-61, Mar 1995. ISSN 0012-6667. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7774511> >.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-55, Nov 1969. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100> >.

MCDANNOLD, N.; ZHANG, Y.; VYKHODTSEVA, N. Blood-brain barrier disruption and vascular damage induced by ultrasound bursts combined with microbubbles can be influenced by choice of anesthesia protocol. **Ultrasound Med Biol**, v. 37, n. 8, p. 1259-70, Aug 2011. ISSN 1879-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21645965> >.

MCLENNAN, S. V. et al. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 3, p. 344-8, Mar 1991. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1671844> >.

MEHLEN, P.; BREDESEN, D. E. Dependence receptors: from basic research to drug development. **Sci Signal**, v. 4, n. 157, p. mr2, Jan 2011. ISSN 1937-9145. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266712> >.

MERCURI, F.; QUAGLIARO, L.; CERIELLO, A. Oxidative stress evaluation in diabetes. **Diabetes Technol Ther**, v. 2, n. 4, p. 589-600, 2000. ISSN 1520-9156. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469623> >.

METZ, C. et al. Neonatal diabetes mellitus: chromosomal analysis in transient and permanent cases. **J Pediatr**, v. 141, n. 4, p. 483-9, Oct 2002. ISSN 0022-3476. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12378186> >.

MIYASHITA, K. et al. Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3beta inhibition against human glioblastoma. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 3, p. 887-97, Feb 2009. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188159> >.

MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. **Trends Mol Med**, v. 10, n. 11, p. 549-57, Nov 2004. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15519281> >.

MULLER, C. et al. HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 5, p. 817-28, May 2011. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21113143> >.

NAKAMURA, H.; NAKAMURA, K.; YODOI, J. Redox regulation of cellular activation. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 351-69, 1997. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143692> >.

NAKHAEE, A. et al. Sodium tungstate attenuate oxidative stress in brain tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biol Trace Elem Res**, v. 136, n. 2, p. 221-31, Aug 2010. ISSN 1559-0720. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834650> >.

NEGI, G.; KUMAR, A.; SHARMA, S. S. Nrf2 and NF-κB modulation by sulforaphane counteracts multiple manifestations of diabetic neuropathy in rats and high glucose-induced changes. **Curr Neurovasc Res**, v. 8, n. 4, p. 294-304, Nov 2011. ISSN 1875-5739. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22023613> >.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 284, n. 20, p. 13291-5, May 2009. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182219> >.

NICOTERA, P. et al. Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress. **Adv Neurol**, v. 72, p. 95-101, 1997. ISSN 0091-3952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8993688> >.

NJØLSTAD, P. R. et al. Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. **N Engl J Med**, v. 344, n. 21, p. 1588-92, May 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11372010> >.

OLOKOBA, A. B.; OBATERU, O. A.; OLOKOBA, L. B. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. **Oman Med J**, v. 27, n. 4, p. 269-73, Jul 2012. ISSN 2070-5204. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071876> >.

OPARA, E. C. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. **J R Soc Promot Health**, v. 122, n. 1, p. 28-34, Mar 2002. ISSN 1466-4240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11989140> >.

PARK, H. J. et al. Selective GSK-3beta inhibitors attenuate the cisplatin-induced cytotoxicity of auditory cells. **Hear Res**, v. 257, n. 1-2, p. 53-62, Nov 2009. ISSN 1878-5891. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666099> >.

PATEL, S.; DOBLE, B.; WOODGETT, J. R. Glycogen synthase kinase-3 in insulin and Wnt signalling: a double-edged sword? **Biochem Soc Trans**, v. 32, n. Pt 5, p. 803-8, Nov 2004. ISSN 0300-5127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494020> >.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J Immunol Methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-70, 1980. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6778929> >.

PIEPER, A. A. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 6, p. 3059-64, Mar 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077636> >.

POLAK, M.; CAVÉ, H. Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. **Orphanet J Rare Dis**, v. 2, p. 12, Mar 2007. ISSN 1750-1172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349054> >.

POLAK, M.; SHIELD, J. Neonatal and very-early-onset diabetes mellitus. **Semin Neonatol**, v. 9, n. 1, p. 59-65, Feb 2004. ISSN 1084-2756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15013476> >.

POLITI, L. E. et al. Insulin-like growth factor-I is a potential trophic factor for amacrine cells. **J Neurochem**, v. 76, n. 4, p. 1199-211, Feb 2001. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181839> >.

PORTHA, B. et al. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. **Diabetes**, v. 23, n. 11, p. 889-95, Nov 1974. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4279194> >.

PROHASKA, J. R. et al. Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 74, n. 1, p. 64-71, Jan 1977. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13794> >.

QU, Z. et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes on tau phosphorylation in the rat brain. **Brain Res**, v. 1383, p. 300-6, Apr 2011. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21281610> >.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 50, n. 5, p. 567-75, Mar 2011. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163346> >.

RAMAKRISHNAN, R. et al. A short-term diabetes induced changes of catecholamines and p38-MAPK in discrete areas of rat brain. **Life Sci**, v. 77, n. 15, p. 1825-35, Aug 2005. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009379> >.

RAMSAY, E. E.; DILDA, P. J. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 181, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25157234> >.

RAZA, H.; JOHN, A. Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 20, n. 1, p. 72-8, 2004 Jan-Feb 2004. ISSN 1520-7552. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14737748> >.

REAGAN, L. P.; MAGARIÑOS, A. M.; MCEWEN, B. S. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. **Ann N Y Acad Sci**, v. 893, p. 126-37, 1999. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672234> >.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-63, 1994. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015470> >.

ROSA, A. P. et al. Neonatal hyperglycemia induces oxidative stress in the rat brain: the role of pentose phosphate pathway enzymes and NADPH oxidase. **Mol Cell Biochem**, v. 403, n. 1-2, p. 159-67, May 2015. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25682169> >.

RYTER, S. W.; ALAM, J.; CHOI, A. M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. **Physiol Rev**, v. 86, n. 2, p. 583-650, Apr 2006. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16601269> >.

SADI, G. et al. Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 28, n. 3, p. 228-35, Mar 2012. ISSN 1520-7560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22057777> >.

SAGEN, J. V. et al. Permanent neonatal diabetes due to mutations in KCNJ11 encoding Kir6.2: patient characteristics and initial response to sulfonylurea therapy. **Diabetes**, v. 53, n. 10, p. 2713-8, Oct 2004. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448106> >.

SAHIN, K. et al. The effects of chromium picolinate and chromium histidinate administration on NF- κ B and Nrf2/HO-1 pathway in the brain of diabetic rats.

Biol Trace Elem Res, v. 150, n. 1-3, p. 291-6, Dec 2012. ISSN 1559-0720. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790776> >.

SASTRE, J.; PALLARDÓ, F. V.; VIÑA, J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. **IUBMB Life**, v. 49, n. 5, p. 427-35, May 2000. ISSN 1521-6543. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10902575> >.

SCHEID, M. P.; WOODGETT, J. R. PKB/AKT: functional insights from genetic models. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 10, p. 760-8, Oct 2001. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11584303> >.

SCHEIN, P. S.; LOFTUS, S. Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. **Cancer Res**, v. 28, n. 8, p. 1501-6, Aug 1968. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4299824> >.

SCHMEICHEL, A. M.; SCHMELZER, J. D.; LOW, P. A. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 165-71, Jan 2003. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502508> >.

SCHMUED, L. C. et al. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Res**, v. 1035, n. 1, p. 24-31, Feb 2005. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713273> >.

SCHULZE, P. C. et al. Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. **J Biol Chem**, v. 279, n. 29, p. 30369-74, Jul 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15128745> >.

SCHWITZGEBEL, V. M. et al. Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 9, p. 4398-406, Sep 2003. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12970316> >.

SCOTT, J. A.; KING, G. L. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1031, p. 204-13, Dec 2004. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753146> >.

SERPILLON, S. et al. 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**, v. 297, n. 1, p. H153-62, Jul 2009. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429815> >.

SHIELD, J. P. et al. Aetiopathology and genetic basis of neonatal diabetes. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 76, n. 1, p. F39-42, Jan 1997. ISSN 1359-2998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9059185> >.

SILVA, M. et al. [Effect of streptozotocin on the glycemic and lipid profiles and oxidative stress in hamsters]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 55, n. 1, p. 46-53, Feb 2011. ISSN 1677-9487. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468519> >.

SINGH, R. et al. Autophagy regulates lipid metabolism. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1131-5, Apr 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339967> >.

SIU, F. K.; LO, S. C.; LEUNG, M. C. Electroacupuncture reduces the extent of lipid peroxidation by increasing superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in ischemic-reperfused rat brains. **Neurosci Lett**, v. 354, n. 2, p. 158-62, Jan 2004. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698462> >.

SOETIKNO, V. et al. Curcumin prevents diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats: possible involvement of PKC-MAPK signaling pathway. **Eur J Pharm Sci**, v. 47, n. 3, p. 604-14, Oct 2012. ISSN 1879-0720. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22564708> >.

STROEV, S. A. et al. Preconditioning enhances the expression of mitochondrial antioxidant thioredoxin-2 in the forebrain of rats exposed to severe hypobaric hypoxia. **J Neurosci Res**, v. 78, n. 4, p. 563-9, Nov 2004. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15468176> >.

STØY, J. et al. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 38, p. 15040-4, Sep 2007. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855560> >.

SUZUKI, S. et al. Molecular basis of neonatal diabetes in Japanese patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 10, p. 3979-85, Oct 2007. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17635943> >.

SYAPIN, P. J. Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders. **Br J Pharmacol**, v. 155, n. 5, p. 623-40, Nov 2008. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794892> >.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, n. 6, p. 537-46, 2001. ISSN 0862-8408. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11829314> >.

TAKADA, J. et al. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. **Metabolism**, v. 56, n. 7, p. 977-84, Jul 2007. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570261> >.

TAKAGI, T. et al. Clinical and functional characterization of the Pro1198Leu ABCC8 gene mutation associated with permanent neonatal diabetes mellitus. **J Diabetes Investig**, v. 4, n. 3, p. 269-73, May 2013. ISSN 2040-1116. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24843665> >.

TAKAHASHI, S.; IZAWA, Y.; SUZUKI, N. Astroglial pentose phosphate pathway rates in response to high-glucose environments. **ASN Neuro**, v. 4, n. 2, 2012. ISSN 1759-0914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300409> >.

TEMPLE, I. K. et al. Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localised to chromosome 6q22-q23. **Hum Mol Genet**, v. 5, n. 8, p. 1117-21, Aug 1996. ISSN 0964-6906. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8842729> >.

THOMAS, J.; GARG, M. L.; SMITH, D. W. Altered expression of histone and synaptic plasticity associated genes in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice. **Metab Brain Dis**, v. 28, n. 4, p. 613-8, Dec 2013. ISSN 1573-7365. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23832395> >.

TRIPATHI, U. N.; CHANDRA, D. Anti-hyperglycemic and anti-oxidative effect of aqueous extract of Momordica charantia pulp and Trigonella foenum graecum seed in alloxan-induced diabetic rats. **Indian J Biochem Biophys**, v. 47, n. 4, p. 227-33, Aug 2010. ISSN 0301-1208. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21174950> >.

TSAI, K. J. et al. Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphate-dehydrogenase-deficient granulocytes. **FEBS Lett**, v. 436, n. 3, p. 411-4, Oct 1998. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801159> >.

UCHIGATA, Y. et al. 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**, v. 257, n. 11, p. 6084-8, Jun 1982. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6281256> >.

ULUSU, N. N. et al. 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**, v. 28, n. 6, p. 815-23, Jun 2003. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12718433> >.

VALAMPARAMPIL, J. J. et al. Clinical profile and etiology of diabetes mellitus with onset at less than 6 months of age. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 25, n. 12, p. 656-62, Dec 2009. ISSN 1607-551X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951851> >.

VAXILLAIRE, M. et al. New ABCC8 mutations in relapsing neonatal diabetes and clinical features. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1737-41, Jun 2007. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389331> >.

VENKATACHALAM, K. et al. Resveratrol inhibits high glucose-induced PI3K/Akt/ERK-dependent interleukin-17 expression in primary mouse cardiac fibroblasts. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 294, n. 5, p. H2078-87, May 2008. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18310510> >.

VENUGOPAL, R.; JAISWAL, A. K. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 25, p. 14960-5, Dec 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8962164> >.

VINCENT, A. M. et al. Sensory neurons and schwann cells respond to oxidative stress by increasing antioxidant defense mechanisms. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 3, p. 425-38, Mar 2009. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19072199> >.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1635-6, May 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040174> >.

WANG, P.; MIAO, C. Y. Autophagy in the disorders of central nervous system: vital and/or fatal? **CNS Neurosci Ther**, v. 18, n. 12, p. 955-6, Dec 2012. ISSN 1755-5949. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23191986> >.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-33, 1981. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7329310> >.

WHITE, C. C. et al. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. **Anal Biochem**, v. 318, n. 2, p. 175-80, Jul 2003. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814619> >.

WOOD, E. J. Marks' basic medical biochemistry: A clinical approach (second edition). **Biochem Mol Biol Educ**, v. 34, n. 5, p. 395, Sep 2006. ISSN 1470-8175. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21638727> >.

WU, K. J. et al. Guizhi-Fuling-Wan, a Traditional Chinese Herbal Medicine, Ameliorates Memory Deficits and Neuronal Apoptosis in the Streptozotocin-Induced Hyperglycemic Rodents via the Decrease of Bax/Bcl2 Ratio and Caspase-3 Expression. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 656150, 2012. ISSN 1741-4288. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23304209> >.

XI, X. et al. Chronically elevated glucose-induced apoptosis is mediated by inactivation of Akt in cultured Müller cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 326, n. 3, p. 548-53, Jan 2005. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596134> >.

XU, C. et al. Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 8, p. 1918-26, Aug 2006. ISSN 1535-7163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16928811> >.

YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. **Nature**, v. 294, n. 5838, p. 284-6, Nov 1981. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6272129> >.

YANG, C. M.; LIN, C. C.; HSIEH, H. L. High-Glucose-Derived Oxidative Stress-Dependent Heme Oxygenase-1 Expression from Astrocytes Contributes to the Neuronal Apoptosis. **Mol Neurobiol**, Jan 2016. ISSN 1559-1182. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26742524> >.

YANG, R. H. et al. Effect of docosahexaenoic acid on hippocampal neurons in high-glucose condition: involvement of PI3K/AKT/nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways. **Neuroscience**, v. 274, p. 218-28, Aug 2014. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24881575> >.

YE, L.; WANG, F.; YANG, R. H. Diabetes impairs learning performance and affects the mitochondrial function of hippocampal pyramidal neurons. **Brain Res**, v. 1411, p. 57-64, Sep 2011. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798520> >.

ZDYCHOVÁ, J.; KOMERS, R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. **Physiol Res**, v. 54, n. 1, p. 1-16, 2005. ISSN 0862-8408. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15717836> >.

ZHANG, T.; JIA, W.; SUN, X. 3-n-Butylphthalide (NBP) reduces apoptosis and enhances vascular endothelial growth factor (VEGF) up-regulation in diabetic rats. **Neurol Res**, v. 32, n. 4, p. 390-6, May 2010. ISSN 1743-1328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483006> >.

ZHAO, S. et al. Neurotoxic effects of iron overload under high glucose concentration. **Neural Regen Res**, v. 8, n. 36, p. 3423-33, Dec 2013. ISSN 1673-5374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25206665> >.