



ALINE PERTILE REMOR

**HIPERGLICEMIA E A PREDISPOSIÇÃO AO  
DESENVOLVIMENTO DAS DOENÇAS  
NEURODEGENERATIVAS: PAPEL DA READAPTAÇÃO  
METABÓLICA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências

Orientadora: Alexandra Susana Latini  
Coorientadora: Sílvia Olivera Bravo

FLORIANÓPOLIS, DEZEMBRO DE 2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Remor, Aline Pertile  
Hiperglicemia e a predisposição ao desenvolvimento das  
doenças neurodegenerativas: papel da readaptação metabólica /  
Aline Pertile Remor ; orientadora, Alexandra Susana Latini  
; coorientadora, Sílvia Olivera Bravo. - Florianópolis, SC,  
2014.  
159 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

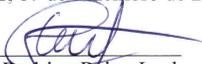
1. Neurociências. 2. Hiperglicemia. 3. Doenças  
neurodegenerativas. 4. Metabolismo energético. 5.  
Epigenética. I. Latini, Alexandra Susana. II. Bravo,  
Sílvia Olivera. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV.  
Título.

ALINE PERTILE REMÓR

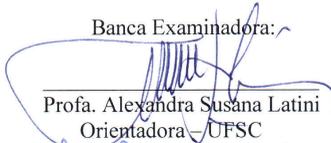
**“HIPERGLICÊMIA CRÔNICA E A PREDISPOSIÇÃO  
AO DESENVOLVIMENTO DAS DOENÇAS  
NEURODEGENERATIVAS: PAPEL DA READAPTAÇÃO  
METABÓLICA”.**

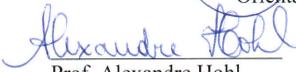
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de  
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e  
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina

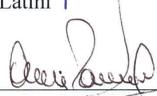
Florianópolis, 17 de dezembro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Rodrigo Bairy Leal  
Coordenador do Curso

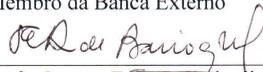
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Alexandra Susana Latini  
Orientadora - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alexandre Hohl  
Membro - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Ana Lúcia de Paul  
Membro da Banca Externo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Nelson H. Gabilan  
Membro - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Susana E.R. de Barroglho  
Membro da Banca Externo

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Viviane Glaser  
Membro - UFSC



*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,  
não seremos capazes de resolver os problemas causados  
pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.*

Albert Einstein



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais, Elder e Eunice, pelo exemplo de pessoas que são para mim, pelos ensinamentos, pela confiança, pela força, pelo amor incondicional e pela oportunidade que sempre me ofereceram de seguir com meus objetivos;

Aos meus irmãos, Thiago e Marina, pelo carinho e amizade da vida inteira;

À minha orientadora, Prof. Alexandra Latini, por me receber em seu laboratório, por ser um exemplo de profissionalismo e dedicação e pela amizade. Com certeza será sempre um dos meus exemplos a seguir nesta carreira e na área de pesquisa;

À minha coorientadora, Prof. Silvia Olivera Bravo pela dedicação e os ensinamentos oferecidos quando estive em seu laboratório em Montevidéu, Uruguai;

Ao Prof. Clifford J. Woolf e todo o seu grupo pela oportunidade e pelos momentos inesquecíveis vividos durante o meu doutorado sanduíche no *Boston Childrens Hospital e Harvard Medical School*, Boston, Estados Unidos;

Aos meus colegas de laboratório que se tornaram grandes amigos, Aderbal, Anelise, Débora, Fritz, Karina, Lucila, Paulo, Priscila, Renata, Roberta e Viviane;

Aos meus colegas e amigos da UFSC, Alessandra, Andreza, Bibiana, Dênis, Daiane, Dirleise, Filipe, Gianni, Jade, Danúbia, Marcos, Mariana e Vanessa;

E a todos os amigos que de longe ou de perto, antigos ou novos, direta ou indiretamente contribuíram nesta fase da minha vida... Obrigada!

Aos técnicos do LAMEB, pelo auxílio indispensável;

Aos professores da pós-graduação em Neurociências, e ao secretário Nivaldo;

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.



## RESUMO

A hiperglicemia crônica característica do Diabetes Mellitus (DM) predispõe ao desenvolvimento de vasculopatias, tanto em tecidos periféricos - cuja fisiopatologia encontra-se parcialmente elucidada - quanto no sistema nervoso central (SNC) - onde ainda esta é menos entendida. Neste contexto, estudos vem sugerindo que a hiperglicemia persistente predispõe e favorece à progressão de processos neurodegenerativos. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a predisposição ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e/ou neurológicas, em particular a Doença de Parkinson (DP), durante o estado hiperglicêmico crônico. A condição experimental de hiperglicemia crônica foi induzida pela administração de uma única dose de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg; intraperitonealmente) em ratos Wistar adultos onde foram investigados parâmetros de bioenergética, estresse oxidativo, neurotoxicidade e comportamentais após 10 e/ou 60 dias de tratamento (Grupo STZ). Com o intuito de normalizar a glicemia, alguns animais receberam insulina subcutaneamente (1,5 UI de Novolin<sup>®</sup>N humana; Novo Nordisk Laboratories; duas vezes ao dia; Grupo STZ+INS). Foi observado que a hiperglicemia crônica causou uma desregulação bioenergética tanto central quanto periférica, caracterizada pela inibição da atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória e aumento na atividade da creatinaquinase (CK), total e mitocondrial, em animais que permaneceram hiperglicêmicos por 60 dias. Além disso, esta condição metabólica provocou estresse oxidativo observado pela diminuição significativa nas concentrações de grupamentos tiólicos, aumento na peroxidação lipídica no plasma e ainda diminuição da molécula antioxidante BH4 no líquido destes animais. A persistente hiperglicemia também induziu apoptose e o acúmulo de proteínas oxidadas (AGEs) pelo aldeído reativo metilglioxal (MG) - composto formado durante condições de hiperglicemia, sendo considerado o principal formador de AGEs - em córtex cerebral de animais hiperglicêmicos. Além disso, estas alterações metabólicas ocorreram juntamente com alterações epigenéticas caracterizadas por mudanças nos padrões de metilação do DNA e concomitantemente com déficit cognitivo, evidenciado principalmente por prejuízos na consolidação da memória de curto e longo prazo. Ainda, a normalização das concentrações de glicose através da administração de insulina preveniu as alterações metabólicas, epigenéticas e comportamentais observadas nos animais hiperglicêmicos. No que se refere ao efeito específico do MG, foi

observado um aumento significativo no consumo de oxigênio no estado IV de respiração mitocondrial e um marcado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) extramitocondrial em células precursoras de hipocampo (H19-7), indicando que este composto pode estar relacionado com as alterações encontradas no modelo animal. Por outro lado, as adaptações no metabolismo energético observadas no modelo animal de hiperglicemia, também foram observadas em amostras de indivíduos afetados por DM do tipo 1 e por DP. Ainda, nestes pacientes também foi observado um marcado aumento nas concentrações de neopterin plasmática, parâmetro que indica de forma sensível a ativação do sistema imunológico. Por fim, este estudo também focou no efeito da modulação da via metabólica da BH4 como ferramenta para reduzir a hipersensibilidade à nocicepção, em um modelo animal de dor neuropática, onde foi observado que a inibição da enzima que participa da síntese da BH4, a sepiapterina redutase (SR), induz analgesia. Em conclusão, pode-se propor que os oxidantes MG e/ou AGEs formados durante a hiperglicemia crônica decorrente do DM estariam envolvidos nas alterações bioquímicas e moleculares observadas nas células do SNC e predispondo ao comprometimento cognitivo observado neste estudo, proporcionando um cenário propício para a instalação e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e/ou neurológicas, em particular a DP, e/ou predispor a nocicepção.

**Palavras-chave:** hiperglicemia, metilglicoxal, doenças neurodegenerativas, metabolismo energético, creatinaquinase, disfunção mitocondrial, epigenética.

## ABSTRACT

Chronic hyperglycemia characteristic of Diabetes Mellitus (DM) predisposes to the development of vasculopathies, both in peripheral tissues, where the pathophysiology is partially elucidated, and also in the central nervous system (CNS), where it is even less understood. In this context, studies have suggested that the persistent hyperglycemia predisposes and promotes the progression of neurodegenerative processes. This study aimed to evaluate the predisposition to the development of neurodegenerative and/or neurological diseases, in particular Parkinson's disease (PD) during the chronic hyperglycemic state characteristic of DM. Chronic hyperglycemia was induced by the administration of a single dose of streptozotocin (STZ; 55 mg/kg, intraperitoneally) in adult rats, and parameters of bioenergetics, oxidative stress, neurotoxicity, epigenetics and behavior were investigated after 10 and/or 60 days of persistent hyperglycemia (STZ group). Some animals received insulin subcutaneously (1.5 IU of human Novolin<sup>®</sup> N, Novo Nordisk Laboratories; twice daily, STZ + INS Group) in order to normalize the glycemia. It was observed that chronic hyperglycemia (STZ Group) caused a marked bioenergetic impairment in the central nervous system (CNS), as well as in peripheral tissues, characterized by inhibition of the activities of complexes I, II and IV of the respiratory chain and by an increase in the activity of total and mitochondrial creatine kinase (CK). Furthermore, this metabolic condition elicited oxidative stress observed by a significant decrease in the plasma thiol groups levels, an increase in plasma lipid peroxidation and also a reduction of BH4 levels in cerebrospinal fluid. Persistent hyperglycemia also induced apoptosis and the accumulation of oxidized proteins (AGEs) by the reactive aldehyde methylglyoxal (MG) - compound formed during hyperglycemic conditions and the main generator of AGEs - in cerebral cortex of hyperglycemic animals. In addition, these metabolic changes occurred in parallel with epigenetic alterations and cognitive impairment, characterized by changes in the patten of DNA methylation and by compromised consolidation of short- and long-term memories. Moreover, these changes were prevented by the administration of INS. Regarding to the specific effect of MG, it was observed a significant increase in oxygen consumption in the state IV of mitochondrial respiration and also a marked increase in reactive oxygen species (ROS) production in the H19-7 cell line. Moreover, the metabolic adaptations observed in the animal model of hyperglycemia were also confirmed in samples derived from individuals affected with

type 1 DM and/or PD. Additionally, it was also observed a significant increase in plasma neopterin levels, a parameter which indicates activation of the immune system. Finally, this study also focused on the effect of modulating BH4 metabolic pathway as a tool to reduce the perception of pain hypersensitivity in an animal model of neuropathic pain. Here, it was observed that the inhibition of sepiapterin reductase (SR), induces analgesia. In conclusion, it can be proposed that the oxidizing MG and/or AGEs formed during chronic hyperglycemia resulting from the DM would be involved in the biochemical changes observed in the CNS cells and predispose to the cognitive impairment observed in this study, providing a suitable scenario for the installation and development of neurodegenerative and/or neurological diseases, in particular PD and/or predispose to nociception.

**Keywords:** hyperglycemia, methylglyoxal, neurodegenerative disease, energy metabolism, creatine kinase, mitochondrial dysfunction, epigenetic.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\psi_m$ : Potencial de membrana mitocondrial  
5-meC: 5-metilcitosina  
3-DG: 3-deoxiglicosona  
ADP: Adenosina difosfato  
AGEs: Proteína glicada de forma não enzimática  
Akt: Proteína quinase serina-treonina  
AMO: acetol monooxigenase  
ATP: Adenosina trifosfato  
BH4: 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina  
BH2: 7,8-dihidrobiopterina  
BSA: Albumina sérica bovina  
CEUA: Comitê de ética no uso de animais  
CH<sub>3</sub>: Grupamento metil  
CK: Creatinaquinase  
CK-MM: Creatinaquinase isoforma cerebral  
CK-MB: Creatinaquinase isoforma cardíaca  
CK-MM: Creatinaquinase isoforma muscular  
CoQ: Coenzima Q  
CpG: Região de citocina que precede uma guanina  
Cr: Creatina  
CR: Cadeia respiratória  
DA: Doença de Alzheimer  
DCIP: 2,6- dinitrofenolindofenol  
DETAPAC: Ácido dietilenotriamina pentacético  
DHAP: Dihidroxiacetona fosfato  
DHFR: Dihidrofolato redutase  
DM: Diabetes Mellitus  
DM1: Diabetes Mellitus tipo 1  
DM2: Diabetes Mellitus tipo 2  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
DNMT: DNA metiltransferase  
DP: Doença de Parkinson  
DTE: 2,3-ditioeritrol  
DTNB: 5,5'-ditio bis-2-ácido nitrobenzóico  
EDTA: Ácido etileno diamino tetracético  
EROs: Espécies reativas de oxigênio  
FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FADH<sub>2</sub>: Flavina adenina dinucleotídeo, forma reduzida  
FCCP: Carbonilcianeto-4-trifluorometoxi fenil-hidroxona  
FMN: Flavina mononucleotídeo  
G3P: Gliceraldeído-3-fosfato  
G6PDH: Glicose-6-fosfato desidrogenase  
GLUT: Transportador de glicose  
GO: glioxal  
GOEs: Animal com aumento na expressão da GTPCH1  
GRD: Gânglio da raiz dorsal  
GSH: Glutathiona  
GTP: Guanosina trifosfato  
GTPCH: GTP ciclohidrolase  
HK: Hexoquinase  
i.p.: Intraperitoneal  
IRS: Substrato do receptor de insulina  
KO: Animal nocaute  
LINE-1: Elemento repetitivo do genoma  
Mn-SOD: Manganês superóxido dismutase  
MG: Metilglioxal  
NAD<sup>+</sup>: Nicotinamida e adenina dinucleotídeo  
NADH: Nicotinamida e adenina dinucleotídeo, forma reduzida  
NADPH: Fosfato de nicotinamida e adenina dinucleotídeo, forma reduzida  
NF-κB: Fator nuclear kappa B  
NOS-1: Óxido nítrico sintase neuronal  
NOS-2: Óxido nítrico sintase induzível  
NOS-3: Óxido nítrico sintase endotelial  
NPSH: Grupamentos tiólicos não proteicos  
ON: Óxido nítrico  
PAI-1: Inibidor do ativador do plasminogênio  
PCBD: Pterina-4α-carbinolamina desidratase  
PCr: Fosfocreatina  
PheOH: Fenilalanina hidroxilase  
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase  
PKC: Proteína quinase C  
PTS: 6-piruvil tetrahydrobiopterina sintase  
PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonil  
QDPR: Quinonoide-dihydrobiopterina redutase  
RAGES: Receptores para proteína glicada de forma não enzimática  
REST1: Fator de transcrição silenciador do elemento 1  
RNA: Ácido ribonucleico

SAM: S- adenosilmetionina  
s.c.: Subcutânea  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS  
SNC: Sistema nervoso central  
SNpc: Substância negra parte compacta  
Sp1: Fator de transcrição Sp1  
SR: Sepiapterina redutase  
SSAO: Amina oxidase sensível à ação de semicarbazida  
STZ: Estreptozotocina  
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TBS: Solução salina tamponada com Tris  
TBS-T: Solução salina tamponada com Tris e Tween  
TCA: Ácido tricloroacético  
TrpOH: Triptofano hidroxilase  
TyrOH: Tirosina hidroxilase  
UDP-GlcNAc: UDP-N-acetilglicosamina  
umit-CK: Creatinaquinase isoforma ubíqua mitocondrial  
smit-CK: Creatinaquinase isoforma sarcomérica mitocondrial  
VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular  
VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema ilustrativo das células das ilhotas de Langerhans.....	31
<b>Figura 2</b>	Secreção de insulina pelas células $\beta$ pancreáticas.....	32
<b>Figura 3</b>	Processos induzidos pela sinalização intracelular da insulina.....	34
<b>Figura 4</b>	Mecanismos de toxicidade induzidos pela hiperglicemia.....	36
<b>Figura 5</b>	Formação de produtos de glicação terminal (AGEs).....	38
<b>Figura 6</b>	Formação e desintoxicação de metilglioxal (MG)....	40
<b>Figura 7</b>	Anatomia bioquímica da mitocôndria (A) e proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (B)...	44
<b>Figura 8</b>	Vias de síntese da tetrahydrobiopterina (BH4).....	52
<b>Figura 9</b>	Esquema representativo da conversão do nucleotídeo citosina para 5-metilcitosina por ação de DNA metiltransferases (DNMT).....	55
<b>Figura 10</b>	Efeito da hiperglicemia induzida pela administração de STZ e da administração de INS no ganho de peso corporal (A), glicemia (B), concentração plasmática de insulina (C), perfil lipídico (D) e arquitetura das ilhotas de Langerhans (E) de ratos Wistar.....	82
<b>Figura 11</b>	Conteúdo de proteínas oxidadas por metilglioxal em córtex cerebral de ratos Wistar submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de STZ e/ou tratados com INS.....	83
<b>Figura 12</b>	Efeito da hiperglicemia induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre parâmetros de estresse oxidativo em fluídos biológicos de ratos Wistar.....	84

<b>Figura 13</b>	Efeito da hiperglicemia induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre a atividade dos complexos I, II, IV e V da cadeia transportadora de elétrons (A-D), creatinaquinase mitocondrial e total (E), hexoquinase mitocondrial (F) e o consumo de oxigênio mitocondrial (G) em mitocôndrias isoladas de encéfalo de ratos Wistar.....	86
<b>Figura 14</b>	Efeito da hiperglicemia induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre a atividade da creatinaquinase (A e B) em mitocôndrias isoladas de tecidos periféricos (músculos cardíaco e esquelético, rim e fígado) e da hexoquinase (C) em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar.....	87
<b>Figura 15</b>	Efeito da hiperglicemia induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre o conteúdo imunorreativo contra creatinaquinase (CK) (A) e expressão do gene que codifica para CK (B), em córtex cerebral de ratos Wistar.....	88
<b>Figura 16</b>	Efeito <i>in vitro</i> do metilglioxal (MG; 30 e 300 $\mu$ M) sobre a atividade da creatinaquinase (A) e sobre a viabilidade celular (redução do MTT) (B) em cultura primária de astrócitos corticais de rato.....	89
<b>Figura 17</b>	Efeito <i>in vitro</i> do metilglioxal (MG; 30 e 300 $\mu$ M) e da creatina (500 $\mu$ M) sobre o consumo de oxigênio mitocondrial na linhagem celular de células precursoras de hipocampo (H19-7).....	90
<b>Figura 18</b>	Mensuração da glicemia (A), concentração de proteínas oxidadas (B; AGEs), atividade do complexo I da cadeia respiratória (D) e da creatinaquinase (E), e concentração de neopterina (F) no sangue de indivíduos afetados por diabetes mellitus do tipo 1 e de indivíduos euglicêmicos.....	92

<b>Figura 19</b>	Mensuração da atividade plaquetária do complexo I da cadeia respiratória (A), glicemia (B), e concentração de proteínas oxidadas (C; AGEs), em sangue de indivíduos afetados pela doença de Parkinson e de indivíduos controles.....	93
<b>Figura 20</b>	Efeito da hiperglicemia induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre a locomoção espontânea de ratos Wistar.....	94
<b>Figura 21</b>	Efeito da hiperglicemia (A: 10 dias, B: 60 dias) induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre o parâmetro comportamental de esquiva inibitória.....	95
<b>Figura 22</b>	Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre o parâmetro comportamental de memória espacial mensurado através do teste do labirinto aquático de Morris.....	96
<b>Figura 23</b>	Efeito da hiperglicemia (10 e 60 dias) induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre o parâmetro comportamental de ansiedade no labirinto em cruz elevada.....	97
<b>Figura 24</b>	Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre o conteúdo de caspase-3 na forma clivada em córtex cerebral de ratos Wistar.....	98
<b>Figura 25</b>	Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de STZ sobre a localização subcelular da $\alpha$ -sinucleína em preparações de hipocampo de ratos Wistar.....	99
<b>Figura 26</b>	Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre a metilação global do DNA no hipocampo (A), estriado (B) e cerebelo (C) e sobre a metilação no promotor de LINE-1 no hipocampo (D), estriado (E) e cerebelo (F) de ratos Wistar.....	100

<b>Figura 27</b>	Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de STZ e da administração de INS sobre a expressão do gene que codifica para a proteína REST (A) e REST-4 (B) e sobre a metilação do promotor REST no hipocampo (C) de ratos Wistar. O painel (D) representa a graficação representativa dos dinucleotídeos CpG metilados no hipocampo.....	102
<b>Figura 28</b>	Atividade da enzima GTP ciclohidroxilase (GTPCH) em homogenato de gânglios da raiz dorsal (GRD) (A) e nervo ciático (B) e da enzima sepiapterina redutase (SR) em homogenato de GRD (C) e nervo ciático (D) em animais nocaute (KO) e animais com aumento da expressão (GOEs) da enzima GTPCH.....	104
<b>Figura 29</b>	Concentração de BH4 (A) e seus metabólitos BH2 (B), Neopterinina (C), Biopterina (D), Sepiapterina (E) e a relação entre BH2 e BH4 (F) em sobrenadante de neurônios de gânglios da raiz dorsal em camundongos KO para a enzima GTPCH.....	105
<b>Figura 30</b>	Atividade da enzima sepiapterina redutase (SR) (A) e da GTP ciclohidroxilase (GTPCH) (B) em neurônios de gânglios da raiz dorsal de camundongos C57/BL-6 tratados com N-acetil serotonina (NAS) e iSR por 24 horas nas concentrações crescentes de 0,1, 0,3, 1, 3 e 10 $\mu\text{M}$ ..	106
<b>Figura 31</b>	Cálculo da IC 50 para os inibidores da sepiapterina redutase NAS e iSR após 15 minutos (A) e 24 horas de incubação (B).....	107
<b>Figura 32</b>	Concentração de sepiapterina em sobrenadante de neurônios de gânglios da raiz dorsal de camundongos C57/BL-6 tratados com 0,3, 3 e 30 $\mu\text{M}$ de iSR por 24 horas.....	108

<b>Figura 33</b>	Concentração de BH4 em plasma (A), gânglios da raiz dorsal (L3, L4 e L5) (B) e nervo ciático (C) após administração por via intraperitoneal de iSR (300 mg/kg) em camundongos C57/BL-6 submetidos ao modelo de injúria do nervo ciático....	109
<b>Figura 34</b>	Indução de analgesia pela administração de iSR por via intraperitoneal em camundongos C57/BL-6 submetidos ao modelo de injúria do nervo ciático....	110
<b>Figura 35</b>	Concentração de fenilalanina (Phe) presente no plasma (A e B) e no fígado (C) após 3 administrações intraperitoneais consecutivas de iSR na dose de 300 mg/kg em camundongos C57/BL-6 submetidos ao modelo de injúria do nervo ciático....	110
<b>Figura 36</b>	Concentração de iSR (A) e de sepiapterina (B) no plasma após administração por via intraperitoneal de iSR (300 mg/kg) em animais com aumento da expressão da enzima GTPCH1 (GOEs). Foi calculada a correlação entre a concentração de iSR e a de sepiapterina no plasma (C).....	111
<b>Figura 37</b>	Atividade da sepiapterina redutase (SR) em gânglios da raiz dorsal (A) e no fígado (B) após administração por via intraperitoneal de iSR (300 mg/kg) em animais com aumento da expressão da enzima GTPCH (GOEs) e em animais sem modificação genética (wild types; WT).....	112
<b>Figura 38</b>	Efeitos celulares envolvidos durante a hiperglicemia crônica.....	129

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b>	Desenho experimental. Desenvolvimento de hiperglicemia pela administração de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar adultos.....	62
------------------	--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Sequência de primers utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real.....	72
-----------------	--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	29
1.1	DIABETES MELLITUS.....	29
1.2	HORMÔNIO INSULINA.....	30
<b>1.2.1</b>	<b>Síntese de insulina pelo pâncreas endócrino</b> .....	30
<b>1.2.2</b>	<b>Secreção de insulina</b> .....	31
<b>1.2.3</b>	<b>Efeitos celulares desencadeados pela insulina</b> .....	33
1.3	ALTERAÇÕES MOLECULARES E BIOQUÍMICAS CAUSADAS PELA HIPERGLICEMIA.....	34
<b>1.3.1</b>	<b>Aumento do fluxo da via do poliol</b> .....	35
<b>1.3.2</b>	<b>Ativação da PKC</b> .....	36
<b>1.3.3</b>	<b>Aumento no fluxo da via das hexosaminas</b> .....	37
<b>1.3.4</b>	<b>Aumento intra e extracelular de AGEs</b> .....	38
1.3.4.1	Metilglioxal (MG).....	40
1.4	FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....	42
1.5	MITOCÔNDRIA.....	43
<b>1.5.1</b>	<b>Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa</b> .....	44
<b>1.5.2</b>	<b>Creatinaquinase (CK)</b> .....	46
1.6	MECANISMOS DE NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADOS A HIPERGLICEMIA.....	47
<b>1.6.1</b>	<b>Envelhecimento e a predisposição ao desenvolvimento das doenças neurodegenerativas...</b>	47
<b>1.6.2</b>	<b>Doenças neurodegenerativas e a relação com a dor neuropática e o DM</b> .....	49
1.7	EPIGENÉTICA E O DM.....	54
<b>1.7.1</b>	<b>Metilação do DNA e sua relação com o DM e as doenças neurodegenerativas</b> .....	56
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	59
2.1	OBJETIVO GERAL.....	59
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	60

<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	61
4.1	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....	61
<b>4.1.1</b>	<b>Material e métodos referentes ao modelo experimental de hiperglicemia</b> .....	61
4.1.1.1	Animais.....	61
4.1.1.2	Modelo experimental de DM: Indução de hiperglicemia crônica através da administração intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ).....	61
4.1.1.3	Testes comportamentais.....	62
4.1.1.3.1	<i>Caixa de atividade</i> .....	62
4.1.1.3.2	<i>Teste comportamental da esQUIVA inibitória</i> .....	63
4.1.1.3.3	<i>Teste comportamental do labirinto aquático de Morris</i> .....	63
4.1.1.3.4	<i>Teste comportamental do labirinto em cruz elevado</i> ....	64
4.1.1.4	Parâmetros bioquímicos.....	64
4.1.1.4.1	<i>Mensuração da atividade das enzimas da cadeia respiratória</i> .....	65
4.1.1.4.2	<i>Mensuração da atividade da creatinaquinase</i> .....	65
4.1.1.4.3	<i>Mensuração da atividade da hexoquinase</i> .....	65
4.1.1.4.4	<i>Mensuração do consumo de oxigênio mitocondrial</i> ....	66
4.1.1.4.5	<i>Mensuração de grupamentos tiólicos não proteicos (NPSH)</i> .....	67
4.1.1.4.6	<i>Mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i> .....	67
4.1.1.4.7	<i>Mensuração de BH4 em líquido cefalorraquidiano</i> ....	68
4.1.1.4.8	<i>Mensuração de neopterina em plasma</i> .....	68
4.1.1.4.9	<i>Mensuração da formação de AGEs</i> .....	68
4.1.1.4.10	<i>Análise de proteínas por Western Blot</i> .....	69
4.1.1.5	Parâmetros histológicos.....	70
4.1.1.5.1	<i>Imunomarcção para o conteúdo de proteínas oxidadas por MG e de caspase-3 na forma clivada</i> .....	70
4.1.1.5.2	<i>Análise da localização subcelular da <math>\alpha</math>-sinucleína por microscopia imunoelétrica</i> .....	70

4.1.1.6	Parâmetros moleculares.....	71
4.1.1.6.1	<i>Determinação da expressão gênica da CK, REST e REST-4 por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR).....</i>	71
4.1.1.6.2	<i>Determinação do padrão de metilação do DNA.....</i>	72
4.1.1.6.3	<i>Determinação da metilação do promotor de REST e LINE-1 pelo método de COBRA.....</i>	73
<b>4.1.2</b>	<b>Material e métodos referentes ao modelo experimental de dor neuropática.....</b>	<b>75</b>
4.1.2.1	Animais.....	75
4.1.2.2	Indução de dor neuropática periférica.....	75
4.1.2.3	Avaliação de alodinia mecânica pelo teste comportamental de Von Frey.....	76
4.1.2.4	Mensuração da atividade enzimática da GTP ciclohidroxilase (GTPCH).....	76
4.1.2.5	Mensuração da atividade enzimática da sepiapterina redutase (SR).....	76
4.1.2.6	Quantificação de BH4, Sepiapterina, Neopterina, BH2 e Biopterina por cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa (LC-MS-MS).....	76
4.1.2.7	Mensuração de fenilalanina.....	77
4.1.2.8	Determinação de proteínas.....	77
4.2	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....	77
<b>4.2.1</b>	<b>Cultura primária de astrócitos corticais de rato Wistar.....</b>	<b>77</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Cultura primária de GRDs de camundongos C57/BL-6.....</b>	<b>78</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Manutenção da linhagem celular de células precursoras de hipocampo (H19-7).....</b>	<b>78</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Ensaio de viabilidade celular.....</b>	<b>78</b>
4.3	AMOSTRAS DE PACIENTES PORTADORES DE DM1.....	78
4.4	AMOSTRAS DE PACIENTES PORTADORES DE DP.....	79
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	79

5	<b>RESULTADOS.....</b>	80
	<b>CAPÍTULO I: EFEITO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA NOS METABOLISMOS ENERGÉTICO E DE PTERINAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS WISTAR ADULTOS; ADAPTAÇÕES METABÓLICAS NAS DOENÇAS CRÔNICAS DIABETES MELLITUS TIPO 1 E DOENÇA DE PARINSON.....</b>	81
5.1.1	<b>Caracterização clínica, bioquímica e histológica do modelo de hiperglicemia crônica induzido pela administração de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar.....</b>	81
5.1.2	<b>Atividade de enzimas chaves do metabolismo energético e respiração mitocondrial em encéfalo de animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena de INS.....</b>	85
5.1.3	<b>Atividade da creatinaquinase e hexoquinase em tecidos periféricos de animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena de INS.....</b>	87
5.1.4	<b>Avaliação do imunoconteúdo proteico e da expressão gênica da CK em animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena de INS.....</b>	88
5.1.5	<b>Efeito do metilglioal (MG) sobre a atividade da creatinaquinase e viabilidade celular em cultura primária de astrócitos corticais de rato.....</b>	89
5.1.6	<b>Efeito do MG e da creatina sobre a fisiologia mitocondrial na linhagem celular H19-7 (células precursoras de hipocampo) de rato.....</b>	90
5.1.7	<b>Identificação de AGEs, adaptações mitocondriais e ativação do sistema imune em sangue de indivíduos acometidos por Diabetes Mellitus to tipo 1 (DM1).....</b>	91
5.1.8	<b>Atividade do complexo I mitocondrial em plaquetas, glicemia e concentração plasmática de AGEs em indivíduos afetados pela doença neurodegenerativa de Parkinson (PD).....</b>	92

5.2	CAPÍTULO II: EFEITO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS E DE EPIGENÉTICA EM RATOS WISTAR ADULTOS.....	94
5.2.1	<b>Avaliação comportamental em animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena de INS.....</b>	94
5.2.2	<b>Parâmetros de neurodegeneração em córtex cerebral e hipocampo de animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena de INS.....</b>	98
5.2.3	<b>Alterações epigenéticas observadas no hipocampo de animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena de INS.....</b>	100
5.3	CAPÍTULO III: PAPEL PERIFÉRICO DO METABOLISMO DAS PTERINAS NA FISIOPATOLOGIA DA DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA.....	103
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	113
6.1	BIOENERGÉTICA E METABOLISMO DE PTERINAS NA HIPERGLICEMIA CRÔNICA E A RELAÇÃO COM A DOENÇA DE PARKINSON.....	113
6.2	EFEITO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS E DE EPIGENÉTICAS EM RATOS WISTAR ADULTOS..	120
6.3	PAPEL PERIFÉRICO DO METABOLISMO DAS PTERINAS NA FISIOPATOLOGIA DA DOR NEUROPÁTICA.....	123
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	127
8	<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	129
9	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	130
10	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	131



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DIABETES MELLITUS

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla caracterizada por um estado de hiperglicemia persistente decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos (Han et al., 2007; Malecki e Skupien, 2008).

A população diabética e a prevalência desta doença vem aumentando exponencialmente em vários países (387 milhões em todo o mundo), particularmente naqueles em desenvolvimento, representando um importante problema de saúde pública. No Brasil, 8,6% da população padece a doença e há um aumento de acordo com a faixa etária, sendo que 21,6% dos brasileiros com mais de 65 anos possuem a doença. O número de brasileiros com diabetes em 2000 era de 4,6 milhões e a estimativa era que em 2030 este número ultrapassasse 11 milhões. No entanto, estas projeções já foram ultrapassadas, haja vista que em dezembro de 2014 o número de diabéticos no Brasil foi estimado em aproximadamente 11,6 milhões (IDF, 2014).

De acordo com o comitê executivo para diagnóstico e classificação do DM da “American Diabetes Association” (ADA, 2012) e o Consenso Brasileiro sobre Diabetes (2002), a síndrome pode surgir de forma secundária a alguma doença que provoque a destruição das ilhotas pancreáticas, como por exemplo, tumores, patologias endócrinas, defeitos genéticos e funcionais das células  $\beta$  ou na ação da insulina. No entanto, as formas mais comuns de DM resultam de alterações primárias no sistema sinalizador deste hormônio. Tais alterações podem ser classificadas em duas categorias: DM1 e DM2.

O DM2 é a forma mais frequente que afeta aproximadamente 90% da população diabética. Esta condição é caracterizada por ser um distúrbio multifatorial, incluindo fatores genéticos e ambientais, e que geralmente resulta de graus variáveis de resistência tecidual à insulina e de uma deficiência relativa na secreção do hormônio pelas células  $\beta$  (Malecki e Klupa, 2005). Esta forma é observada em adultos e os níveis de glicemia, na maioria dos casos, podem ser controlados através de dieta apropriada e agentes antidiabéticos orais (Kowluru e Odenbach, 2004; Morini et al., 2004).

O DM1 manifesta-se geralmente durante a infância e caracteriza-se por uma severa ou total ausência de insulina, a que está comumente associada a processos autoimunes que afetam a

funcionalidade das células  $\beta$  do pâncreas (Atkinson e Eisenbarth, 2001; Malecki e Klupa, 2005). Tem sido sugerido que o caráter hereditário do DM do tipo 1 está relacionado com a expressão de genes reguladores da produção de anticorpos contra células  $\beta$  pancreáticas (Moore et al., 2009).

A maior morbidade e mortalidade associadas ao DM devem-se ao desenvolvimento de micro e macro vasculopatias (Winer e Sowers, 2004). As complicações microvasculares incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia central e periférica, as quais predisõem as complicações macrovasculares, como doença coronária, doença vascular periférica, infarto e amputações de membros inferiores (Brownlee, 2001; Zimmet et al., 2001; Wirotko et al., 2008). Estas complicações vasculares permanecem na maioria dos pacientes com DM, e sua prevalência varia de 10% a 50%, um ano ou 25 anos após o diagnóstico de DM, ainda em pacientes onde as concentrações de glicose sanguínea foram rigorosamente controladas (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, 2008; The Advance Collaborative Group, 2008). Neste cenário, surge o conceito de “memória metabólica”, onde a hiperglicemia, como consequência da falha de sinalização da insulina, induziria efeitos deletérios de longa duração, os quais não podem ser revertidos a menos que o controle glicêmico seja iniciado nos estágios mais precoces da doença (Nathan et al., 2005; Ceriello et al., 2009).

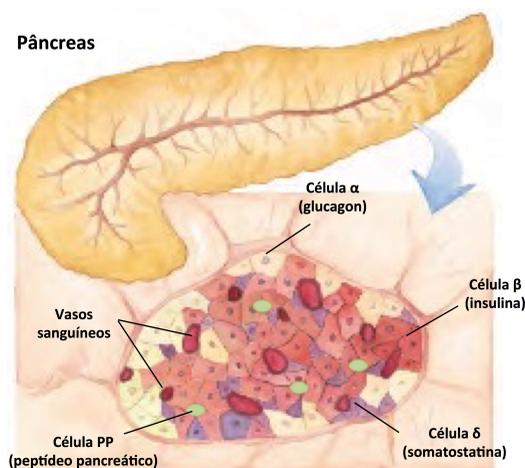
## 1.2 HORMÔNIO INSULINA

### 1.2.1 Síntese de insulina pelo pâncreas endócrino

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

secreção de alguns dos hormônios pelos demais hormônios. Por exemplo, a insulina inibe a secreção de glucagon, enquanto que a somatostatina inibe a secreção de insulina e glucagon (Nelson e Cox, 2004; Guyton, 2006).

Nas células  $\beta$ , a insulina é produzida na forma de pré-pró-insulina no retículo endoplasmático rugoso, e estocada em vesículas na forma de pró-insulina pelo complexo de Golgi. Após estímulo, a pró-insulina é convertida por proteases à insulina madura e peptídeo C, os quais são liberados na corrente sanguínea. O peptídeo C é liberado em quantidades equimolares à insulina madura, desta forma é um excelente indicador da produção endógena de insulina, principalmente em indivíduos que se encontram sob terapia exógena com o hormônio.

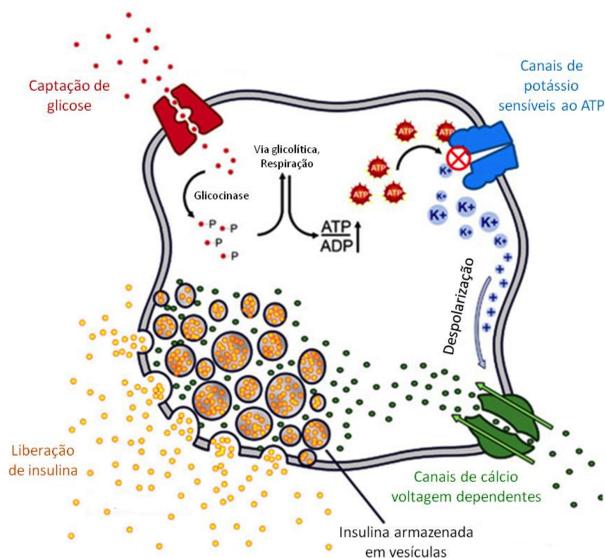


**Figura 1. Esquema ilustrativo das células das ilhotas de Langerhans.** As ilhotas de Langerhans são compostas por quatro tipos celulares, as  $\beta$  que secretam insulina, as  $\alpha$  que secretam glucagon, as  $\delta$  que secretam somatostatina e as PP que são produtoras do polipeptídeo pancreático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

### 1.2.2 Secreção de insulina

A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pela célula  $\beta$  pancreática, sendo a glicose o mais importante. A glicose é transportada para dentro da célula  $\beta$  através de

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



**Figura 2. Secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas.** A glicose é transportada para o interior da célula  $\beta$  através do GLUT2. Posteriormente é fosforilada, dando início à via glicolítica com subsequente geração de ATP. O aumento nas concentrações intracelulares de ATP bloqueia os canais de potássio e provoca a despolarização da membrana, promovendo a entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Este processo estimula a migração dos grânulos que contem insulina para a membrana plasmática para extrusão de seu conteúdo (Adaptado de [http://ciitn.missouri.edu/cgi-bin/pub\\_view\\_project\\_ind.cgi?g\\_num=11&c\\_id=2007009](http://ciitn.missouri.edu/cgi-bin/pub_view_project_ind.cgi?g_num=11&c_id=2007009)). Consultado em 20 de outubro de 2014.

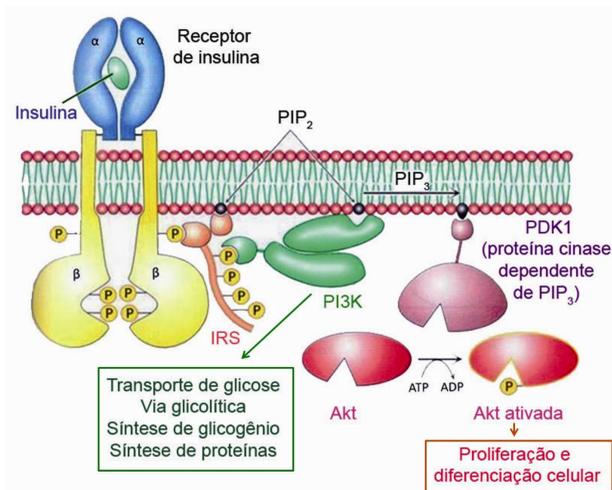
### 1.2.3 Efeitos celulares desencadeados pela insulina

A insulina promove um estado anabólico por conduzir o metabolismo em direção ao armazenamento de carboidratos, lipídeos e à síntese de proteínas. Seus três principais tecidos alvo são o hepático, muscular e adiposo. No fígado, a insulina estimula tanto a glicólise quanto a síntese de glicogênio. Ao mesmo tempo, ela suprime a lipólise e promove a síntese de ácidos graxos de cadeia longa (lipogênese). Os lipídeos são empacotados nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que são secretadas para o sangue. Nos tecidos periféricos, a insulina induz a lipoproteína lipase, uma enzima que libera triacilglicerol tanto de VLDL hepática quanto de quilomícrons da dieta, a partir da hidrólise destes em glicerol e ácidos graxos. No tecido adiposo, este hormônio também estimula a síntese de triacilglicerol a partir de glicerol-3-fosfato e ácidos graxos. No músculo, a insulina estimula o transporte de glicose, o metabolismo de glicose e a síntese de glicogênio. Ainda, este hormônio aumenta a captação celular de aminoácidos, estimula a síntese de proteínas e inibe a degradação destas (Baynes e Dominiczak, 2007).

Os efeitos celulares anabólicos acima descritos da insulina são desencadeados através da sua interação com receptores específicos localizados na superfície celular. O receptor de insulina está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas concentrações variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 nas células adiposas e hepáticas (White e Kahn, 1994). A sinalização intracelular da insulina inicia através da interação da mesma com seu receptor específico de membrana, o receptor de insulina. O receptor da insulina é uma proteína heterotetramérica com atividade tirosina quinase, composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$  ligadas por pontes dissulfeto (Figura 3). A subunidade  $\alpha$  é extracelular e possui o sítio de ligação da insulina, enquanto que a subunidade  $\beta$  é uma proteína transmembrana com atividade de tirosina quinase, a qual é ativada pela interação da insulina com o receptor (Saltiel e Kahn, 2001; Nelson e Cox, 2004).

O receptor de insulina uma vez ativado por autofosforilação fosforila diversos substratos intracelulares, entre eles as proteínas conhecidas como substratos do receptor de insulina (IRSs), resultando na translocação destes desde o citosol para a membrana plasmática. A fosforilação dos IRSs provoca a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteína quinase serina-treonina (Akt), entre outras (Prada et al., 2005). A ativação da PI3K está relacionada com o transporte de

glicose, via glicolítica, síntese de glicogênio e síntese de proteínas, enquanto que a Akt está associada à proliferação e diferenciação celular (Combettes-Souverein e Issad, 1998).



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

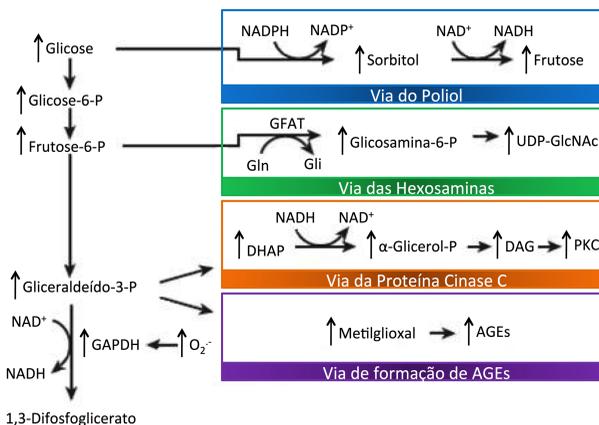
### 1.3 ALTERAÇÕES MOLECULARES E BIOQUÍMICAS CAUSADAS PELA HIPERGLICEMIA

A hiperglicemia persistente do DM parece contribuir para o desenvolvimento das complicações vasculares através de quatro mecanismos moleculares principais, incluindo o aumento do fluxo da via do polioliol, aumento do fluxo da via das hexosaminas, ativação da proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC) e aumento na concentração de proteínas glicadas de forma não enzimática (AGEs). Estas modificações metabólicas culminam com a produção de espécies

reativas, oxidação de proteínas, inativação de enzimas citosólicas e mitocondriais, alterações no sistema de defesa antioxidante, disfunção mitocondrial, entre outros (Mukherjee et al., 1998; Rosen et al., 2001; Folmer et al., 2002; Brownlee, 2005).

### **1.3.1 Aumento do fluxo da via do polioli**

Em condições de hiperglicemia, onde ocorre um aumento nas concentrações de glicose intracelular em células que não dependem da insulina para a captação de glicose, a enzima aldose redutase pode formar sorbitol a partir da glicose, com a utilização de NADPH como cofator (Figura 4). O sorbitol, por sua vez, é oxidado a frutose pela enzima sorbitol desidrogenase, reduzindo  $\text{NAD}^+$  a NADH, e posteriormente a frutose é fosforilada a frutose-6-fosfato, a qual pode ser metabolizada em 3-deoxiglicosona, um composto reativo que pode levar a formação de AGEs (Gonzalez, 1988; Szwegold et al., 1990; Brownlee, 2001). Desta forma, além de alterar o equilíbrio osmótico celular devido à produção de sorbitol, esta via resulta na produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição das concentrações intracelulares de NADPH. Assim, o aumento da via do polioli diminui a disponibilidade do NADPH para ser utilizado por sistemas enzimáticos antioxidantes, levando a um estado de estresse oxidativo, associado à hiperglicemia (Brownlee, 2001). Ainda, como esta via produz NADH, há conseqüentemente um aumento na relação  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , o que leva à inibição da atividade de várias enzimas incluindo a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (enzima da via glicolítica), aumentando as concentrações de trioses fosfato (gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato). O aumento na concentração destes intermediários glicolíticos leva à produção de metilglioxal (MG), o principal precursor de AGEs (Williamson et al., 1993). Além da produção de MG, o aumento das concentrações de trioses fosfato conduz à formação de diacilglicerol, levando a ativação de PKC (Brownlee, 2001).



**Figura 4. Mecanismos de toxicidade induzidos pela hiperglicemia.** As setas indicam aumento das concentrações dos diferentes metabólitos e/ou proteínas (Adaptado de Brownlee, 2001).

### 1.3.2 Ativação da PKC

A família das PKCs (proteínas quinases C) consiste de proteínas com atividade quinase contendo pelo menos onze isoformas diferentes, distribuídas amplamente em tecidos de mamíferos. Para a sua atividade, estas enzimas dependem de íons cálcio e de fosfatidilserina, além do diacilglicerol, o qual aumenta significativamente a capacidade desta enzima para fosforilar suas diversas proteínas-alvo (Gerald e King, 2010).

A ativação persistente e excessiva da PKC é uma das consequências da hiperglicemia crônica, resultando em um dano tecidual decorrente da produção de EROs (Figura 4). Resulta da síntese *de novo* do segundo mensageiro lipídico diacilglicerol, que como mencionado, é produzido a partir de trioses fosfato. O aumento deste intermediário pode ser também uma consequência da inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase provocada por EROs, ou como consequência do aumento da via do poliol, ambas provocando um aumento nas concentrações de trioses fosfato (Shiba et al., 1993; Scivittaro et al., 2000; Brownlee, 2001; Inoguchi et al., 2003). Além disso, alguns estudos sugerem que a ativação da PKC também pode ser

o resultado da interação de AGEs com seus receptores localizados na superfície celular (RAGEs), os quais estão presentes em vários tipos celulares como as células endoteliais, neurônios, monócitos e macrófagos. Sabe-se que a interação dos AGEs com os RAGEs ativa, através da geração de espécies reativas, o fator de transcrição pleiotrópico NF- $\kappa$ B induzindo patologicamente a expressão de numerosos genes pró-oxidantes (Brownlee, 2001; Liu et al., 2009; Giacco e Brownlee, 2010). Além disso, a ativação exacerbada da PKC pode induzir a expressão patológica de vários genes, como o do VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) ou inibir a expressão de proteínas como NOS-3 (óxido nítrico sintase 3, antigamente denominada de endotelial), diminuindo conseqüentemente a produção de óxido nítrico (Ganz e Seftel, 2000; Kuboki et al., 2000). Estes fatores provenientes da indução excessiva da PKC levam à alteração da permeabilidade e do fluxo sanguíneo nos vasos (Feener et al., 1996; Hempel et al., 1997, Pieper e Riaz ul, 1997; Williams et al., 1997).

### **1.3.3 Aumento do fluxo da via das hexosaminas**

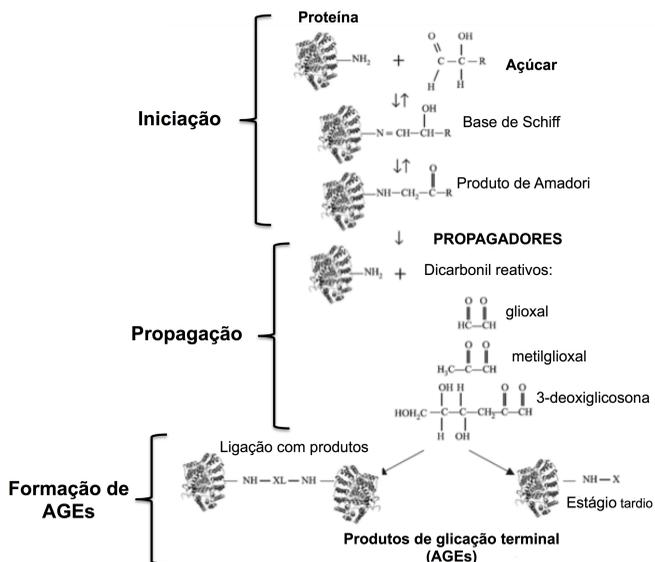
Outra conseqüência da hiperglicemia crônica é causar o aumento do fluxo da frutose-6-fosfato na via das hexosaminas (Figura 4) (Chen et al., 1998; Kolm-Litty et al., 1998; Du et al., 2000). Devido ao aumento da via glicolítica e um conseqüente aumento da frutose-6-fosfato formado, este serve como substrato para a enzima glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase para a formação de glicosamina-6-fosfato, a qual é então convertida a UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc) (Giacco e Brownlee, 2010). Por sua vez, esta pode ser utilizada para formar, por exemplo, proteoglicanas e O-glicoproteínas (Brownlee, 2001; Wells et al., 2001).

O aumento na via das hexosaminas está envolvido com o aumento da expressão de genes relacionados com o desenvolvimento das complicações vasculares que ocorrem no diabetes e/ou no desenvolvimento da resistência a insulina (Marshall e Monzon, 1989; Gabriely et al., 2002). Por exemplo, foi demonstrado que o aumento na produção de UDP-GlcNAc resulta na ativação do fator de transcrição Sp1, o que regula a ativação do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), contribuindo para o comprometimento da fisiologia vascular (Chen et al., 1998).

### 1.3.4 Aumento intra e extracelular de AGEs

Os AGEs são um grupo de moléculas heterogêneas produzidas através da glicação não enzimática de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. O nível de hiperglicemia, a taxa de renovação de proteínas e o estresse oxidativo são fatores cruciais para a sua formação; desta forma, se algum destes fatores está presente, as proteínas tanto intra como extracelulares são passíveis de serem glicadas, e portanto, oxidadas (Baynes e Thorpe, 1999; Ahmed et al., 2005).

A formação de AGEs envolve três passos principais: a iniciação, a propagação e a formação de AGEs propriamente dita (Figura 5), as quais são coletivamente chamadas de reações de Maillard (Thornalley, 2008).



**Figura 5. Formação de produtos de glicação terminal (AGEs).** Açúcares redutores tendem a interagir com resíduos de aminoácidos livres de proteínas, formando bases de Schiff. Estas sofrem um rearranjo molecular e originam os produtos de Amadori, os quais podem ser degradados e dar origem a compostos dicarbonílicos como o metilglicoxal (MG), glicoxal (GO) e 3-deoxiglicosona (3-DG). Estes compostos, por sua vez, reagem com grupamentos amino livres de proteínas, formando compostos insolúveis e irreversíveis chamados de produtos de glicação terminal (AGEs) (Adaptado de Lapolla et al., 2005).

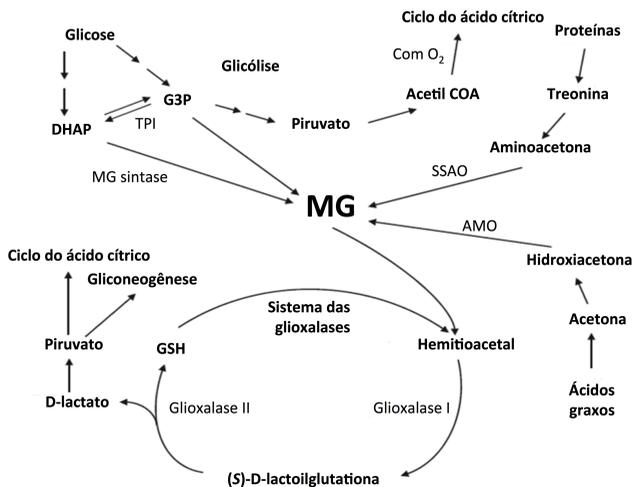
A iniciação vai desde a formação da base de Schiff até a formação do produto de Amadori. Inicialmente, ocorre a condensação não enzimática de um açúcar redutor, como a glicose, com um grupamento amino livre de várias moléculas, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, formando compostos aldimina instáveis, chamados bases de Schiff (Njoroge e Monnier, 1989; Bierhaus et al., 1997). Se a hiperglicemia persistir, em poucas horas esta base de Schiff sofre um rearranjo molecular originando uma cetoamina estável, mais estável que a base de Schiff, chamados produtos de Amadori. Essa reação não requer a participação de enzimas e depende da concentração de glicose e proteínas, e também da meia vida das proteínas, além de depender da sua reatividade em termos de grupos aminos livres. (Hunt et al., 1988; Lapolla et al., 2005; Zhang et al., 2009). A fase de propagação envolve reações de oxidação e desidratação dos produtos de Amadori, sendo estes convertidos a compostos dicarbonílicos (glioxal, deoxiglicosanas e metilglioxal), os quais, por serem mais reativos do que os açúcares que os originaram, agem como propagadores da glicação não enzimática de proteínas (Lapolla et al., 2005). Estes compostos dicarbonílicos possuem uma meia-vida longa (minutos a horas) e atravessam facilmente a membrana plasmática, podendo atuar longe do seu local de produção, modificando desta forma, biomoléculas intra e extracelulares. O acúmulo destes compostos é chamado de estresse por carbonilação (Thornalley et al., 1999). Por fim, na fase de formação de AGEs propriamente dita, os compostos propagadores reagem com grupamentos amino livres de proteínas através de reações de oxidação, desidratação e ciclização, formando compostos amarelo-marrons, insolúveis e irreversíveis, chamados AGEs (Lapolla et al., 2005; Ravelojaona et al., 2007; Zhang et al., 2009).

A relação entre concentrações de glicose sanguínea e o acúmulo tecidual de AGEs tem sido mais estudada em modelos animais. Por exemplo, em vasos sanguíneos da retina de ratos com hiperglicemia crônica foi observado que há cerca de 10-45 vezes mais AGEs que em animais não diabéticos, após 5-20 semanas de hiperglicemia. Esta relação sugere que mesmo um aumento modesto na concentração de glicose sanguínea resulta em um aumento substancial no acúmulo de AGEs nos tecidos (Brownlee, 1995). Em pacientes diabéticos foi encontrado um aumento na concentração do MG, principal composto precursor de AGEs, em fluidos corporais e tecidos, o que leva a pressupor que este composto é um dos principais responsáveis pelas complicações diabéticas (Messier e Gagnon, 1996; Vander Jagt e Hunsaker, 2003).

### 1.3.4.1 Metilglioxal (MG)

O MG é um alfa-oxoaldeído altamente reativo que pode ser formado a partir de trioses-fosfato, através de acetonas durante o metabolismo dos ácidos graxos e a partir do catabolismo do aminoácido treonina (Figura 6) (Phillips e Thornalley, 1993; Desai e Wu, 2007; Kalapos, 2008).

Este composto pode ser formado não enzimaticamente a partir das trioses-fosfato (Richard, 1991; Phillips e Thornalley, 1993) ou com a participação das enzimas triose-fosfato isomerase, a qual converte o gliceraldeído-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato (Pompliano et al., 1990), sendo este último convertido a MG pela metilglioxal sintase (Ray e Ray, 1981). A formação não enzimática de MG ocorre em todas as células, sendo que cerca de 0,1% do metabolismo de trioses-fosfato resultam na formação deste composto em condições normoglicêmicas (Phillips e Thornalley, 1993).



**Figura 6. Formação e desintoxicação de metilglioxal (MG).** O MG pode ser formado a partir de intermediários da via glicolítica, aminoacetonas e de corpos cetônicos. A desintoxicação deste composto é realizada através das glioxalases, as quais estão presentes no citosol de todas as células. SSAO: amina oxidase sensível à ação de semicarbazida; AMO: acetol mono-oxigenase, G3P: gliceraldeído-3-fosfato, DHAP: dihidroxiacetona fosfato (Adaptado de Chang e Wu, 2006).

A síntese de MG a partir de acetonas formadas durante o metabolismo de ácidos graxos é realizada pelo citocromo P450 2E (acetona e acetol monooxigenase) (Gonzalez, 1988), utilizando NAD(P)H como cofactor (Casazza et al., 1984; Gonzalez, 1988). Outras fontes de MG envolvem os corpos cetônicos acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato, os quais são espontaneamente convertidos em acetona, sendo esta convertida a MG de acordo com o mecanismo acima descrito (Beisswenger et al., 2005).

As aminoacetonas formadas durante o catabolismo da treonina podem resultar na formação de MG pela ação da enzima amina oxidase sensível à ação de semicarbazida (SSAO), a qual realiza a desaminação das aminoacetonas formadas a partir da treonina à MG (Figura 6). A SSAO está localizada na superfície da membrana mitocondrial externa e no citoplasma do tecido adiposo, células da musculatura lisa vascular e em células endoteliais (Yu et al., 2003).

Após formado, o MG é mantido em concentrações basais através do seu catabolismo pela via das glioxalases, compreendida pelas enzimas glioxalase I e II (Chang e Wu, 2006). A glioxalase I catalisa a formação de S-D-lactoilglutaciona a partir de MG e glutaciona (GSH). A glioxalase II catalisa a hidrólise de S-D-lactoilglutaciona à D-lactato, regenerando a GSH consumida na reação catalisada pela glioxalase I (Figura 6). Posteriormente, o D-lactato é metabolizado a piruvato (Thornalley, 1993). Desta forma, é evidente que o normal funcionamento do catabolismo do MG é dependente de concentrações adequadas de GSH, bem como de glutaciona peroxidase e glutaciona redutase, situações comprometidas pelo estresse oxidativo que caracteriza o estado hiperglicêmico (Wu e Juurlink, 2002; Wang et al., 2005; Desai e Wu, 2007). O MG é também metabolizado pela aldose redutase, uma aldeído redutase envolvida na desintoxicação de aldeídos (Grimshaw, 1992). Esta enzima converte MG principalmente a hidroxiacetona e em pequeno percentual a o-lactaldeído (Vander Jagt e Hunsaker, 2003). Entretanto, em humanos o MG é principalmente catabolizado pelo sistema das glioxalases. No entanto, em condições de hiperglicemia, as concentrações de MG aumentam pois esta via não é capaz de catabolizar todo o MG formado. Segundo Thornalley e colaboradores (1989), a concentração plasmática de MG pode atingir concentrações de 6  $\mu\text{M}$  em pacientes diabéticos enquanto que em indivíduos normoglicêmicos os valores deste metabólito nunca ultrapassa 1  $\mu\text{M}$ . Desta maneira, o MG em excesso liga-se a proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos promovendo modificações na estrutura destes compostos, e favorecendo a formação de AGEs (Lo et al., 1994;

Vaca et al., 1994). Neste contexto, o MG foi identificado como o principal precursor na formação de AGEs (Thornalley, 1990; Wells-Knecht et al., 1995; Shinohara et al., 1998). Acredita-se que menos de 1% do MG ocorra em forma livre, e cerca de 99% é encontrado conjugado à proteínas (Chaplen et al., 1998; Ahmed et al., 2005). O MG reage com resíduos cisteína, lisina e arginina de proteínas, podendo levar à degradação não fisiológica destas, inativação de enzimas, desnaturação proteica e ainda desencadear a resposta imune (Westwood et al., 1994; Papoulis et al., 1995; Thornalley et al., 1999). O DNA também pode ser modificado através da glicação pelo MG, e a excessiva modificação de ácidos nucleicos por este composto é associada com mutagênese e apoptose. Por outro lado, o excesso na glicação de lipídios de membrana leva à perda de integridade da mesma (Thornalley et al., 1999). Estas proteínas modificadas podem ser proteínas de vida longa, como as encontradas no cristalino, o colágeno das membranas basais dos capilares da retina e do glomérulo, e a mielina do sistema nervoso periférico, prejudicando a função destes tecidos (Wendt et al., 2002; Sakurai et al., 2003).

#### 1.4 FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

A produção de EROs é um mecanismo necessário em vários processos biológicos, tais como a sinalização celular, contração muscular e sistema imune (Kaneko et al., 2001). Por outro lado, quando os níveis totais de EROs forem maiores que a capacidade de defesa antioxidante, a geração de EROs se torna prejudicial ao organismo, podendo causar danos celulares significativos.

A mitocôndria é o principal local de produção de EROs em condições fisiológicas, sendo os complexos I e III da cadeia respiratória os principais geradores de EROs nestas condições (Chance et al., 1979; Sipos et al., 2003). No complexo I, o superóxido é liberado para a matriz mitocondrial, já no III a liberação pode ser tanto na matriz, no espaço intermembranas e no espaço extramitocondrial (Han et al., 2001; St-Pierre et al., 2002). Para contrabalancear a produção de EROs, a mitocôndria possui sistemas de defesa antioxidante, como as enzimas manganês superóxido dismutase (Mn-SOD), peroxirredoxinas, o sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase, a coenzima Q<sub>10</sub> (ubiquinona), creatina e nicotinamida (Okado-Matsumoto e Fridovich, 2001; Droge, 2002; James et al., 2004). Mais recentemente, foi demonstrado que

algumas quinases mitocondriais como a hexoquinase (HK) e a creatinaquinase (CK), possuem um papel essencial como antioxidantes mitocondriais (Dolder et al., 2003; Santiago et al., 2008). Esta atividade parece estar relacionada com a capacidade de modular o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), pois quanto maior o valor do  $\Delta\psi_m$ , maior é a probabilidade de formar EROs. Sabe-se ainda que a taxa de produção de EROs é inversamente proporcional à disponibilidade de ADP intramitocondrial (Korshunov et al., 1997; Cadenas e Davies, 2000). A excessiva produção de EROs pode também induzir a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de membrana, muito concentrados no sistema nervoso central, levando a múltiplos produtos tóxicos de peroxidação lipídica (Poli e Schaur, 2000).

## 1.5 MITOCÔNDRIA

A mitocôndria é a organela celular responsável pela maior produção líquida de energia, a qual contém proteínas envolvidas com a oxidação de nutrientes bem como com a respiração celular com concomitante geração de energia (Lehninger e Smith, 1949; Kennedy and Lehninger, 1950; 1951). Esta organela possui uma estrutura basicamente membranosa, sendo envolvida por duas membranas, a membrana externa e a membrana interna, ambas com composição química e estrutural diferentes entre si. A membrana externa é mais permeável que a membrana interna. O espaço entre estas membranas é denominado espaço intermembranoso, onde ocorrem reações essenciais ao metabolismo celular. A membrana interna é formada por pregas que se expandem no espaço intramitocondrial (matriz mitocondrial) denominadas cristas mitocondriais (Nelson e Cox, 2004) (Figura 7).

A maquinaria molecular desta organela compreende enzimas presentes na matriz mitocondrial (ciclo do ácido cítrico) e proteínas organizadas na membrana mitocondrial interna (cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória). Os genomas nuclear e mitocondrial são responsáveis por codificar os complexos proteicos envolvidos na formação de energia e respiração celular (Di Donato, 2000).

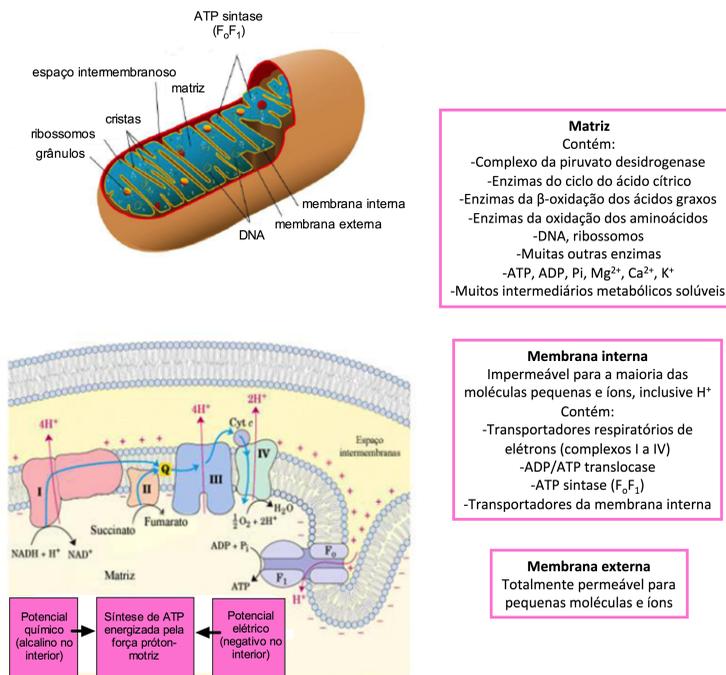


Figura 7. Anatomia bioquímica da mitocôndria (A) e proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (B) (Adaptado de Lehninger et al., 2004).

### 1.5.1 Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa

A cadeia respiratória (CR) é composta por cinco complexos enzimáticos multiproteicos distribuídos na membrana mitocondrial interna. Os elétrons oriundos do NADH e do FADH<sub>2</sub> vindos do ciclo do ácido cítrico e de outras reações catalisadas por desidrogenases são transferidos para a CR, tendo o oxigênio molecular como aceptor final. Junto a este processo, ocorre a translocação de prótons através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembranoso e a síntese endergônica de ATP, empregando como força motriz a energia armazenada como gradiente eletroquímico de prótons (Babcock e Wikstrom, 1992; Voet e Voet, 1995). A maior parte das proteínas que constituem cada complexo se encontram embebidas na membrana mitocondrial interna, possuindo vários grupamentos prostéticos com

potencial de oxi-redução sucessivamente maiores (Voet e Voet, 1995; Di Donato, 2000).

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

O complexo II (Succinato – Coenzima Q redutase) é composto por quatro subunidades proteicas, dentre elas a enzima dimérica succinato desidrogenase, componente do ciclo do ácido cítrico, todas codificadas pelo DNA nuclear. Neste complexo, os elétrons provindos do FADH<sub>2</sub> são doados para a CoQ. Estão presentes um FAD covalentemente ligado à succinato desidrogenase, dois centros ferro-enxofre e um citocromo *b*<sub>560</sub> (Voet e Voet, 1995; Di Donato, 2000).

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

O Complexo IV (Citocromo *c* oxidase) transporta elétrons doados pelo ferrocitocromo *c* para o oxigênio molecular. Este complexo consiste de doze ou mais subunidades polipeptídicas (Barrientos et al., 2002). O centro catalítico da enzima é formado por três subunidades maiores que são codificadas pelo DNA mitocondrial. A subunidade I contém grupamentos heme e um dos íons Cu (Cu<sub>B</sub>), e a subunidade II contém um centro de Cu binuclear (Cu<sub>A</sub>) (Capaldi, 1990). A subunidade III não apresenta grupamento prostético e não parece estar envolvida na síntese de ATP, apenas favorece a estabilidade estrutural. As demais subunidades, codificadas pelo DNA nuclear, não parecem ser essenciais ao mecanismo catalítico básico de redução de oxigênio e à transferência

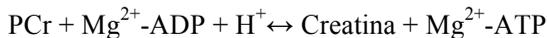
vetorial de prótons (Saraste, 1990; Barrientos et al., 2002). A reação redox entre o citocromo *c* e o oxigênio molecular é irreversível, sendo a citocromo *c* oxidase uma enzima chave na produção de energia (Poyton e McEwen, 1996).

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

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

### 1.5.2 Creatinaquinase (CK)

A CK catalisa a transferência reversível de um grupamento *N*-fosforil da fosfocreatina (PCr) para a ADP, formando ATP e creatina (Cr) em uma reação dependente de magnésio (Wallimann et al., 1992). Esta reação fornece um sistema eficaz de tamponamento do ATP, em células que apresentam um elevado metabolismo energético (Bessman e Carpenter, 1985; Bittl e Ingwall, 1985; Wallimann et al., 1992):



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

Neste sentido, existem quatro isoenzimas principais da CK, as quais são específicas de cada tecido e são codificadas por genes

diferentes. Dentre elas, compreendem duas formas citosólicas, a muscular (CK-MM) e a cerebral (CK-BB), ambas formando homodímeros em condições fisiológicas, podendo se apresentar como heterodímero no tecido cardíaco (CK-MB). Ainda, existem duas isoformas mitocondriais localizadas no espaço intermembranas, a ubíqua (umit-CK) e a sarcomérica (smit-CK), as quais são expressas predominantemente no cérebro e no músculo estriado, respectivamente (Wallimann et al., 1992). As isoenzimas mitocondrial e citosólica sempre são coexpressas em tecidos específicos, e esta interação entre as duas isoformas é fundamental para a manutenção da homeostasia energética e celular (Wallimann et al., 1992; Wyss et al., 1992).

O sistema de transferência reversível de fosfatos ou também chamado de “sistema CK/PCr” citado acima, serve como um tampão de energia flutuante, sendo importante na manutenção das concentrações de ATP e ADP e ainda no tamponamento dos  $H^+$  gerados. Além disso, a PCr serve como transportadora de energia, conectando locais de liberação e captação de energia (glicólise e mitocôndria) com os locais de consumo de energia (ATPases e quinases no citosol), através da compartimentalização das isoformas da CK (Wallimann et al., 1992).

## 1.6 MECANISMOS DE NEURODEGENERAÇÃO ASSOCIADOS A HIPERGLICEMIA

### 1.6.1 Envelhecimento e a predisposição ao desenvolvimento das doenças neurodegenerativas

Desde meados do século XX, vem ocorrendo um aumento exponencial na expectativa de vida, fenômeno conhecido como “epidemia do envelhecimento”. Este fenômeno foi observado primeiramente nos países economicamente desenvolvidos e, mais recentemente, tem se observado também nos países em desenvolvimento (Weksler et al., 2009). No Brasil, a expectativa de vida que era 48 anos em 1960, passou a ser 73 anos de idade em 2010 (IBGE, 2010). Este aumento na expectativa de vida combinado com a queda na taxa de natalidade na população mundial, está aumentando a prevalência ao desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento, incluindo as doenças neurodegenerativas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente existem 35,6 milhões de pessoas acometidas pelas doenças neurodegenerativas e, para o ano de 2050, a projeção é que este número triplique, representando a segunda maior causa de óbito

em todo o mundo (WHO, 2002), principalmente pela falta de novos tratamentos mais eficazes que permitam prevenir, atenuar ou reverter estes processos (Imtiaz et al., 2014).

As doenças neurodegenerativas crônicas podem ser definidas como um grupo de distúrbios heterogêneos caracterizadas por um início insidioso, de progressão lenta e com características neuropatológicas fortemente associadas à degeneração numa área específica do cérebro. Como exemplos, podem ser citados a degeneração dos neurônios da substância negra parte compacta (SNpc) na doença de Parkinson (DP) (Jellinger, 1988; Blandini et al., 2000), dos neurônios corticais na doença de Alzheimer (DA) (German et al., 1987), dos neurônios motores na esclerose lateral amiotrófica (Rowland, 1998), ou dos neurônios pequenos do estriado na doença de Huntington (Mann et al., 1993). Em particular, a DP é a principal doença neurodegenerativa relacionada com distúrbios do movimento, caracterizada por tremor de repouso, bradicinesia (lentidão dos movimentos), instabilidade postural e rigidez muscular (Gelb et al., 1999). Como mencionado previamente, o DP tem como principal característica neuropatológica a lesão de neurônios dopaminérgicos localizados na SNpc, que enviam projeções para os gânglios da base, e cuja degeneração provoca uma redução no conteúdo de dopamina no estriado (Jellinger, 1991; Blandini et al., 2000). Além disso, estudos recentes *post-mortem* indicam que a neurodegeneração da DP é muito mais extensiva e afeta também muitos neurônios não-dopaminérgicos em diferentes áreas cerebrais, como por exemplo no hipocampo (Braak et al., 2004; Hindle, 2010). A segunda característica neuropatológica da DP é o aparecimento de inclusões eosinofílicas citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy, as quais são compostas principalmente pelo acúmulo das proteínas  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina. Estas inclusões parecem se acumular em neurônios que se encontram em processo de degeneração, particularmente em neurônios dopaminérgicos da SNpc, sendo por esta razão utilizadas como marcador neuropatológico da DP (Hagan et al., 1997; Blandini et al., 2000). Ainda, de acordo com Koutsilieri e colaboradores (2002), o aparecimento de EROs ocorre juntamente com a presença de AGEs nos copos de Lewy.

A morte celular e a disfunção progressiva nestas enfermidades neurodegenerativas parecem estar associadas morfológicamente a gliose e à presença de depósitos ou inclusões proteicas intra e extracelulares (Taniguchi et al., 2004). Apesar das diferenças clínicas apresentadas em cada patologia neurodegenerativa (como vulnerabilidade seletiva dos neurônios, envolvimento de genes distintos, fatores ou eventos

desencadeantes, etc.), vários estudos tem demonstrado uma grande similaridade nos mecanismos moleculares de degeneração (para revisão ver Everse e Coates, 2009), sendo a disfunção mitocondrial uma das primeiras anormalidades observadas (Chin et al., 2008).

Além disso, as doenças relacionadas ao envelhecimento estão associadas com a coexistência de doenças metabólicas crônicas, incluindo, doenças cardiovasculares, inflamatórias, infarto e DM (Lipton et al., 2007). Neste sentido, uma das principais consequências da persistente hiperglicemia característica do DM no sistema nervoso central está relacionada com um fenômeno definido como neurotoxicidade da glicose (Mann et al., 1993). As células neuronais possuem uma alta demanda metabólica e um grande requerimento de energia, visto que estas são células altamente diferenciadas e que necessitam, portanto, de grandes quantidades de ATP para a correta manutenção dos gradientes iônicos transmembrana e para os processos de neurotransmissão (German et al., 1987). Dessa forma, a utilização de glicose pelas células do sistema nervoso central (SNC) é essencial para assegurar a sobrevivência celular, visto que a reserva energética cerebral, o glicogênio, é extremamente pequena ( $3-5 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido), em condições de normoglicemia (Rowland, 1998). Assim, o funcionamento adequado do SNC requer o suprimento contínuo de glicose desde a circulação periférica e, devido ao fato que os transportadores de glicose das células neurais não dependem de insulina para a captação de glicose, o conteúdo de glicose intracelular é um reflexo das concentrações de glicose sanguínea. No entanto, a persistência de altas concentrações de glicose no interior das células neurais, induz à condição de neurotoxicidade da glicose (Mann et al., 1993), processo este que está relacionado com a ativação de quatro mecanismos principais citados anteriormente (*ver sessão 1.3*), incluindo o aumento do fluxo da via do poli-ol, aumento do fluxo da via das hexosaminas, ativação da PKC e aumento na concentração de AGEs (Brownlee, 2005).

### **1.6.2 Doenças neurodegenerativas e a relação com a dor neuropática e o DM**

Outra característica das doenças neurodegenerativas é o aparecimento da dor. A dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desconfortável associada com dano tecidual atual ou potencial. A detecção de estímulos nocivos químicos, mecânicos e térmicos é mediada por receptores especializados nos neurônios sensoriais ou nociceptores, terminações nervosas responsáveis pela

percepção da dor (Lee et al., 2005). Frequentemente, danos teciduais levam à liberação de aminoácidos excitatórios, ex. glutamato, prótons, peptídeos, lipídeos e citocinas, os quais agem em receptores específicos e/ou canais iônicos, provocando a ativação de várias cascatas de transdução de sinais (Sawynok, 2003).

Os nociceptores sensoriais podem ser sensibilizados por inflamação prolongada ou injúria no nervo, provocando sensações dolorosas anormais, como hiperalgesia ou alodinia. Hiperalgesia caracteriza-se por sensibilidade aumentada à dor, e alodinia, a dor em resposta a estímulos não dolorosos, e ambas são características clínicas comuns em pacientes com dor crônica (Loeser e Treede, 2008). Os estados de dor crônica, por exemplo, inflamatória ou neuropática, diferenciam-se das condições de dor aguda, devido ao fato de se desenvolver por uma disfunção ou dano ao sistema nervoso central ou periférico, e persistir por dias, meses, ou até anos após a injúria do nervo (Zimmermann, 2001; Loeser e Treede, 2008; Somers e Clemente, 2009).

A dor neuropática central normalmente resulta de injúria na medula espinhal, infarto ou esclerose múltipla (Ducreux et al., 2006). Por outro lado, a dor neuropática periférica resulta de lesões no sistema nervoso periférico, as quais podem ser causadas por trauma mecânico, químicos neurotóxicos, infecções, e numerosas patologias de curso crônico, incluindo as doenças neurodegenerativas do envelhecimento, câncer, doenças cardiovasculares, doenças reumáticas e diabetes mellitus (Woolf e Mannion, 1999; Dworkin et al., 2003).

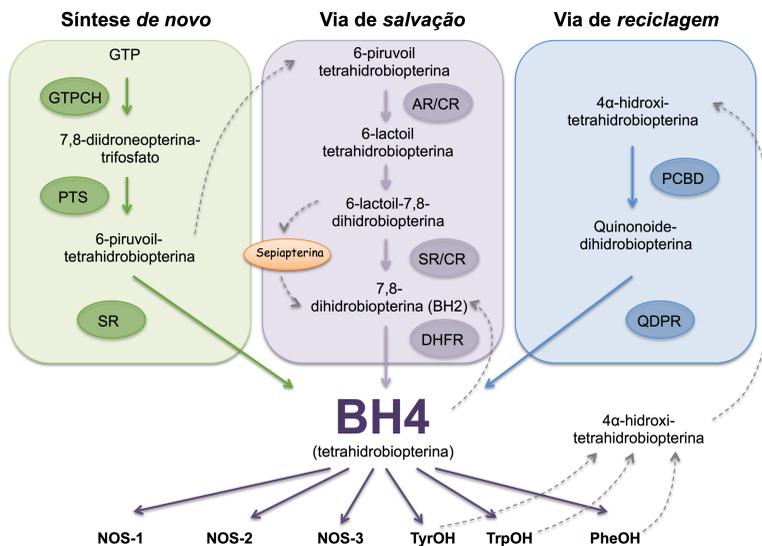
Neste sentido, a dor neuropática é uma condição neurodegenerativa que envolve aproximadamente 50% das pessoas acometidas pelo DM (Wild et al., 2004; Yang et al., 2010). É caracterizada por sensações de ardência e “agulhadas”, as quais se intensificam nos períodos noturnos e impedem o sono dos pacientes (Uccioli et al., 1995). É considerada um fator de risco para o desenvolvimento de ulcerações nos pés e infecções, por isso está muito relacionada com eventuais amputações dos membros inferiores (Cheer et al., 2009). Contudo, os mecanismos envolvidos na etiologia e patogênese dos sintomas dolorosos induzidos pela dor neuropática não estão completamente elucidados. Alguns estudos reportam o envolvimento do aumento no fluxo da via do polioli, microangiopatia do nervo, baixa disponibilidade de alguns fatores de crescimento, estresse oxidativo, entre outros (Zochodne, 2007; Tomlinson e Gardiner, 2008a; Obrosova, 2009), mas atualmente esta condição é considerada progressiva e irreversível (Obrosova, 2009).

Por muitos anos, cientistas tem procurado por mensageiros químicos que agem como mediadores na via de sinalização indutora da sensação de dor. Neste sentido, tem se dado grande importância a molécula 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4), e seu envolvimento nos processos de nocicepção (Tegeeder et al., 2006). A BH4 é cofator obrigatório para a atividade biológica das enzimas fenilalanina hidroxilase, tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase (Kaufman, 1963), e também de todas as isoformas da óxido nítrico sintase (NOS; NOS-1 ou neuronal, NOS-2 ou induzível, NOS-3 ou endotelial), enzimas que participam na biossíntese de neurotransmissores (Mayer et al., 1990; Werner et al., 1998). A NOS é responsável pela produção de óxido nítrico (ON), o qual está envolvido em processos de inflamação, carcinogênese, envelhecimento e neurotoxicidade, em condições em que sua produção é persistente e descontrolada (Weinberg, 1998).

A molécula BH4 é sintetizada por três vias (Figura 8). A biossíntese *de novo* da BH4 ocorre a partir de guanosina trifosfato (GTP) e requer a participação de três enzimas. A primeira, GTP ciclohidrolase (GTPCH), converte o GTP em 7,8-dihidroneopterina trifosfato. Este composto é posteriormente convertido em 6-piruvoil tetrahidrobiopterina pela enzima 6-piruvoil tetrahidrobiopterina sintase (PTS) e, finalmente, a sepiapterina redutase (SR) catalisa a conversão de 6-piruvoil tetrahidrobiopterina em BH4 (Thony et al., 2000). A BH4 pode ser produzida também através de uma *via de reciclagem*, onde a molécula de BH4 cede um par de elétrons para alguns aminoácidos (fenilalanina, tirosina e arginina), e concomitantemente é oxidada em 7,8-dihidrobiopterina (BH2), a qual é reciclada em BH4 a partir da enzima quinonoide dihidrobiopterina redutase (QDPR) e/ou dihidrofolato redutase (DHFR) (esta agindo principalmente no fígado) (Thony et al., 2000; Longo, 2009).

Em condições fisiológicas, o metabolismo da BH4 é enzimaticamente regulado para manter o adequado balanço homeostático desta molécula. Algumas doenças mutifatoriais de curso crônico, como por exemplo aterosclerose e o DM, apresentam um comprometimento nas concentrações intracelulares de BH4 (Channon, 2004). Além disso, mutações genéticas nas enzimas que participam do metabolismo da BH4, geralmente levam a diminuição na concentração de aminas biogênicas, como por exemplo a serotonina no líquido cefalorraquidiano e, em alguns casos, ao aumento nas concentrações de fenilalanina, síndrome conhecida como hiperfenilalaninemia ou fenilcetonúria (Thony e Blau, 2006). Neste sentido, a deficiência de serotonina, norepinefrina e/ou dopamina e ainda altas concentrações de

fenilalanina no cérebro durante o desenvolvimento, podem ocasionar distúrbios cognitivos, como retardo mental (Neville et al., 2005; Longo, 2009) e ainda desordens motoras, como distonia e tremores (Nagatsu e Ichinose, 1996; Furukawa et al., 1998).



**Figura 8. Vias de síntese da tetrahydrobiopterina (BH4).** A BH4 pode ser sintetizada por três vias metabólicas distintas, a via de síntese *de novo*, a *via de salvação* e a *via de reciclagem*. GTP: guanosina trifosfato, GTPCH: GTP ciclohidrolase, PTS: 6-piruvil tetrahydrobiopterina sintase, SR: sepiapterina redutase, AR: aldose redutase, CR: carbonil redutase, DHFR: dihidrofolato redutase, PCBD: pterina-4α-carbinolamina desidratase, QDPR: quinonoide-dihidrobiopterina redutase, NOS-1: óxido nítrico sintase neuronal, NOS-2: óxido nítrico sintase induzível, NOS-3: óxido nítrico sintase endotelial, TyrOH: tirosina hidroxilase, TrpOH: triptofano hidroxilase e PheOH: fenilalanina hidroxilase (Adaptado de Costigan et al., 2012).

No entanto, a deficiência de SR é uma doença autossômica recessiva (Bonafe et al., 2001) que apresenta distúrbios mentais, posturais, de movimento (Blau et al., 2001) e ainda distúrbios do sono (Leu-Semenescu et al., 2009), e a diferença de todas as outras alterações metabólicas acima descritas, é que não cursa com hiperfenilalaninemia

(Bonafe et al., 2001). Este fato levou ao descobrimento de uma nova via de produção de BH4 denominada de *via de salvação* (Figura 8). Nesta via, a 6-piruvil tetrahydrobiopterina pode ser transformada por um grupo de enzimas inespecíficas denominadas de aldoses / carbonil redutases ou pela sepiapterina redutase, em intermediários instáveis (1'-hidroxi-2'-oxo tetrahydropterina ou também chamado de 6-lactoil tetrahydropterina) que favorecem a formação direta de BH4 ou a formação não enzimática de sepiapterina, e desta em BH2 que será convertida em BH4 pela DHFR (Blau et al., 2001).

Neste contexto, muitos estudos vem demonstrando a relação entre o desenvolvimento da dor inflamatória e neuropática com um aumento na produção de BH4. Lötsch e colaboradores (2007) demonstraram a existência de um polimorfismo em seres humanos, o qual regula a enzima GTPCH e modula as concentrações de BH4 em resposta a dor crônica. O efeito deste haplótipo é dependente do tipo de dor. Por exemplo, a dor nociceptiva é menos alterada do que a dor inflamatória, sendo a dor neuropática a mais afetada. Segundo Tegender e colaboradores (2006), ratos acometidos por inflamação e injúria do nervo ciático, apresentam um aumento na síntese de BH4 em neurônios sensoriais. Ainda, o bloqueio na síntese de BH4 através da inibição das enzimas responsáveis pela sua síntese, GTPCH e/ou SR, causam diminuição da nocicepção tanto inflamatória como neuropática. Em contraste, a administração intratecal de BH4 em animais sadios causa aumento na sensibilidade a dor inflamatória e neuropática.

Em contrapartida, em condições de estresse oxidativo decorrente do estado de hiperglicemia crônica há uma diminuição nas concentrações de BH4 em células endoteliais (Meininger et al., 2000; Ding et al., 2004; Xu et al., 2007), visto que esta molécula é oxidada em BH2. A BH2, a qual não possui atividade de cofator, é estruturalmente semelhante à BH4 e por isso possui afinidade no sítio de ligação da NOS-3, permitindo-lhes competir pela ligação na enzima (Landmesser et al., 2003; Crabtree e Channon, 2011). Como consequência, o acoplamento de BH2 com a NOS-3 gera a produção do ânion superóxido concomitante com a formação de ON, agravando o estresse oxidativo e causando disfunção endotelial (Channon, 2004), fenômeno este conhecido como “desacoplamento da NOS-3” (Vasquez-Vivar et al., 1998; Crabtree e Channon, 2011; Kietadisorn et al., 2012). Neste contexto, a relação BH4/BH2 diminui em vários tecidos em condições de DM, sendo um indicativo do comprometimento da NOS-3 (Shankar et al., 2000; Duplain et al., 2001).

## 1.7 EPIGENÉTICA E O DM

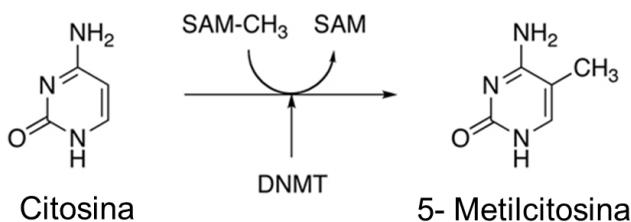
Estudos clínicos com mais de 6.000 pacientes examinados durante vinte anos demonstraram que o melhor controle glicêmico poderia evitar as complicações tanto micro quanto macrovasculares causadas pelo DM (Nathan et al., 2005; Ihnat et al., 2006; Ceriello et al., 2009). Também foi observado que os efeitos deletérios causados pela hiperglicemia são vistos logo nos primeiros anos da doença e podem persistir por um longo período, ainda que os níveis glicêmicos estejam controlados (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993; The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, 2008). Neste cenário, como citado anteriormente, surge o conceito de “memória metabólica”, onde a hiperglicemia como consequência da falha na sinalização da insulina induziria efeitos deletérios de longa duração, os quais não poderão ser revertidos a menos que o controle glicêmico seja iniciado nos estágios mais precoces da doença (Nathan et al., 2005; Ihnat et al., 2006; Ceriello et al., 2009). Estas alterações nas fases iniciais do DM parecem estar relacionadas com mudanças epigenéticas favorecendo a modulação patológica da expressão de determinados genes (Kuroda et al., 2009), provocando desta forma danos irreversíveis no organismo mesmo que a glicemia seja controlada.

O termo epigenética foi introduzido primeiramente por Conrad Waddington no ano de 1940 para descrever as interações dos genes com o ambiente e sua responsabilidade pela expressão do fenótipo. Assim, o termo epigenética se refere a mudanças na expressão gênica herdadas, mitótica ou meioticamente, as quais não envolvem mudanças na sequência de DNA (Jirtle e Skinner, 2007). A complexa interação entre as variadas formas de controle epigenético deu origem ao termo “código epigenético”, que por sua vez modula o “*código genético*” em resposta a estímulos endógenos e/ou ambientais (Sawan et al., 2008).

Assim, a correta manutenção do “código epigenético” representa um importante mecanismo na manutenção do perfil da expressão gênica celular, durante sucessivas mitoses ou ainda, entre várias gerações. Por outro lado, um desequilíbrio do mecanismo epigenético pode promover o desenvolvimento de um fenótipo anormal e ainda o aparecimento de eventos genéticos, como por exemplo, quebras da dupla fita de DNA, mutação e instabilidade cromossômica que podem contribuir para o aparecimento de inúmeras desordens (Sawan et al., 2008). Entre os vários mecanismos epigenéticos conhecidos até o momento, pode-se destacar as modificações pós-

tradicionais das histonas, os RNAs não codificantes e a metilação de citosinas que precedem guanina no DNA, sendo a metilação do DNA uns dos mais estudados (Tost, 2010).

A metilação do DNA consiste em uma modificação covalente onde um grupamento metil ( $\text{CH}_3$ ) é transferido da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5' de uma citosina, formando a 5-metilcitosina (5-meC) pela ação de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMT) (Sawan et al., 2008) (Figura 9).



**Figura 9.** Esquema representativo da conversão do nucleotídeo citosina para 5-metilcitosina por ação de DNA metiltransferases (DNMT) (Gibney e Nolan, 2010).

Em organismos eucariotos, a metilação do DNA ocorre predominantemente em regiões repetitivas do genoma que possui abundância de resíduos dinucleotídeos CpG (citosina que precede uma guanina). Por outro lado, eventos de metilação em sítios não CpG são observados em células tronco embrionárias (Scarano et al., 2005; Klose e Bird, 2006). Em geral, os dinucleotídeos CpG são relativamente raros no genoma dos mamíferos, e ocorrem normalmente em regiões densas chamadas ilhas CpG. Estas regiões variam entre 0,5 kb e 4 kb em comprimento, e são encontradas principalmente em regiões promotoras de genes funcionais (Johnson e Belshaw, 2008). Aproximadamente 88% das regiões promotoras ativas estão associadas com sequências ricas em CpG, assim estas podem ser reguladas por eventos de metilação do DNA (Tost, 2010). As ilhas CpG associadas tanto aos genes de manutenção como aos genes tecido específico, não se encontram metiladas em qualquer estágio de desenvolvimento, exceto, quando associadas a genes sujeitos a inativação do cromossomo X e certos genes de *imprinting* (Shen et al., 2007). Entretanto, existem sequências genômicas repetitivas em células normais que são densamente metiladas

para proteger a integridade do cromossomo, evitando a reativação de elementos transponíveis também chamados de *transposons* (Mulero-Navarro e Esteller, 2008).

### **1.7.1 Metilação do DNA e sua relação com o DM e doenças neurodegenerativas**

Nos últimos anos, tem sido proposto que alterações no padrão de metilação na região do gene promotor da insulina estaria relacionada com alterações na regulação da transcrição gênica nas células  $\beta$  pancreáticas. Estas alterações parecem ainda estar intimamente relacionadas com os mecanismos patofisiológicos do DM (Kuroda et al., 2009; Todd, 2010; Fradin et al., 2012).

Neste sentido, a metilação do DNA é uma das principais modificações epigenéticas que controlam a expressão de genes em estados fisiológicos e patológicos. Estas alterações no perfil de metilação do DNA podem ocorrer durante o envelhecimento e em estados patológicos como no câncer e doenças metabólicas, como é o caso do DM (El-Osta et al., 2008; Barres e Zierath, 2011). Nestes casos, geralmente é observado uma hipometilação global concomitante com a hipermetilação de algumas ilhas CpG distribuídas em sequências repetitivas, bem como em alguns genes transcricionalmente relevantes (Fraga et al., 2005). Como consequência, a hipometilação genômica desencadeia uma instabilidade cromossômica, permitindo a ocorrência de mutações mais facilmente, e a superexpressão de protooncogenes. Além disso, a hipermetilação gene-específica pode levar ao silenciamento de muitos genes responsáveis pelo controle do ciclo celular, causando apoptose (Burzynski, 2005).

Neste cenário, cerca de 55% do genoma humano é constituído por elementos repetitivos (Lander et al., 2001). O elemento repetitivo LINE-1 é uma sequência repetitiva que está dispersa ao longo de aproximadamente 17% do todo genoma humano, com aproximadamente 500.000 repetições (Cordaux e Batzer, 2009). Devido a alta representação em todo o genoma e a forte metilação em tecido normal, o LINE-1 tem sido utilizado como um marcador substituto para a estimativa dos níveis de metilação do DNA global (Yang et al., 2004; Shen et al., 2007). Entretanto, eventos de hipometilação nestes elementos transponíveis do genoma estão diretamente associados a uma maior instabilidade genômica, bem como alterações ou desregulação da

expressão gênica, permitindo a ocorrência de mutações mais facilmente (Burzynski, 2005).

Ainda, estudos recentes apontam o fator de transcrição silenciador do elemento 1 (REST) como um fator protetor de neurônios durante o envelhecimento (Schoenherr and Anderson, 1995; Ballas et al., 2005; Lu et al., 2014). Este fator de transcrição é um repressor de genes neuronais expresso durante o desenvolvimento embrionário. Após este período, a expressão de REST é silenciada e permanece nestas condições durante toda a fase adulta. Estudos recentes de Lu e colaboradores (2014) apontam que durante o envelhecimento, o REST é novamente expresso e está muito associado com a preservação de funções cognitivas e o aumento da longevidade, sendo considerado um “fator protetor de neurônios”. Estas evidências estão baseadas em estudos que demonstraram que pacientes idosos acometidos pela doença de Alzheimer apresentam uma deficiência deste fator de transcrição em relação a pacientes idosos que não possuem alguma doença neurodegenerativa comprovada. Dessa forma, o estado de ativação de REST, durante o envelhecimento, poderia distinguir fenômenos de neuroproteção e/ou de neurodegeneração no cérebro (Lu et al., 2014).

Contudo, condições de resistência à insulina e/ou síndrome metabólica, obesidade e DM, podem ser responsáveis pelo comprometimento cognitivo moderado em pacientes acima de 45 anos, aumentando o risco de desenvolver DA, e também contribuindo para a aparição e o agravamento dos sintomas da DP (Cereda et al., 2012), sendo que a gravidade destas complicações depende do tempo da existência do DM e principalmente da qualidade do controle glicêmico, visto que pequenos picos de glicose sanguínea estariam contribuindo para as alterações epigenéticas (Gispén e Biessels, 2000). Em função disso, pacientes que apresentam DM e DP demonstram um alto risco de demência, acelerando a progressão de sintomas motores e cognitivos (Schwab, 1960; Figlewicz et al., 1996; Schernhammer et al., 2011). Por outro lado, aproximadamente 50% dos pacientes afetados pela DP apresentam DM, hiperinsulinemia ou tolerância diminuída à glicose (Barbeau et al., 1961; Boyd et al., 1971; Lipman et al., 1974) e pacientes portadores de DM2 possuem um risco de 36% de desenvolver DP (Hu et al., 2007; Xu et al., 2011). Desta forma, parece existir uma forte relação entre hiperglicemia crônica e a predisposição ao desenvolvimento das doenças neurodegenerativas. Esta forte relação se deve a perda da solubilidade e agregação proteica, aumento na formação de AGEs e o desenvolvimento de estresse oxidativo e inflamação, aumento na glicação de proteínas chaves do metabolismo e, principalmente, às

alterações epigenéticas (Sandyk, 1993; Pressley et al., 2003; Holscher e Li, 2010; Munch et al., 2012).

Neste cenário, hipotetizamos que durante condições de hiperglicemia crônica, proteínas chaves no metabolismo energético seriam alvos celulares dos oxidantes, MG e/ou AGEs acumulados em pacientes com DM, criando dessa forma, um cenário propício de déficit energético e mudanças epigenéticas, contribuindo para o desenvolvimento de alterações cognitivas, maior predisposição à dor e/ou doenças neurodegenerativas, em particular a DP.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a predisposição ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e/ou neurológicas durante o estado de hiperglicemia crônica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o efeito da hiperglicemia crônica induzida pela administração de STZ sobre parâmetros do metabolismo energético, oxidativo, alterações epigenéticas e de inflamação no SNC; bem como parâmetros comportamentais e marcadores de neurodegeneração em ratos Wistar adultos e o efeito da normalização da glicemia através da administração de INS exógena;
- 2) Avaliar o efeito *in vitro* do oxidante MG sobre a fisiologia mitocondrial na linhagem celular H19-7 (células precursoras de hipocampo) de rato e/ou em cultura primária de astrócitos corticais de rato;
- 3) Investigar biomarcadores metabólicos relacionados com parâmetros de bioenergética, estresse oxidativo e inflamação em pacientes portadores de Diabetes Mellitus do tipo I e Doença de Parkinson;
- 4) Caracterizar o efeito da modulação da via metabólica da BH4 como ferramenta para reduzir a hipersensibilidade à nocicepção.

### 3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Embora o DM represente um dos principais problemas de saúde pública, tanto em número de pessoas afetadas quanto na incapacidade para o trabalho, ainda pouco se sabe sobre os efeitos da hiperglicemia crônica sobre o SNC e os mecanismos que levam os pacientes a apresentar maior disposição ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e/ou neurológicas, como a doença de Alzheimer e, principalmente a doença de Parkinson.

Neste sentido, sabe-se que a incidência das patologias neurodegenerativas parece ser maior nos indivíduos portadores do DM, e que a maior parte dos pacientes afetados pela DP que apresentam demência, são resistentes à insulina. Interessantemente, os pacientes portadores tanto do DM quanto da DP parecem apresentar sintomas motores mais graves. Contudo, existem várias evidências de que o DM está intimamente relacionado com a progressão da DP, e que estas duas doenças compartilham mecanismos comuns a níveis celulares e moleculares.

Assim, acredita-se que conhecendo os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nestas enfermidades, será possível tomar medidas preventivas mais efetivas ou desenvolver meios terapêuticos mais eficazes para que consigam prevenir ou atenuar as complicações decorrentes destas patologias crônicas. Além disso, o tratamento mais efetivo trará benefícios socioeconômicos inestimáveis que entendemos, melhorarão a qualidade de vida dos pacientes, bem como a de seus familiares.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

#### 4.1.1 Material e métodos referentes ao modelo experimental de hiperglicemia

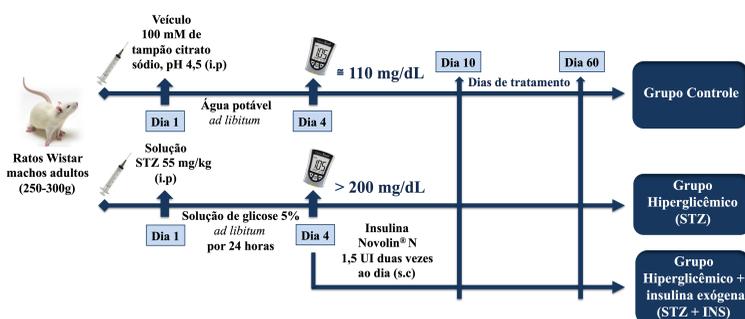
##### 4.1.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 60 dias de vida pesando entre 250-350g provindos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, Brasil. Os animais foram aclimatados no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da mesma Universidade, com temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Estes foram mantidos em caixas de plástico individuais, com livre acesso à água e à ração comercial para roedores (Nuvital/PR, Brasil), com exceção dos períodos em que os ratos deveriam permanecer em jejum (6 horas), para as mensurações relacionadas à glicose sanguínea. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA (PP000350/CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, e foi realizado de acordo com o “Guia de Princípios para o uso de Animais em Toxicologia” adotado pela sociedade de toxicologia em julho de 1989. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

4.1.1.2 Modelo Experimental de DM: Indução de hiperglicemia crônica através da administração intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ)

A hiperglicemia foi induzida por uma única injeção i.p. de 55 mg/kg de STZ diluída em tampão citrato de sódio (pH 4,5), após um período de jejum de 14 horas. Controles foram executados em paralelo, os quais receberam somente a injeção i.p. de veículo (tampão citrato de sódio, pH 4,5, grupo controle). Após a administração de STZ, os ratos receberam para beber água contendo glicose a 5% durante 24 horas, a fim de evitar morte por hipoglicemia. Quatro dias após a administração de STZ (ou veículo), com jejum prévio de 6 horas, as concentrações de glicose no sangue foram avaliadas utilizando-se um glicosímetro (Optium™ Xceed, Abbot, EUA). Os animais com concentração de glicose sanguínea superior a 200 mg/dL (11 mmol/L) foram

considerados hiperglicêmicos, e foram divididos em dois grupos, o grupo STZ, em que os animais permaneceram hiperglicêmicos durante 10 e/ou 60 dias, e o grupo STZ + INS, em que os animais receberam por via subcutânea (s.c.) 1,5 UI de insulina Novolin<sup>®</sup> N (Novo Nordisk Laboratories, Princeton, NJ, EUA), duas vezes ao dia durante 10 e/ou 60 dias, a fim de normalizar os níveis de glicose no sangue, como indicado no Esquema 1. De modo a assegurar o estrito controle glicêmico exercido pela insulina, os níveis de glicose no sangue foram analisados quinzenalmente (Remor et al., 2011).



**Esquema 1.** Desenho experimental. Desenvolvimento de hiperglicemia pela administração de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar adultos. Para detalhes, ver Material e Métodos.

#### 4.1.1.3 Testes comportamentais

As avaliações comportamentais foram realizadas em colaboração com o Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) do Departamento de Farmacologia da UFSC, coordenado pelo Prof. Rui Daniel S. Prediger.

##### 4.1.1.3.1 Caixa de atividade

Para avaliar alterações locomotoras induzidas pelos diferentes tratamentos utilizados, os animais foram submetidos a uma caixa de madeira medindo 70 x 30 x 22 cm, seguindo o protocolo descrito por Prediger e colaboradores (2007). Esta caixa apresenta três células

fotoelétricas instaladas a 3 cm de altura do chão em grade, espaçadas igualmente ao longo de sua extensão e acopladas a um contador digital que registra o número de vezes que o animal interrompe os feixes de luz (cada interrupção do feixe de luz constitui em uma medida de atividade). Desta forma, somente os movimentos horizontais dos animais foram detectados pelas fotocélulas durante durante um período de 30 minutos, com medidas de atividade a cada 5 minutos.

#### *4.1.1.3.2 Teste comportamental da esquiwa inibitória*

O teste da esquiwa inibitória foi realizado em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm. Todo o chão do aparelho é gradeado com barras metálicas com 1 mm de diâmetro, espaçadas 1 cm entre elas. Uma plataforma em acrílico com 10 cm<sup>2</sup> de superfície e 2 cm de altura está posicionada na lateral do aparelho. O animal foi posto sobre a plataforma e a latência de descida foi cronometrada, correspondente às 4 patas na grade. Na sessão de condicionamento (treino), após a descida, o animal recebeu um leve choque nas patas (0.3 mA) durante 2,0 segundos. Posteriormente, cada animal foi reexposto ao aparato 1,5 e 24 horas, sem a presença do choque nas patas, para avaliação de memória de curta e de longa duração (Roesler et al., 1999).

#### *4.1.1.3.3 Teste comportamental do labirinto aquático de Morris*

O labirinto aquático de Morris consiste em um tanque circular de cor preta (1,7 m de diâmetro e 80 cm de altura), localizado no interior de uma sala com várias pistas visuais fixadas nas paredes. O tanque foi preenchido com água até a altura de 60 cm, sendo a temperatura da água mantida à temperatura constante (25±2°C) através de um sistema automatizado de resistências. Foram estabelecidas 4 posições de partida (Norte, Sul, Leste e Oeste) que dividiam a superfície do labirinto em 4 quadrantes (Nordeste, Noroeste, Sudeste e Sudoeste). Os animais foram submetidos a 4 treinos no labirinto aquático (durante um único dia). Em cada treino os animais foram liberados de pontos de partida diferentes de forma pseudoaleatória para encontrar a plataforma, que permaneceu submersa na mesma posição (Sudeste) durante todo o treinamento. No dia do teste (48 h após o treinamento), repetiu-se o procedimento do dia de treinamento e o animal foi liberado para nadar até encontrar a plataforma ou até um tempo máximo de 60s. Caso o animal não

encontrasse a plataforma nesse tempo, ele era levado manualmente até a plataforma onde permanecia por 10 s. O tempo de latência até o animal encontrar a plataforma foi registrado. Após os 10s, o animal foi retirado da plataforma e colocado em uma caixa fora do labirinto aquático por 20s, sendo que em seguida ele era colocado no próximo ponto de partida. Uma câmara de vídeo foi empregada para capturar as imagens durante o experimento para posterior análise em sistema computadorizado (Castro et al., 2013).

#### *4.1.1.3.4 Teste comportamental do labirinto em cruz elevado*

O teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliar o comportamento ansiolítico dos animais. O aparato consiste de um labirinto de madeira recoberto por fórmica preta composto de dois braços abertos (50 x 10 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) com paredes forradas de preto, elevados a 60 cm do solo por um suporte de madeira, modificado de Lister (1987). O animal é colocado no centro do aparato voltado para um dos braços fechados sendo permitido explorar livremente o aparato durante 5 min. O número de entradas (definida pela colocação das quatro patas num braço) e o tempo de permanência gasto nos braços abertos e fechados foram registrados. A porcentagem do número de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência nos braços abertos, foram calculados pelo número de entradas nos braços abertos dividido pelo número total de entradas nos braços (Cruz et al., 1994).

#### *4.1.1.4 Parâmetros bioquímicos*

Para a mensuração das atividades enzimáticas dos complexos da cadeia respiratória, creatinaquinase, hexoquinase e do consumo de oxigênio, o cérebro e os tecidos periféricos (fígado, músculo cardíaco, músculo esquelético e rim), foram homogeneizados em dez volumes de tampão fosfato de potássio 5mM, pH 7,4, contendo sacarose 300 mM, MOPS 5 mM, EGTA 1 mM e albumina sérica bovina 0,1%. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 3.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 17.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso no mesmo tampão utilizado no processo de homogeneização, constituindo uma suspensão rica em mitocôndrias com

uma concentração proteica de aproximadamente 20 mg/mL (Latini et al., 2005). Para a mensuração da atividade da CK, esta fração mitocondrial foi lavada duas vezes com tampão Tris 10 mM, pH 7,5, contendo sacarose 0,25 M e posteriormente suspensa em tampão Tris 100 mM, pH 7,5, contendo  $MgSO_4$  9 mM (Hughes, 1962).

#### *4.1.1.4.1 Mensuração da atividade das enzimas da cadeia respiratória*

A atividade do complexo I foi mensurada através da redução do ferricianeto dependente de NADH em um comprimento de onda de 420 nm, como previamente descrito por Cassina e Radi (1996). A atividade do complexo II foi mensurada através da oxidação do DCIP em 600 nm, de acordo com Fischer e colaboradores (1985). O complexo IV foi determinado pela mensuração da oxidação do citocromo c lido a 550 nm (Rustin et al., 1994). A atividade do complexo V foi medido através da eficiência da atividade da ATP sintase mitocondrial, de acordo com Cassina e Radi (1996). Todos os métodos citados acima foram aperfeiçoados e modificados por Latini e colaboradores (2005). As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram mensuradas utilizando-se o espectrofotômetro Varian Cary 50 com temperatura controlada (Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) e calculadas como  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína.

#### *4.1.1.4.2 Mensuração da atividade da creatinaquinase*

A atividade da creatinaquinase foi mensurada em homogenato e preparações mitocondriais de cérebro e tecidos periféricos baseada na formação de creatina de acordo com o método colorimétrico de Hughes (1962), com modificações previamente descritas por Glaser e colaboradores (2010). Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol}$  de creatina formada  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína.

#### *4.1.1.4.3 Mensuração da atividade da hexoquinase*

A atividade da hexoquinase foi determinada em preparações mitocondriais utilizando o ensaio enzimático acoplado a atividade da G6PDH, monitorando indiretamente a atividade da hexoquinase pela

formação de NADH no comprimento de onda de 340 nm. A reação foi iniciada pela adição de ATP de acordo com Galina e colaboradores (1995). Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína.

#### 4.1.1.4.4 Mensuração do consumo de oxigênio mitocondrial

A análise de respiração mitocondrial de preparações mitocondriais foi realizada em um oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k Oroboros<sup>®</sup> Instruments, Innsbruck, Áustria), a 37°C, com *chambers* contendo 2 mL. Os ensaios foram realizados utilizando-se 0,1 mg / mL de proteínas mitocondriais com o mesmo tampão utilizado para a preparação de isolado mitocondrial. A análise de respiração mitocondrial nas células precursoras de hipocampo (H19-7) foi realizada no Seahorse X-24 Analyser, Massachusetts, USA, em um meio de reação contendo glutamina 100 mM e glicose na concentração de 7 mg/mL, a 37°C. Os parâmetros avaliados em ambos os equipamentos foram os seguintes:

- 1) Respiração basal: Mensurado através do consumo de oxigênio, sem a adição de substratos ou inibidores de respiração;
- 2) Produção de ATP (Estado IV de respiração mitocondrial): Este estado respiratório está representado pelo consumo de oxigênio ocasionado pela transferência de elétrons através da cadeia respiratória. Neste estado não há síntese de ATP e experimentalmente é analisado o consumo de oxigênio após adicionar oligomicina no meio. A oligomicina é um inibidor da subunidade F<sub>0</sub> da ATP sintase ou complexo V. O efeito induzido por esta inibição é caracterizado por uma marcada redução no consumo de oxigênio (Nelson e Cox, 2004);
- 3) Respiração máxima: Este parâmetro representa o consumo de oxigênio observado após adicionar o desacoplador mitocondrial FCCP (carbonilcianeto-4-trifluorometoxifenil-hidraxona). Este composto desacopla a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa por dissipar os prótons que formam o gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial (Nelson e Cox, 2004). Este parâmetro indica a capacidade máxima mitocondrial em transferir elétrons (Gnaiger, 2001);

- 4) Produção de EROs extramitocondrial: Indica o consumo de oxigênio não proveniente da respiração mitocondrial, representado pela redução incompleta do oxigênio em espécies reativas. A produção de EROs é observada após adicionar rotenona, que inibe o complexo I da CR, e antimicina A, inibidor do complexo III. Desta forma, com a cadeia transportadora de elétrons inibida, o oxigênio que está sendo consumido não é devido a passagem de elétrons pela CR (Gnaiger, 2001);
- 5) Capacidade de controle respiratório (RCR; respiração máxima / estado IV): Índice utilizado para determinar a contribuição dos diferentes estados respiratórios. É calculado utilizando a respiração máxima e o estado IV da respiração (Sjovall et al., 2010).

#### *4.1.1.4.5 Mensuração de grupamentos tiólicos não proteicos (NPSH)*

Os grupamentos NPSH, representados pela glutatona (90%), foram determinados conforme descrito por Ellman (1959). Uma alíquota de ácido tricloroacético 20% foi adicionada a uma alíquota de mesmo volume de amostra de plasma e centrifugados a  $10.000 \times g$ , durante 10 min, a 4°C. Após, uma alíquota do sobrenadante foi diluída em 800 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,4 e adicionado 500  $\mu\text{M}$  de DTNB (5,5'-ditio bis-2-ácido nitrobenzóico). A absorbância da cor formada foi determinada a 412 nm após 10 minutos. Os resultados foram expressos em  $\eta\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína.

#### *4.1.1.4.6 Mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

O TBARS foi determinado no plasma em uma reação contendo ácido tiobarbitúrico na presença de calor conforme descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). Após incubação a 100°C, a absorbância da cor formada foi determinada a 532 nm. Os resultados foram expressos em  $\eta\text{mol. min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína.

#### *4.1.1.4.7 Mensuração de BH4 em líquido cefalorraquidiano*

A concentração de BH4 foi determinada em líquido cefalorraquidiano previamente precipitado com um volume de TCA 5% contendo 1 mg/mL de DTE e DETAPAC. As amostras foram centrifugadas a 14.000  $\times$  g, durante 10 min, a 4°C. Vinte microlitros do sobrenadante foram utilizados para análise por cromatografia líquida de alta resolução por fase reversa (Alliance, e2695, Waters, Milford, EUA), utilizando-se a fase móvel contendo 50  $\eta$ M de acetato de sódio, 5 mM de ácido cítrico, 48  $\mu$ M de EDTA e 160  $\mu$ M de DTE. A identificação e quantificação foi detectada por um detector eletroquímico (módulo 2465, Waters, Milford, EUA) (Howells et al., 1986).

#### *4.1.1.4.8 Mensuração de neopterinina em plasma*

A determinação de neopterinina foi realizada em plasma previamente precipitado com um volume de TCA 5%. As amostras foram centrifugadas a 14.000  $\times$  g, durante 10 min, a 4°C. Vinte microlitros do sobrenadante foram utilizados para análise por cromatografia líquida de alta resolução por fase reversa (Alliance, e2695, Waters, Milford, EUA) utilizando-se a fase móvel contendo 50  $\eta$ M de acetato de sódio, 5 mM de ácido cítrico, 48  $\mu$ M de EDTA e 160  $\mu$ M de DTE. A identificação e quantificação foi detectada por um detector de fluorescência (módulo 2475, Waters, Milford, EUA) em um comprimento de onda com excitação de 350 nm e emissão de 430 nm (Ormazabal et al., 2005). O tempo de retenção da neopterinina foi de 2,9 minutos em uma corrida com tempo total de 5 minutos. Os valores foram expressos em  $\eta$ mol . L<sup>-1</sup> (de Lucas et al., 2014).

#### *4.1.1.4.9 Mensuração da formação de AGEs*

A formação de compostos de Maillard ou proteínas oxidadas por MG (AGEs) foi determinada conforme descrito por Biemel e colaboradores (2001). O plasma foi diluído 4 vezes em PBS e a detecção dos compostos foi realizada por fluorescência com o comprimento de excitação de 440 nm e de emissão de 370 nm, utilizando o espectrofotômetro de fluorescência (Tecan GmbH M200, Grödig/Salzburg, Austria).

#### 4.1.1.4.10 Análise de proteínas por Western Blot

O córtex cerebral foi homogeneizado em cinco volumes (1:5, v/v) de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0 contendo EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X-100 a 1%, glicerol a 10% e coquetel inibidor de protease [Sigma]). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 *x g*, durante 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi coletado e diluído em 1 volume (1:1, v/v) de tampão Tris 100 mM, pH 6,8 contendo EDTA 4 mM e SDS a 8%. Após, as amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos e o tampão de diluição (Tris 100 mM, com 40% de glicerol e azul de bromofenol, pH 6,8), numa proporção 25:100 (v/v), e β-mercaptoetanol (na concentração final de 8%), foram adicionados nas amostras.

As proteínas foram isoladas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio [SDS]) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 10% e gel de entrada a 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 150 mV durante aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e transferidos para membranas de nitrocelulose usando um sistema *semi-dry* (1,2 mA/cm<sup>2</sup>; 1,5 h) como descrito por Bjerrum e Heegaard (1988). Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S.

Após, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). A creatinaquinase foi detectada após incubação *overnight* (4°C) com anticorpo específico para esta proteína diluído em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) na diluição de 1:250 (Santa Cruz Technology). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-coelho (conjugado à peroxidase) e reveladas em filme radiográfico, após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose (LumiGLO), de acordo com as recomendações do fabricante. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti-β-actina (1:2000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas foi aplicada no gel. Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguidos por três lavagens (5 minutos) com TBS-T. As bandas imunorreativas foram quantificadas usando o software Scion Image<sup>®</sup> (Lopes et al., 2012).

#### 4.1.1.5 Parâmetros histológicos

##### *4.1.1.5.1 Imunomarcção para o conteúdo de proteínas oxidadas por MG e caspase-3 na forma clivada*

Após o término dos diferentes tratamentos *in vivo*, os animais foram perfundidos com solução de paraformaldeído 4%. Posteriormente, o cérebro foi removido e imediatamente imerso nesta solução por 24 horas (processo de fixação), e desidratado em série alcoólica crescente (1 hora em cada solução alcoólica: 70%, 80%, 90% e 100%, este último por duas vezes). Posteriormente, as peças foram imersas em solução alcoólica contendo xilol durante vinte minutos, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina em moldes apropriados. Após solidificação, os blocos de parafina foram removidos dos moldes, aparados e acoplados ao micrótomato rotativo. Os cortes foram realizados na espessura de 7  $\mu\text{m}$ . Foi realizada imunofluorescência para verificar o conteúdo de proteínas oxidadas por MG no córtex cerebral, utilizando o anticorpo primário monoclonal anti-metilglioxal (JaICa<sup>®</sup>) em uma diluição de 1:400 e o anticorpo secundário Alexa Fluor 633 anti-camundongo (diluição 1:1000). Para a imunohistoquímica da proteína caspase-3 na forma clivada, foi utilizado o anticorpo policlonal anti-caspase 3 clivada (Cell Signaling<sup>®</sup>) na diluição de 1:400 e o anticorpo secundário biotinizado conjugado com peroxidase. A revelação da marcação foi realizada com DAB (3,3'-diaminobenzidina) (DakoCytomation<sup>®</sup>) e contracorado com hematoxilina de Harris. Os tecidos dos grupos controle e dos grupos STZ e STZ + INS foram colocados na mesma lâmina, dessa forma sendo processados sob as mesmas condições. As imagens foram realizadas nas cinco camadas do córtex em microscópio de fluorescência Olympus modelo BX41 para o conteúdo de proteínas oxidadas por MG e em Eclipse 50i light (Nikon) para a imunohistoquímica da proteína caspase-3 na forma clivada. A análise foi realizada em 5-8 campos aleatórios, através da análise de densidade óptica, utilizando-se o software ImageJ<sup>®</sup>, e os dados foram expressos através da média de densidade óptica.

##### *4.1.1.5.2 Análise da localização subcelular da $\alpha$ -sinucleína por microscopia imunoelétrica*

A localização subcelular da  $\alpha$ -sinucleína no hipocampo foi determinada por microscopia imunoelétrica conforme destrito por

Sabatino e colaboradores (2013). O hipocampo foi embebido em LR-White (London Resin Corporation, Berkshire, UK) e foram realizadas fatias com espessura de 70-90 nm com o auxílio de uma lâmina de diamante no ultramicrotomo JEOL JUM-7 (Nikon, Tokyo, Japan). Após, as fatias foram incubadas com o anticorpo primário anti- $\alpha$ -sinucleína (Proteintech Group, Inc. Chicago, IL, USA. Catálogo número: 10842-1-AP) em uma diluição de 1:50 por um período *overnight*. A imunorreatividade foi marcada com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com partículas de ouro coloidal de 15 nm, em uma diluição de 1:30 (Electron Microscopy Sciences; Hatfield, USA). Para validar a especificidade da imunorreatividade, foram realizados controles negativos utilizando-se BSA 1% m/v no lugar do anticorpo primário. Por fim, os cortes foram contrastados com uma solução aquosa saturada de acetato de uranila e examinadas no microscópio eletrônico Zeiss LEO 906-E, equipado com uma câmera digital Megaview III (Oberkochen, Germany).

#### 4.1.1.6 Parâmetros moleculares

##### *4.1.1.6.1 Determinação da expressão gênica da CK, REST e REST-4 por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR)*

O RNA total foi isolado a partir de córtex cerebral e hipocampo dos grupos controle, STZ e STZ + INS, como indicado pelo fabricante do produto TRI Reagent (Sigma). A concentração e pureza do RNA extraído foram determinadas através de um espectrofotômetro NanoDrop, a 260 nm e a 280 nm. O cDNA foi construído a partir de 1  $\mu$ g de RNA, utilizando-se o kit “M-MLV Reverse Transcriptase” (Sigma). A reação foi realizada em microtubo de 0,2 mL contendo o tampão da enzima M-MLV transcriptase reversa, 0,1 M DTT, RNase OUT, Oligodt, 10 mM dNTP e a enzima M-MLV transcriptase reversa (e quantidade de água suficiente para completar 20  $\mu$ L). Os microtubos foram colocados para reação em um Termociclador Eppendorf, de acordo com o seguinte protocolo: 25°C por 10 minutos, 37°C durante 50 minutos e 4°C por 10 minutos, seguindo as instruções do manual do produto e como descrito previamente por Jiang e colaboradores (2006).

A reação foi realizada utilizando o kit “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), contendo cerca de 10-100 ng de cDNA, em um volume final de 15  $\mu$ L e na presença de 0,3  $\mu$ M de

*primers* dos tipos *forward* ou *reverse*. Foram utilizados *primers* específicos para proteína envolvida no metabolismo energético (CK) e relacionados com epigenética (REST e REST-4), conforme descritos na tabela a seguir:

Proteína	Primer sequência <i>forward</i>	Primer sequência <i>reverse</i>
β-actina	5'GCGTCCACCCGCGAGTACAAC3'	5'CGACGACGAGCGCAGCGATA3'
CK	5'CGACTGGCCGGATGCTCGTG3'	5'GGTGCCAGGTTGGATGGGC3'
REST	5'AGCGAGTACCACTGGAGGAAACA3'	5'AATTAAGAGGTTAGGCCCGTTG3'
REST-4	5'AGCGAGTACCACTGGAGGAAACA3'	5'ATACCCAGCTAGATCACACT3'

**Tabela 1.** Sequência de *primers* utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real

Os *primers* utilizados foram desenhados utilizando o programa “BLAST” disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, de acordo com os exons específicos para cada proteína. As reações foram realizadas num equipamento ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems), instalado no Laboratório Multiusuário de Estudo em Biologia (LAMEB), CCB, UFSC. A reação foi realizada com o seguinte protocolo: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 minutos e 60°C por 1 minuto, como descrito previamente (Jiang et al., 2006). Os resultados foram analisados utilizando o software Sequence Detection Systems versão 2.4. Os dados foram normalizados pela expressão do gene constitutivo β-actina, empregado como padrão (*housekeeping gene*). Os dados foram expressos em conteúdo relativo de mRNA em relação ao grupo controle.

#### 4.1.1.6.2 Determinação do padrão de metilação do DNA

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisadores da Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo e Dr. Rodrigo Augusto da Silva do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

##### a) Obtenção do DNA

As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em tampão de extração contendo 10 mM Tris HCl, 5 mM EDTA, 0,5% SDS, pH 7,8 e armazenadas a -20°C. O DNA genômico (gDNA) foi extraído pela digestão com proteinase K (20 mg/mL), seguida pelo método de

fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Trevilatto e Line, 2000). A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ( $\geq 1,8$ ) e OD 260/230 ( $\geq 1,0$ ) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

#### b) Metilação global do DNA

A metilação global do DNA foi avaliada pela digestão do DNA genômico (gDNA) pelas enzimas *HpaII* e *MspI*, as quais possuem o mesmo sítio de restrição (CCGG). No entanto, apenas a enzima *HpaII* é sensível à metilação da molécula do DNA. As reações de digestão foram realizadas a 37°C por 16 horas contendo 300 ng de gDNA para 1 unidade de enzima em reações separadas. Após o término das digestões, as enzimas foram inativadas por 20 minutos a 65°C e armazenadas a -20°C. Como controle das reações, o gDNA foi incubado juntamente com as digestões das enzimas *HpaII* e *MspI*, mas somente com o tampão da reação enzimática. Para a determinação da porcentagem de metilação global, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo Gel Red. O valor da porcentagem de metilação global das amostras foi determinado pelo resultado obtido entre a diferença de intensidade da banda referente a digestão do gDNA pela enzima *HpaII* (sensível a metilação) e da intensidade da banda referente à digestão da enzima *MspI* (não sensível a metilação), multiplicado por 100 e dividido pela intensidade da banda referente ao gDNA intacto (não digerido) [(DNA digerido pela *HpaII* – DNA digerido pela *MspI*) X 100 / gDNA intacto] (Molognoni et al., 2011). Os valores referentes as intensidades das bandas foram obtidos através de análises densitométricas utilizando-se o software *Scion Image*.

#### 4.1.1.6.3 Determinação da metilação do promotor do REST e LINE-1 pelo método de COBRA

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisadores da Profª. Dra. Ana Paula de Souza Pardo e Dr. Rodrigo Augusto da Silva do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

### a) Transformação por Bissulfito de Sódio

As amostras de gDNA extraídas foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio, utilizando-se o kit comercial MethylSEQR® Bissulfite Conversion (Life, Applied Biosystems), seguindo as especificações do fabricante. O gDNA (300 ng) transformado foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE (pH 7.6) e armazenados a 4 °C.

### b) Amplificação por reação da polimerase em cadeia (PCR)

As reações da polimerase em cadeia foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) com iniciadores específicos para amplificação de DNA transformados por bissulfito de sódio. As reações pré-otimizadas para amplificação da região LINE-1 e do promotor do gene REST foram realizadas com volume total de 25 µL contendo 1 µL de cada iniciador específico a 50 pmoles/µL, 12,5 µL de *Go Taq Green Master Mix* (Promega Corporations, Madison, WI, USA) e 2 µL de gDNA transformado por bissulfito de sódio a aproximadamente 6 ng/µL e água Milli-Q *Rnase free* q.s.p. Para estudo da região LINE-1 foram utilizados as sequências *Forward*: 5'-TTT GGT GAG TTT GGG ATA-3' e *Reverse*: 5'-CTC AAA AAT ACC CAC CTA AC-3' (Tryndyak et al., 2006) e para a região promotora do gene REST, *Forward*: 5'-TGT TTC CGC CAG TGG TAT TCG CT-3' e *Reverse*: 5'-AGC CAC AGC GAT CAC AGC GGA TG-3'; Os parâmetros de ciclagem utilizados para amplificação das amostras foram: desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 30 s, anelamento a 56°C por 1 minuto, extensão por 1 minuto a 72°C e extensão final de 7 minutos a 72°C para a região LINE-1 e desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 45 s, anelamento a 53°C por 45 s, extensão por 45 s a 72°C e extensão final de 7 minutos a 72°C para região promotora do gene REST.

### c) Digestão enzimática

O estado de metilação da região LINE-1 foi avaliado pela digestão do produto da amplificação pela PCR através da enzima BstUI

(Fermentas, Burlington, ON, Canada), a qual possui sítio de restrição CGCG. O estado de metilação da região promotora do gene REST foi avaliado pela digestão do produto da amplificação pela PCR pela enzima *HpyCH4IV* (Fermentas, Burlington, ON, Canada). As digestões foram realizadas em reações com volume final de 20  $\mu\text{L}$ , contendo 10  $\mu\text{L}$  do produto amplificado e 0,3  $\mu\text{L}$  de cada enzima (BstUI ou *HpyCH4IV*) em reação única com tampão específico para cada enzima de restrição de acordo com as instruções do fabricante. Após o término das digestões as amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e a intensidade das bandas determinadas pela análise densitométrica utilizando-se o software *Scion Image*.

#### **4.1.2 Material e métodos referentes ao modelo experimental de dor neuropática**

##### **4.1.2.1 Animais**

Foram utilizados camundongos C57/BL-6, machos adultos com 60 dias de vida, obtidos do Laboratório Jackson, e acondicionados no ARCH, Karp Building, *Boston Childrens Hospital e Harvard Medical School*, Boston, Estados Unidos, sob o protocolo 13-01-2328R, aprovado pelo IACUC – *Institutional Animal care and use Committee*. Os animais foram mantidos em biotério com ciclo claro-escuro de 12/12 horas, a  $24 \pm 1$  °C, com acesso livre à água e comida. Alguns destes animais foram modificados geneticamente para aumentar a expressão da GTPCH, chamados de “GTPCH *overexpressing animals* (GOEs)” e/ou geneticamente modificados para anular a expressão da GTPCH, chamados de “GTPCH nocaute (KO)”. Estes efeitos foram induzidos especificamente nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal (GRDs).

##### **4.1.2.2 Indução de dor neuropática periférica**

Os animais foram submetidos à um modelo de injúria do nervo ciático, onde o nervo ciático é exposto, na altura da coxa do animal e, os nervos tibial e fibular são ligados. Após, é realizado um corte distal à ligadura dos mesmos (Decosterd e Woolf, 2000).

#### 4.1.2.3 Avaliação de alodinia mecânica pelo teste comportamental de Von Frey

Para a realização deste teste, os animais foram submetidos à uma plataforma de arame elevada, a qual permite o acesso à superfície ventral das patas traseiras. Foram utilizadas as fibras de Von Frey para “pinicar” as patas traseiras do animal com forças crescentes e, avaliadas as possíveis reações dos animais, como retirar ou lambe a pata e vocalização. Os limites iniciais geralmente são decrescentes durante ensaios sucessivos, por isso os testes foram realizados pelo menos três vezes para tornarem-se estáveis (Tegeder et al., 2006).

#### 4.1.2.4 Mensuração da atividade enzimática da GTP ciclohidrolase (GTPCH)

A atividade da enzima GTPCH foi mensurada através da hidrólise do GTP, na presença de zinco 5 mM, à 37°C, durante 20 minutos no comprimento de onda ultravioleta de 320 nm. Esta técnica foi padronizada nos primeiros meses durante o período de doutorado sanduíche, e o método estará disponível brevemente na bibliografia.

#### 4.1.2.5 Mensuração da atividade enzimática da sepiapterina redutase (SR)

A atividade da enzima SR foi mensurada através da oxidação do NADPH (600  $\mu$ M), na presença de sepiapterina 200  $\mu$ M, à 37°C, durante 20 minutos no comprimento de onda de 420 nm. Esta técnica foi padronizada nos primeiros meses durante o período de doutorado sanduíche, e o método estará disponível brevemente na bibliografia.

#### 4.1.2.6 Quantificação de BH4, Sepiapterina, Neopterina, BH2 e Biopterina por cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa (LC-MS-MS)

A quantificação de BH4 e seus metabólitos foram mensuradas através de LC-MS/MS em tecidos e fluidos biológicos. As amostras foram preparadas na presença de acetonitrila : ácido fórmico contendo 6,5 mM de ditioeritrol como antioxidante e na proporção 50:50. Esta

técnica foi padronizada nos últimos meses durante o período de doutorado sanduíche, e o método estará disponível brevemente na bibliografia.

#### 4.1.2.7 Mensuração de fenilalanina

A concentração de Phe foi mensurada no plasma e no fígado empregando um kit comercial da companhia Sigma-Aldrich, catálogo número MAK005, através da desaminação da fenilalanina e a produção de NADH, o qual reage com a sonda formando um produto fluorescente. Este produto é proporcional a concentração de fenilalanina.

#### 4.1.2.8 Determinação de proteínas

A determinação de proteínas dos homogeneizados foi realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

### 4.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

#### 4.2.1 Cultura primária de astrócitos corticais de rato Wistar

A cultura primária de astrócitos corticais foi preparada a partir de córtex cerebral de ratos Wistar com 1-2 dias de vida, como descrito por Olivera e colaboradores (2008). Os astrócitos foram cultivados a  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> e mantidas em meio DMEM suplementado com SFB a 10%, 3,6 g/L de HEPES, 100 UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina; e mantidas em uma estufa a 37°C, com um mínimo de 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO<sub>2</sub>. Quando as células adquiriram confluência, os astrócitos foram expostos a MG 30 e 300 µM durante 3 e 24 horas. As células foram utilizadas para mensurar a atividade da CK e para o ensaio de viabilidade celular.

#### **4.2.2 Cultura primária de GRDs de camundongos C57/BL-6**

Os GRDs dos camundongos foram coletados e a cultura de neurônios foi preparada utilizando protocolos específicos descritos previamente em Sisignano e colaboradores (2012). Os neurônios foram cultivados em meio de cultura Neurobasal, contendo 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, B-27 e 50 µg/mL de gentamicina e mantidas em uma estufa a 37°C, com um mínimo de 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.2.3 Manutenção da linhagem celular de células precursoras de hipocampo (H19-7) de rato**

A linhagem celular H19-7 foi obtida de *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA). Estas células foram cultivadas em meio DMEM contendo 2 mM L-glutamina, 10% de SFB, 200 mg/mL de G418 e 1 mg/mL de piromicina em placas de cultura contendo 15 mg/mL de poli-D-lisina (Chen e Wu, 2011) e mantidas em uma estufa a 34°C, com um mínimo de 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.2.4 Ensaio de viabilidade celular**

O ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetilialzolib-2,5 difeniltetrazólio) foi utilizado para análise de viabilidade celular após exposição de células ao MG. O ensaio do MTT baseia-se na clivagem deste composto, que é amarelo, pelas desidrogenases mitocondriais, formando um composto púrpura, o formazan, o qual pode ser quantificado por espectrofotometria a 570 nm. Os resultados foram expressos em percentagem dos controles (Mosmann, 1983).

### **4.3 AMOSTRAS DE PACIENTES PORTADORES DE DM1**

As amostras de sangue dos pacientes portadores de DM1 (faixa etária: 20±6 anos de idade; ambos os sexos) e dos controles (faixa etária: 24±9 anos de idade; ambos os sexos) foram coletadas por punção da veia cubital mediana de acordo com o protocolo (CEPSH/435/09), aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Humanos da

Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. O plasma foi utilizado para mensurar a glicemia, formação de AGEs e concentração de neopterina. A atividade da creatinaquinase foi mensurada em linfócitos isolados de acordo com Golzari e colaboradores (2010).

#### 4.4 AMOSTRAS DE PACIENTES PORTADORES DE DP

As amostras de sangue dos pacientes portadores de DP (faixa etária:  $67 \pm 12$  anos de idade; ambos os sexos) e dos controles (faixa etária:  $53 \pm 14$  anos de idade; ambos os sexos) foram coletadas por punção da veia cubital mediana de acordo com o protocolo (CEP/HGCR/2009/0026), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brasil. O plasma foi utilizado para mensurar a glicemia e a formação de AGEs. A atividade do complexo I foi mensurada em plaquetas isoladas de acordo com de Paula Martins e colaboradores (2013).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo *post-hoc* de Tukey. Para a análise dos testes comportamentais foi utilizado a ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls, ANOVA de duas vias seguido do teste *post-hoc* de Fisher e teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Wilcoxon. Para amostras independentes foi utilizado o Teste *t* de Student. Apenas valores significativos de *F* são citados no texto. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Os gráficos foram contruídos utilizando-se o software GraphPad Prism 6<sup>®</sup>.

## **5 RESULTADOS**

Os resultados obtidos durante o doutorado foram divididos em três capítulos:

5.1 CAPÍTULO I: EFEITO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA NOS METABOLISMOS ENERGÉTICO E DE PTERINAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS WISTAR ADULTOS; ADAPTAÇÕES METABÓLICAS NAS DOENÇAS CRÔNICAS DIABETES MELLITUS TIPO 1 E DOENÇA DE PARKINSON

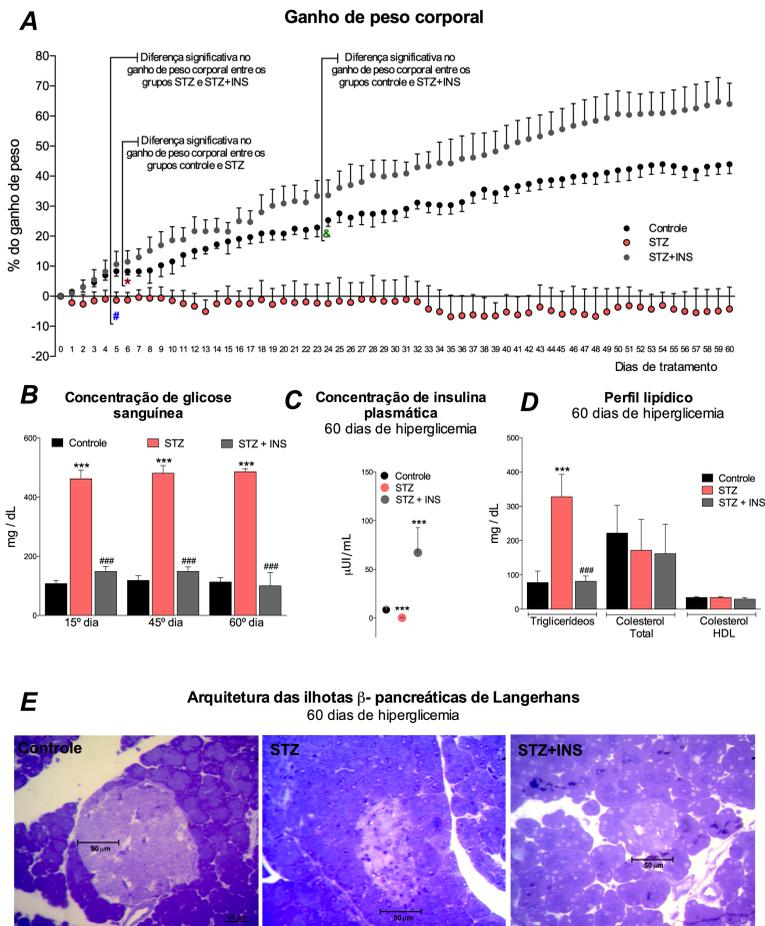
5.2 CAPÍTULO II: EFEITO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS E DE EPIGENÉTICA EM RATOS WISTAR ADULTOS

5.3 CAPÍTULO III: PAPEL PERIFÉRICO DO METABOLISMO DAS PTERINAS NA FISIOPATOLOGIA DA DOR NEUROPÁTICA PERIFÉRICA

## 5.1 CAPÍTULO I: EFEITO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA NOS METABOLISMOS ENERGÉTICO E DE PTERINAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS WISTAR ADULTOS; ADAPTAÇÕES METABÓLICAS NAS DOENÇAS CRÔNICAS DIABETES MELLITUS TIPO 1 E DOENÇA DE PARINSON

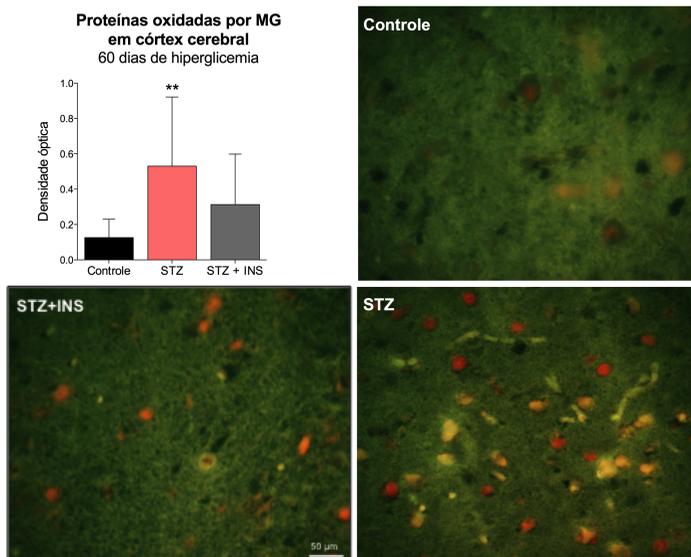
### 5.1.1 Caracterização clínica, bioquímica, e histológica do modelo de hiperglicemia crônica induzido pela administração de estreptozotocina (STZ) em ratos Wistar

A Figura 10 mostra o ganho de peso corporal, arquitetura das ilhotas  $\beta$ -pancreáticas de Langerhans e parâmetros bioquímicos em fluidos biológicos de animais hiperglicêmicos e o efeito da administração de INS sobre estas mensurações. A figura 10A mostra que a deficiência na produção de insulina provocou uma redução no ganho de peso corporal, quando comparado com os outros grupos experimentais, e que a administração de INS preveniu este efeito. Ainda, pode ser observado na figura que o ganho de peso corporal no grupo STZ + INS foi significativamente maior que no grupo controle, a partir do 24º dia (diferença entre os grupos [ $F= 232,97$ ;  $P<0,001$ ], entre os dias de tratamento [ $F= 9,61$ ;  $P<0,001$ ], interação entre os grupos e dias de tratamento [ $F= 4,107$ ;  $P<0,001$ ]). Na Figura 10B, pode ser evidenciado que a deficiência insulínica gerou um estado de hiperglicemia crônica que foi controlado pela administração de INS, a qual foi mensurada utilizando-se um glicosímetro (Optium™ Xceed, Abbot, EUA). (glicemia no 15º dia: [ $F_{(2,9)}= 60,59$ ;  $P<0,001$ ], no 45º dia: [ $F_{(2,9)}= 122,90$ ;  $P<0,001$ ], no 60º dia: [ $F_{(2,9)}= 245,057$ ;  $P<0,001$ ]). A Figura 10C mostra uma depleção quase que total nas concentrações da insulina nos animais do grupo STZ, enquanto que os ratos que receberam insulina possuem valores maiores do que os controles (aumento de 733% nos animais do grupo STZ + INS, comparados aos controles) [ $F_{(2,8)}= 25,10$ ;  $P<0,001$ ]). O perfil lipídico dos animais que receberam STZ também foi alterado, como mostra na figura 10D, onde se observa um aumento nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos, o qual foi prevenido pela administração de INS [ $F_{(2,11)}= 51,29$ ;  $P<0,001$ ]). Além disso, pode ser evidenciado, na Figura 10E, uma diminuição no tamanho e alteração da arquitetura da ilhotas de Langerhans em todos os grupos tratados com STZ (Matos, 2013; Trabalho de Mestrado em Bioquímica, ano de 2013).



**Figura 10.** Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin® N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea), no ganho de peso corporal (A), glicemia (B), concentração plasmática de insulina (C), perfil lipídico (D) e arquitetura das ilhotas de Langerhans (E) de ratos Wistar (machos, 60 dias, 250-300g). Diferenças significativas do ganho de peso corporal entre os grupos controle e STZ iniciam no dia 6 (\*), entre os grupos STZ e STZ+INS no dia 5 (#) e entre os grupos controle e STZ+INS no dia 24 (&) (ANOVA de duas vias para medidas repetidas). A morfologia das ilhotas de Langerhans foi obtida a partir de cortes semifinos de pâncreas corados com azul de toluidina e observados em microscópio óptico em uma magnificação de 400X. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 7-11$  animais por grupo) \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  comparados com o grupo controle; # $P < 0,05$ ; ### $P < 0,001$ , comparados com o grupo STZ (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey). Reproduzido com autorização de Matos, 2013.

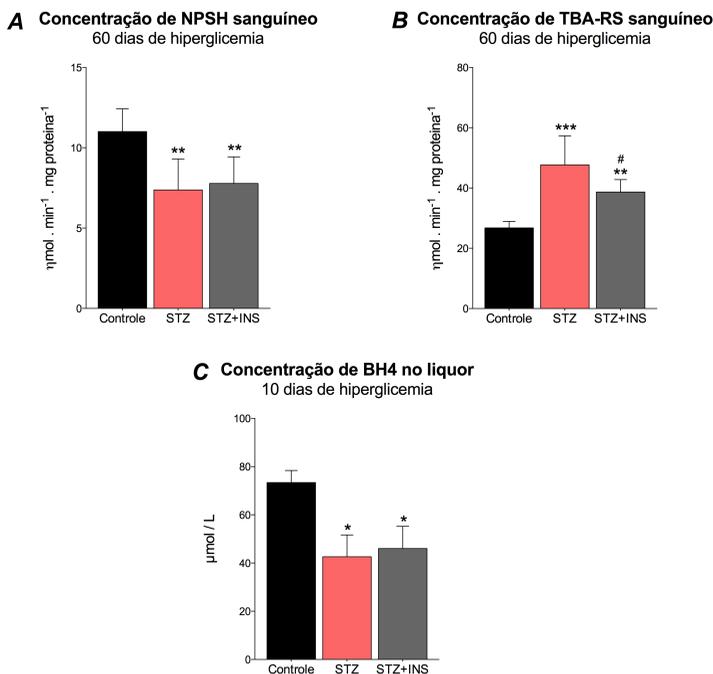
A Figura 11 mostra o efeito da hiperglicemia crônica sobre a formação e acúmulo de proteínas oxidadas por MG (MG-AGEs) no cérebro de animais hiperglicêmicos. É possível observar que há um acúmulo de MG-AGEs no córtex cerebral dos animais com hiperglicemia crônica, e que este efeito foi prevenido de forma parcial pela administração de INS [ $F_{(2,37)} = 6,29$ ;  $P < 0,01$ ] (Glaser, 2014; Trabalho de Doutorado em Neurociências, ano de 2014).



**Figura 11.** Conteúdo de proteínas oxidadas por metilglioxal (imunofluorescência) em córtex cerebral de ratos Wistar (machos; 60 dias de vida; 250-300g) submetidos à hiperglicemia crônica induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e/ou tratados com insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea). A magnificação das fotografias corresponde a 400X. A barra representa 50 µm. A intensidade total de pixels foi determinada e os dados representam a média da intensidade óptica ± erro padrão da média (n= 3 animais por grupo) \*\* $P < 0,01$  comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey). Reproduzido com autorização de Glaser, 2014.

A Figura 12 mostra o efeito desta condição crônica experimental sobre parâmetros de estresse oxidativo em sangue e líquido cefalorraquidiano. Pode ser observado na Figura 12A que a hiperglicemia crônica provocou uma diminuição significativa no conteúdo de NPSH, indicando uma redução nas concentrações de

grupamentos tiólicos plasmáticos [ $F_{(2,15)}= 10,36$ ;  $P<0,01$ ]. Em contrapartida, a Figura 12B mostra que a medida de TBA-RS no plasma aumentou significativamente no grupo STZ [ $F_{(2,13)}= 18,58$ ;  $P<0,001$ ], indicando um aumento da peroxidação lipídica induzida pela hiperglicemia crônica. No SNC, a indução de estresse oxidativo foi evidenciada pela significativa redução nas concentrações da molécula antioxidante BH4 no líquido cefalorraquidiano [ $F_{(2,6)}= 13,36$ ;  $P<0,05$ ] (Figura 12C). Finalmente, este desequilíbrio oxidativo não foi prevenido pelo controle da glicemia mediante a administração de INS.

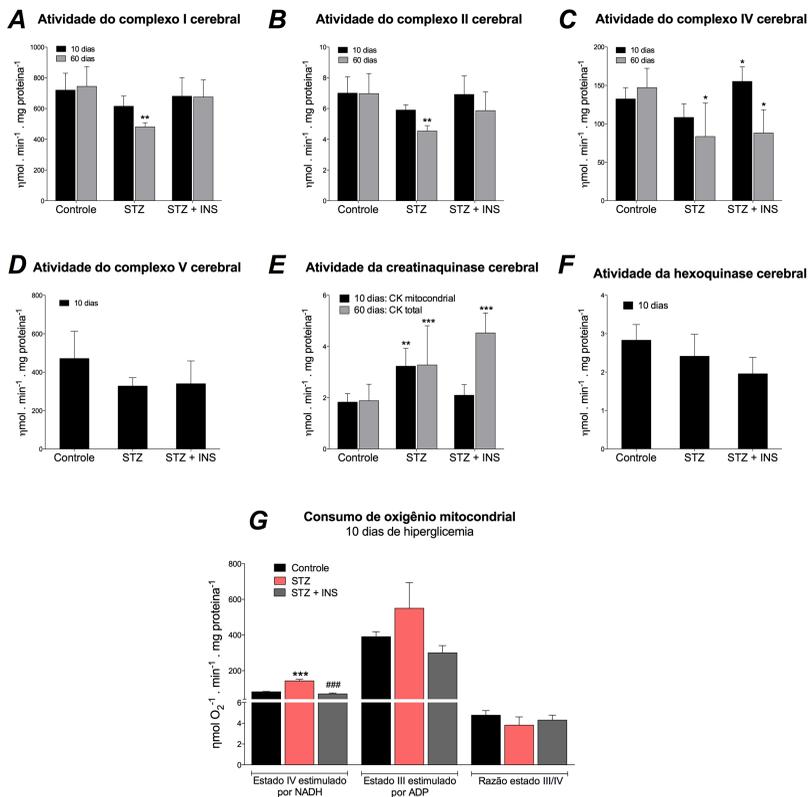


**Figura 12.** Efeito da hiperglicemia (10 e/ou 60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea), sobre parâmetros de estresse oxidativo em fluidos biológicos de ratos Wistar (machos, 60 dias, 250-300g). Concentração plasmática de grupamentos tiólicos (NPSH) (A) e de TBA-RS (B), e concentração de tetraidropiopterina (BH4) no líquido cefalorraquidiano (C). Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 7-11 animais por grupo) \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  comparados com o grupo controle; # $P<0,05$  comparados com o grupo STZ (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

### **5.1.2 Atividade de enzimas chaves do metabolismo energético e respiração mitocondrial em encéfalo de animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena de INS**

A Figura 13A-D mostra que o estado de hiperglicemia crônica provoca inibição significativa na atividade dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória no SNC após 60 dias de hiperglicemia (complexo I: [ $F_{(2,12)}= 5,69$ ;  $P<0,01$ ]; complexo II: [ $F_{(2,12)}= 4,58$ ;  $P<0,01$ ]; complexo IV: [ $F_{(2,12)}= 4,47$ ;  $P<0,05$ ]), e que a administração de INS preveniu as inibições observadas nos complexos I e II. Dez dias de exposição à hiperglicemia não comprometeu estas atividades mitocondriais. Além disso, a Figura 13E mostra um aumento significativo na atividade mitocondrial e/ou total da CK no encéfalo dos animais expostos à hiperglicemia por 10 e 60 dias, e que a INS preveniu estas alterações apenas no período de menor tratamento (10 dias: [ $F_{(2,15)}= 7,69$ ;  $P<0,01$ ]; 60 dias: [ $F_{(2,16)}= 38,93$ ;  $P<0,001$ ]). No entanto, a atividade da hexoquinase (HK) não sofreu modificações significativas pelos tratamentos (Figura 13F).

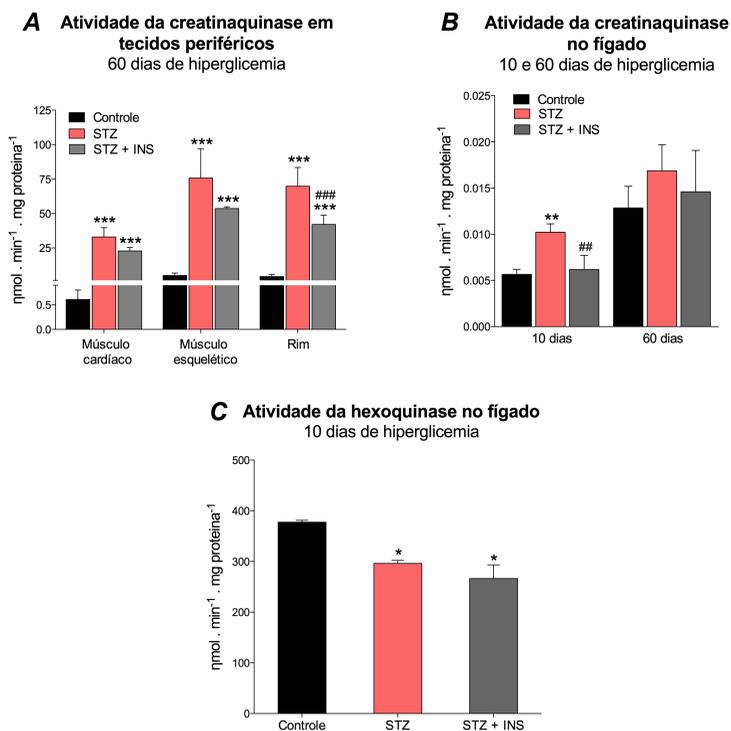
Por outro lado, a respiração celular, como parâmetro de fisiologia mitocondrial, foi mensurada em mitocôndrias de encéfalo de animais expostos a hiperglicemia durante 10 dias. A Figura 13G mostra um aumento significativo do consumo de oxigênio no estado IV de respiração mitocondrial, nos animais do grupo STZ, efeito que foi prevenido pela administração de INS [ $F_{(2,5)}= 125,85$ ;  $P<0,001$ ]. No entanto, o consumo de oxigênio e o índice de controle respiratório (RCR) não foram modificados pelos tratamentos.



**Figura 13.** Efeito da hiperglicemia (10 e/ou 60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea), sobre a atividade dos complexos I, II, IV e V da cadeia transportadora de elétrons (A-D), creatinaquinase mitocondrial e/ou total (E), hexoquinase mitocondrial (F) e o consumo de oxigênio mitocondrial (G) em mitocôndrias isoladas de encéfalo de ratos Wistar. Os dados representam média ± erro padrão da média (n= 3-8 animais). \**P*<0,05; \*\**P*<0,01; \*\*\**P*<0,001 comparados com o grupo controle. ###*P*<0,001 comparados com o grupo STZ (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

### 5.1.3 Atividade da creatinaquinase e hexoquinase em tecidos periféricos de animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena de INS

A Figura 14A mostra um aumento significativo da atividade da CK nos músculos cardíaco [ $F_{(2,15)}= 26,28$ ;  $P<0,001$ ] e esquelético [ $F_{(2,16)}= 26,74$ ;  $P<0,001$ ], e no rim [ $F_{(2,8)}= 28,54$ ;  $P<0,001$ ].

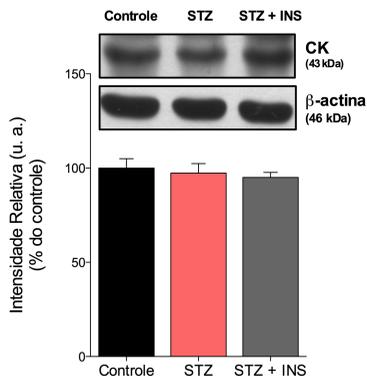


**Figura 14.** Efeito da hiperglicemia (10 e/ou 60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin® N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea), sobre a atividade da creatinaquinase (A e B) em mitocôndrias isoladas de tecidos periféricos (músculos cardíaco e esquelético, rim e fígado) e da hexoquinase (C) em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3-8 animais). \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  comparados com o grupo controle. ## $P<0,01$ ; ### $P<0,001$  comparados com o grupo STZ (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

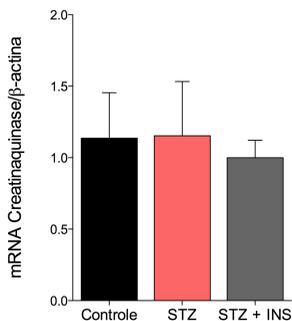
A administração de INS preveniu a readaptação energética apenas no tecido renal. No tecido hepático, onde a atividade desta enzima é extremamente baixa ou nula (Wallimann e Hemmer, 1994), também foi observado um aumento da atividade dos animais que permaneceram hiperglicêmicos por 10 dias [ $F_{(2,8)} = 23,85$ ;  $P < 0,01$ ], sendo que o tratamento com INS exógena preveniu este efeito (Figura 14B). Adicionalmente, foi identificada outra deficiência energética representada por uma inibição significativa na atividade da enzima HK mitocondrial no fígado dos animais dos grupos STZ e STZ+INS [ $F_{(2,3)} = 25,46$ ;  $P < 0,05$ ] (Figura 14C).

#### 5.1.4 Avaliação do imunoconteúdo proteico e da expressão gênica da CK em animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena de INS

##### A Imunoconteúdo da creatinaquinase em córtex cerebral 60 dias de hiperglicemia



##### B Expressão da creatinaquinase em córtex cerebral 60 dias de hiperglicemia

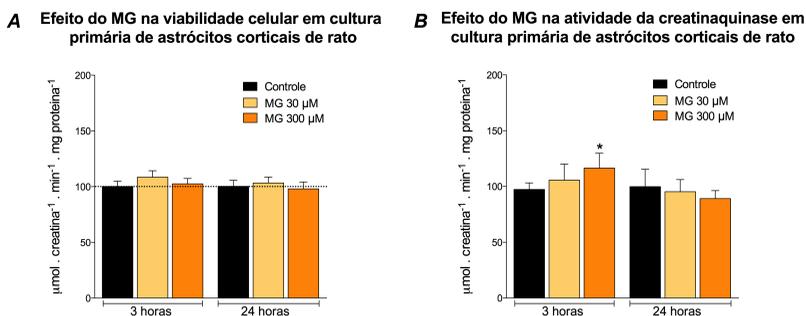


**Figura 15.** Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea), sobre o conteúdo imunorreativo contra creatinaquinase (CK) (A) e expressão do gene que codifica para CK (B), em córtex cerebral de ratos Wistar. Os dados foram normalizados através da análise do conteúdo proteico de  $\beta$ -actina. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3 animais por grupo) (ANOVA de uma via).

A Figura 15A e B mostram o imunoconteúdo e a expressão do gene que codifica para CK, respectivamente, no córtex cerebral de animais dos grupos controle, STZ e STZ + INS. As figuras mostram que nem o estado hiperglicêmico crônico, nem a normalização deste pela administração de INS modificaram o conteúdo e a expressão do mRNA da CK.

### 5.1.5 Efeito do metilglioal (MG) sobre a atividade da creatinaquinase e viabilidade celular em cultura primária de astrócitos corticais de rato

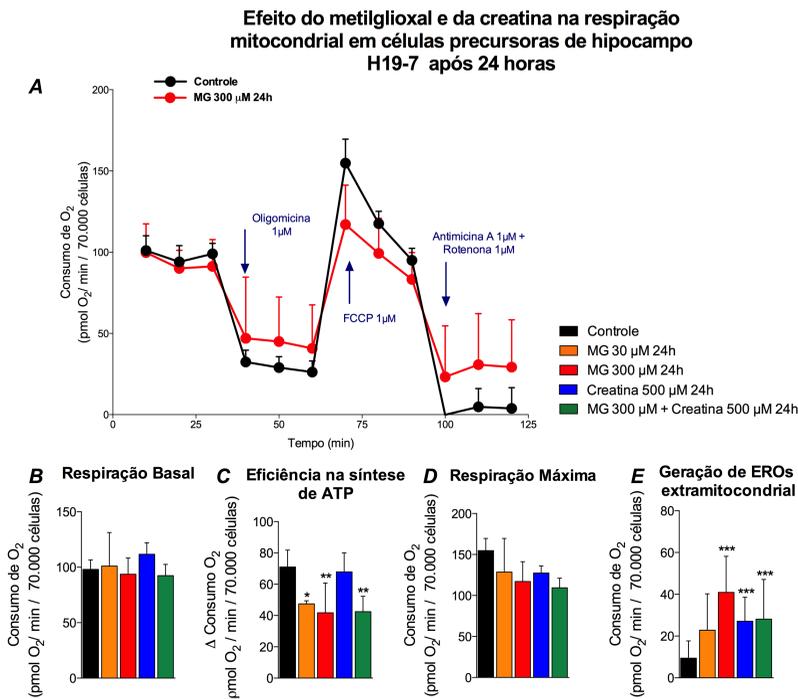
A Figura 16A mostra que a exposição da cultura primária de astrócitos corticais de rato ao MG nas concentrações de 30 e 300  $\mu\text{M}$  não altera a viabilidade celular durante um período de 3 ou 24 horas. Por outro lado, a exposição de MG na concentração de 300  $\mu\text{M}$  por 3 horas nestas células, causa um aumento significativo na atividade da creatinaquinase [ $F_{(2,16)} = 3,875$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 16.** Efeito *in vitro* do metilglioal (MG; 30 e 300  $\mu\text{M}$ ) sobre a viabilidade celular (redução do MTT) (A) e sobre a atividade da creatinaquinase (B) em cultura primária de astrócitos corticais de rato. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 3$  experimentos independentes). \* $P < 0,01$  comparados com o grupo controle. (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

### 5.1.6 Efeito do metilgloxal (MG) e da creatina sobre a fisiologia mitocondrial na linhagem celular H19-7 (células precursoras de hipocampo) de rato

A Figura 17 mostra o efeito do MG (30 e 300  $\mu\text{M}$ ) e da creatina (500  $\mu\text{M}$ ) sobre a respiração mitocondrial na linhagem celular de células precursoras de hipocampo (H19-7) de rato.

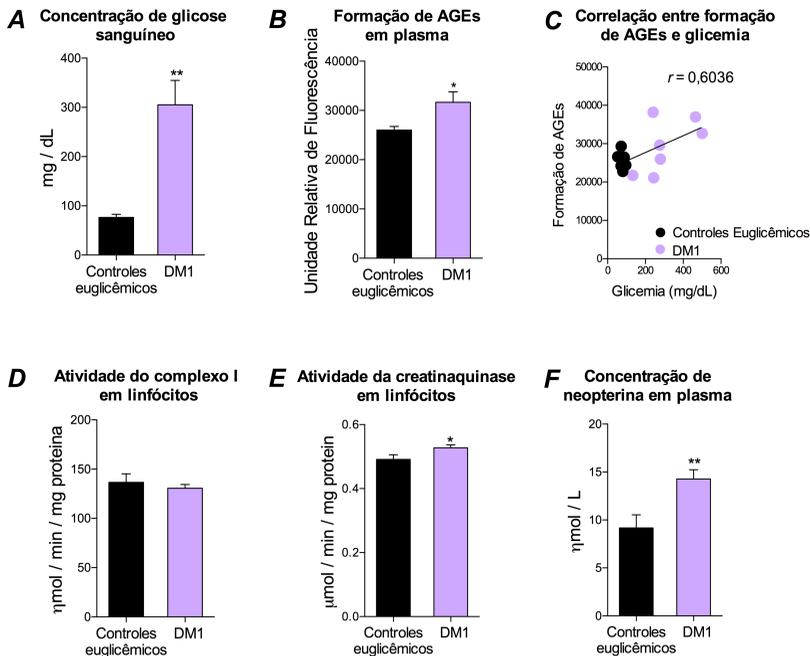


**Figura 17.** Efeito *in vitro* do metilgloxal (MG; 30 e 300  $\mu\text{M}$ ) e da creatina (500  $\mu\text{M}$ ) sobre o consumo de oxigênio mitocondrial na linhagem celular de células precursoras de hipocampo (H19-7). O painel (A) mostra uma figura representativa da respiração mitocondrial de células controle e de células tratadas com MG na concentração de 300  $\mu\text{M}$ . As medidas de respiração basal (B), eficiência na síntese de ATP (C), respiração máxima celular (D) e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) extramitocondrial (E) foram medidas em respirômetro Seahorse X-24 Analyser em meio de reação contendo glutamina 100 mM e glicose na concentração de 7 mg/mL a 37°C. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n= 3 experimentos independentes). \* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  comparados com o grupo controle. (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

A Figura 17B mostra que tanto o MG quanto a creatina não obtiveram efeito significativo na respiração basal das células. Por outro lado, a Figura 17C mostra que 300  $\mu\text{M}$  de MG por um período de 24 horas causou uma diminuição significativa na eficiência de síntese de ATP (medido após a adição de oligomicina; inibidor do complexo V) [ $F_{(4,40)}= 6,006$ ;  $P<0,001$ ]. Apesar destas alterações na respiração mitocondrial induzidas pelo MG, a respiração máxima (estado desacoplado induzido por FCCP) não foi modificada pelo MG (Figura 17D). A Figura 17E mostra que o tratamento com MG e também com a creatina provocou um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio [ $F_{(4,45)}= 4,835$ ;  $P<0,001$ ].

### **5.1.7 Identificação de AGEs, adaptações mitocondriais e ativação do sistema imune em sangue de indivíduos acometidos por Diabetes Mellitus do tipo 1 (DM1)**

Após verificar alterações na atividade dos complexos da cadeia respiratória e da CK em animais submetidos à hiperglicemia crônica e em sistemas *in vitro*, o próximo passo deste estudo envolveu a investigação de marcadores mitocondriais em células sanguíneas e a formação de AGEs no plasma de indivíduos acometidos por DM1, que foram previamente diagnosticados clínica e bioquimicamente pela equipe do Dr. Alexandre Hohl do Departamento de Endocrinologia do Hospital Universitário da UFSC. A Figura 18A mostra os valores de glicemia nos pacientes DM1, a qual se mostrou significativamente aumentada quando comparada com controles sadios da mesma faixa etária [ $t_{(11)}= 4,23$ ;  $P<0,001$ ]. Esse aumento na glicemia correlacionou com um aumento significativo de AGEs plasmático [ $t_{(12)}= 2,80$ ;  $P<0,05$ ; Correlação:  $r= 0,60$ ;  $P<0,01$ ] (Figuras 18B e C). A Figura 18D mostra que embora exista uma leve diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial em linfócitos, esta diminuição não foi estatisticamente significativa (5% de redução). Ainda, a Figura 18E mostra um aumento significativo na atividade da CK em linfócitos de pacientes DM1 (6% de aumento) [ $t_{(15)}= 2,18$ ;  $P<0,05$ ]. Finalmente, na Figura 18F pode ser evidenciado um aumento significativo de neopterina plasmática [ $t_{(15)}= 3,10$ ;  $P<0,01$ ], biomarcador sensível que indica ativação do sistema imune (Sucher et al., 2010).

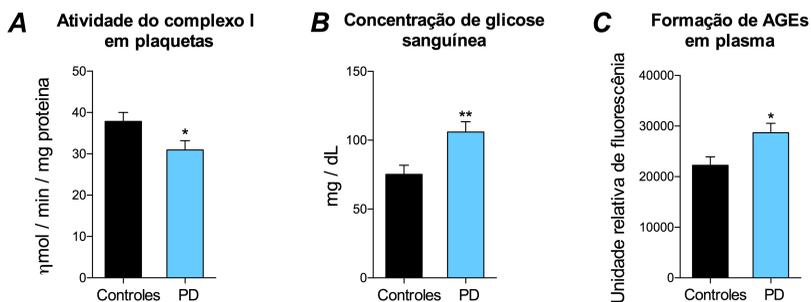


**Figura 18.** Mensuração da glicemia (A), concentração de proteínas oxidadas (B; AGEs), atividade do complexo I da cadeia respiratória (D) e da creatinaquinase (E), e concentração de neopterina (F) no sangue de indivíduos afetados por diabetes mellitus do tipo 1 (DM1; n= 5-10 pacientes; faixa etária: 20±6 anos de idade; ambos os sexos), e de indivíduos euglicêmicos (Controles; n=3-7 pacientes; faixa etária: 24±9 anos de idade; ambos os sexos). A correlação entre glicemia e conteúdo de AGEs foi calculada (C). Os dados representam média ± desvio padrão. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  comparados os controles (Teste *t* de Student para amostras independentes).

### 5.1.8 Atividade do complexo I mitocondrial em plaquetas, glicemia e concentração plasmática de AGEs em indivíduos afetados pela doença neurodegenerativa de Parkinson (PD)

Com o intuito de identificar se existe uma relação entre PD e resistência insulínica, o próximo passo desta pesquisa foi mensurar a atividade do complexo I mitocondrial em plaquetas, glicemia e a concentração plasmática de AGEs em indivíduos acometidos por PD, que foram clinicamente diagnosticados pela equipe do Dr. Roger Walz e Dr. Fernando Cini Freitas do Serviço de Neurologia do Hospital Celso

Ramos. A Figura 19A mostra a atividade do complexo I em plaquetas de indivíduos afetados por PD. Pode ser observado na figura uma diminuição significativa na atividade do complexo I mitocondrial em relação aos indivíduos controle [ $t_{(17)}= 2,19; P<0,05$ ]. Por outro lado, as Figuras 19B e C mostram um aumento significativo na glicemia dos pacientes PD [ $t_{(17)}= 3,60; P<0,01$ ] juntamente com uma maior formação de AGEs plasmático [ $t_{(16)}= 2,56; P<0,05$ ].



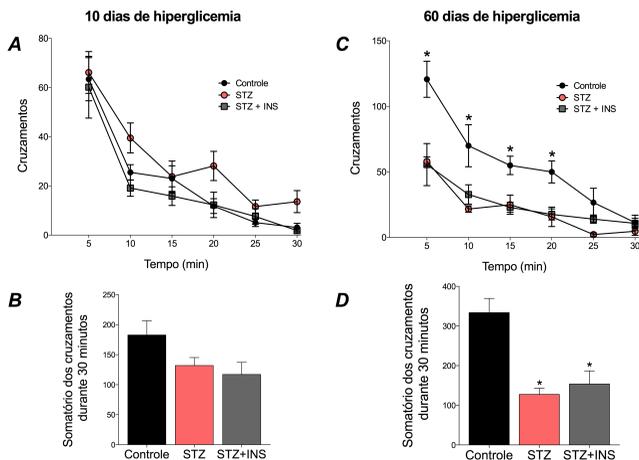
**Figura 19.** Mensuração da atividade plaquetária do complexo I da cadeia respiratória (A), glicemia (B), e concentração de proteínas oxidadas (C; AGEs), em sangue de indivíduos afetados pela doença de Parkinson (DP; n=7-8; faixa etária: 67±12 anos de idade; ambos os sexos) e em indivíduos controles (Controles; n=11; faixa etária: 53±14 anos de idade; ambos os sexos). Os dados representam média ± desvio padrão. \* $P<0,05$ ; \*\* $P<0,01$  comparados com os controles (Teste  $t$  de Student para amostras independentes).

## 5.2 CAPÍTULO II: Efeito da hiperglicemia crônica sobre parâmetros cognitivos e de epigenética em ratos Wistar adultos

### 5.2.1 Avaliação comportamental em animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena da INS

Além de identificar as alterações metabólicas e a indução de estresse oxidativo periférico e central nos animais que permaneceram hiperglicêmicos por períodos de 10 e/ou 60 dias, também foram investigados parâmetros comportamentais relacionados com os processos cognitivos.

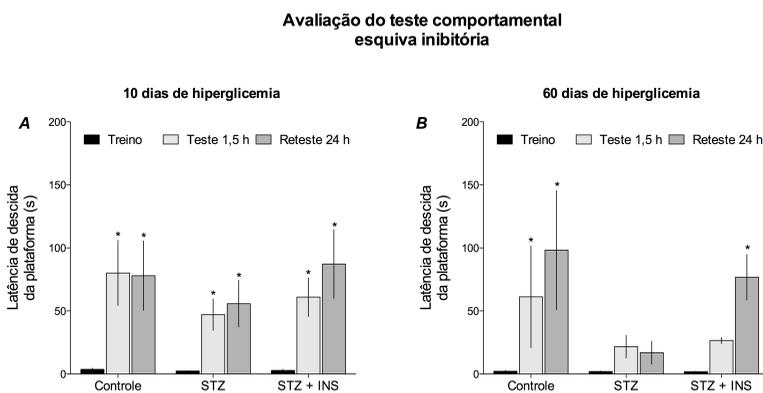
#### Avaliação da locomoção espontânea



**Figura 20.** Efeito da hiperglicemia (10 e 60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea), sobre a locomoção espontânea de ratos Wistar. A caixa de atividade apresenta três células fotoelétricas instaladas a 3 cm de altura do chão em grade, espaçadas igualmente ao longo de sua extensão e acopladas a um contador digital que registra o número de vezes que o animal interrompe os feixes de luz. Os movimentos horizontais dos animais foram detectados pelas fotocélulas um período de 30 minutos, com medidas de atividade a cada 5 minutos (A e C: indicam a medida a cada 5 min; B e D: indicam a somatória total de cruzamentos em trinta minutos). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão da média. Para A e C,  $*P < 0,001$  comparado com o grupo controle (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de teste *post-hoc* de Newman-Keuls); para B e D  $*P < 0,01$  comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

A Figura 20A-D mostra a atividade locomotora espontânea de animais hiperglicêmicos por períodos de 10 e 60 dias medida no teste comportamental da caixa de atividade. Pode ser observado que a capacidade locomotora foi significativamente afetada nos animais que permaneceram hiperglicêmicos por 60 dias, e que a normalização da glicemia pela administração de INS não preveniu esta alteração (diferença entre os tratamentos [ $F_{(2,9)}= 3,64; P<0,01$ ], entre as repetições [ $F_{(5,45)}= 39,88; P<0,001$ ], interação entre os tratamentos e repetições [ $F_{(10,45)}= 3,0; P<0,01$ ]. O índice de atividade locomotora foi calculada mediante o número de cruzamentos realizados em trinta minutos [ $F_{(2,9)}= 11,64; P<0,01$ ], (Figuras 20B e D).

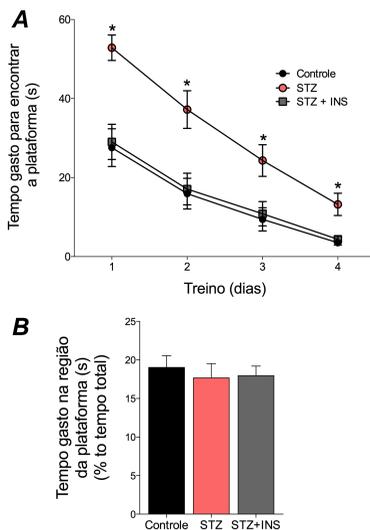
O próximo parâmetro comportamental mensurado foi o da esquiwa inibitória, teste empregado para analisar a memória aversiva dos animais. Neste teste comportamental, os animais recebem um leve choque de 0,3 mA por 2 segundos nas quatro patas, imediatamente após eles descerem de uma plataforma para uma superfície com grades (treino).



**Figura 21.** Efeito da hiperglicemia (A: 10 dias, B: 60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea) sobre o parâmetro comportamental de esquiwa inibitória. O tempo empregado para descer de uma plataforma após receber um leve choque elétrico (treino; 0,3 mA durante 2 segundos; teste: 1,5h, e reteste: 24 h após) é quantificado como latência de descida em segundos. Os dados representam mediana  $\pm$  intervalo interquartil. \* $P<0,001$  comparado com o treino de cada grupo experimental. (Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Wilcoxon).

A memória aversiva é medida após 1,5h (teste) e 24h (reteste), sem a presença do choque nas patas. O aprendizado consiste em o animal descer da plataforma empregando um tempo maior que aquele observado durante o treino (primeira exposição). A Figura 21B mostra que a hiperglicemia por períodos prolongados (60 dias) compromete a memória de curto e longo prazo, e que o tratamento com INS previne o comprometimento da memória de longo prazo [ $H = 12,11$ ;  $P < 0,01$ ].

**Avaliação de parâmetros cognitivos através do teste comportamental do labirinto aquático de Morris**  
60 dias de hiperglicemia

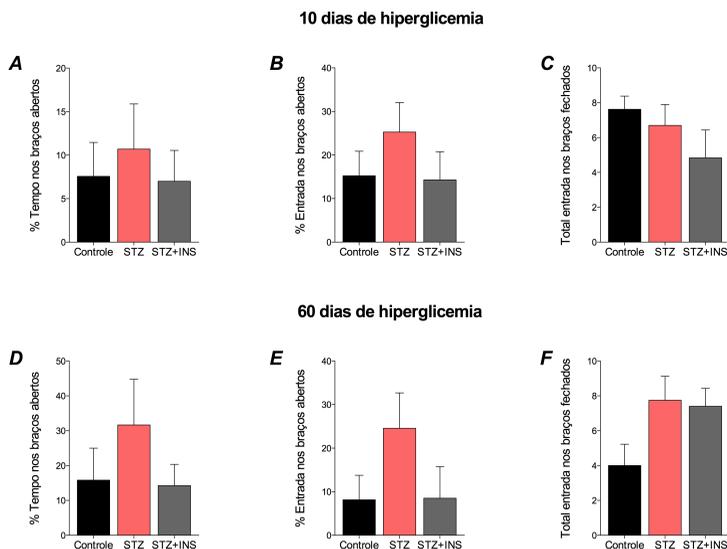


**Figura 22.** Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea) sobre o parâmetro comportamental de memória espacial mensurado através do teste do labirinto aquático de Morris. O painel (A) mostra o tempo gasto para encontrar a plataforma durante os 4 dias de treino e (B) o tempo gasto na região da plataforma. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0,001$  comparado com o grupo controle. (ANOVA de um via com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-keuls).

A Figura 22 mostra a avaliação da memória espacial dos animais que permaneceram hiperglicêmicos por períodos de 60 dias e o efeito da administração de INS sobre essas medidas. Pode ser observado que os animais que permaneceram hiperglicêmicos demoraram mais tempo para encontrar a plataforma em todos os 4 dias de treino em comparação com os outros grupos experimentais (Figura 22A) [ $F_{(2,20)}=1,75$ ;  $P<0,001$ ]. Porém, a Figura 22B mostra que todos os grupos experimentais gastaram o mesmo tempo na região da plataforma.

A seguir, e considerando que sintomas ansiolíticos poderiam comprometer a cognição, foi avaliado este tipo de comportamento nos animais submetidos às diferentes condições experimentais através do teste do labirinto em cruz elevada.

### Avaliação do teste comportamental Labirinto em cruz elevada

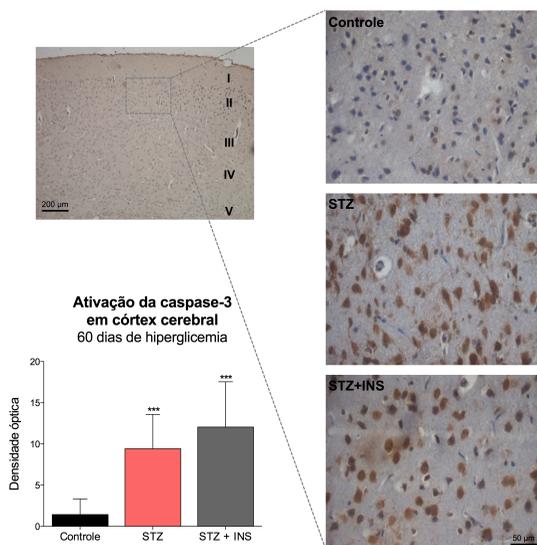


**Figura 23.** Efeito da hiperglicemia (10 e 60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin® N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea) sobre o parâmetro comportamental de ansiedade no labirinto em cruz elevada. O tempo gasto (A e D) e o percentual de entradas (B e E) nos braços abertos, e o número total de entradas (C e F) nos braços fechados do labirinto em cruz elevada foram mensurados como parâmetros de ansiedade. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão da média. (ANOVA de uma via).

O aparato é composto por dois braços opostos fechados e dois braços opostos abertos, onde os animais são colocados exatamente no centro para permitir a exploração neste ambiente por 5 minutos. A Figura 23 mostra que os tratamentos não alteraram o perfil de ansiedade dos animais.

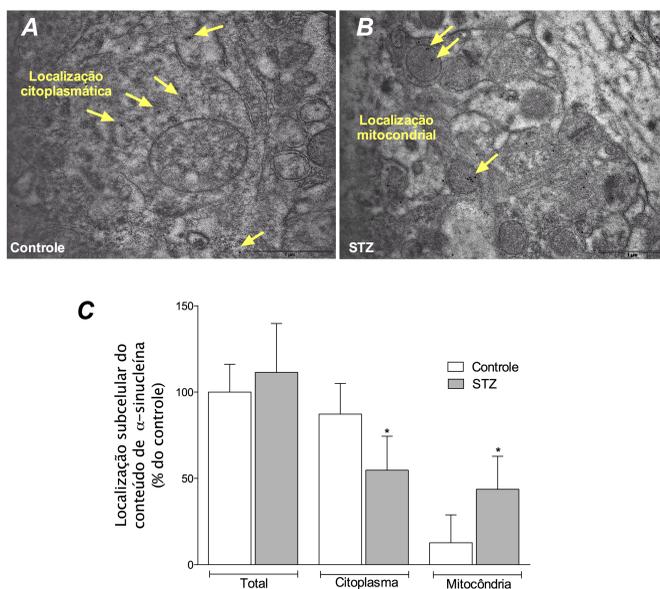
### 5.2.2 Parâmetros de neurodegeneração em córtex cerebral e hipocampo de animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena da INS

A Figura 24 mostra um aumento significativo da reatividade imune contra a proteína caspase-3 na forma clivada no córtex cerebral dos animais do grupo STZ (60 dias de hiperglicemia), no entanto, a correção da glicemia pela administração de INS não reverteu este processo [ $F_{(2,51)} = 32,44$ ;  $P < 0,001$ ].



**Figura 24.** Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea) sobre o conteúdo de caspase-3 na forma clivada em córtex cerebral de ratos Wistar. As imagens em maior aumento são representativas da camada II do córtex cerebral. A intensidade total de pixels foi determinada e os dados representam média da densidade óptica ± erro padrão da média (n=3 animais). \*\*\*  $P < 0,001$  comparados com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

A Figura 25 mostra o acúmulo de agregados da proteína  $\alpha$ -sinucleína no hipocampo dos animais que permaneceram hiperglicêmicos por 60 dias por microscopia eletrônica de transmissão. Pode ser observado que a hiperglicemia crônica não altera o conteúdo total desta proteína (Figura 25C), mas sim promove a sua redistribuição subcelular, demonstrada pela diminuição significativa dos agregados de  $\alpha$ -sinucleína no citosol (Figura 25A e C; [ $t_{(8)} = 2,647$ ;  $P < 0,05$ ]) e de um aumento significativo destes no interior da mitocôndria (Figura 25B e C; [ $t_{(8)} = 2,648$ ;  $P < 0,05$ ]).

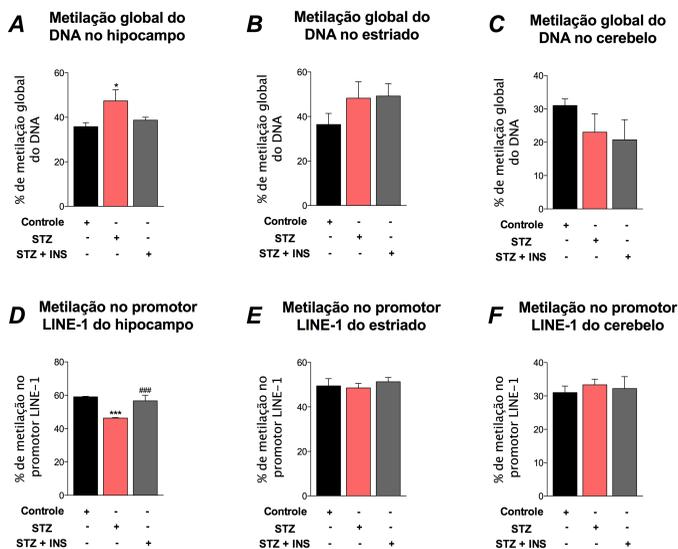


**Figura 25.** Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) sobre a localização subcelular da  $\alpha$ -sinucleína em preparações de hipocampo de ratos Wistar. As fotografias A e B são representativas da análise por imunocitoquímica ultraestrutural realizada por microscopia eletrônica de transmissão na magnificação de 60.000x. As setas nas fotografias mostram a imunomarcagem de agregados de  $\alpha$ -sinucleína (empregando anticorpo primário específico e secundário de ouro de 15 nm) com sua localização subcelular citoplasmática (A) ou mitocondrial (B). As barras em (A) e (B) representam 1  $\mu$ m. As barras em (C) representam a quantificação total da  $\alpha$ -sinucleína e a distribuição subcelular no citoplasma e dentro da mitocôndria. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n=6 animais). \* $P < 0,05$  comparados com o grupo controle (teste-*t* de student para amostras independentes).

### 5.2.3 Alterações epigenéticas observadas no hipocampo de animais hiperglicêmicos induzidos pela administração de STZ e o efeito da administração exógena da INS

A Figura 26A-C mostra a metilação global do DNA em diferentes regiões cerebrais (hipocampo, estriado e cerebelo) dos animais que permaneceram hiperglicêmicos por um período de 60 dias.

#### Presença de hipermetilação do DNA global e hipometilação no promotor LINE-1 no hipocampo de animais hiperglicêmicos

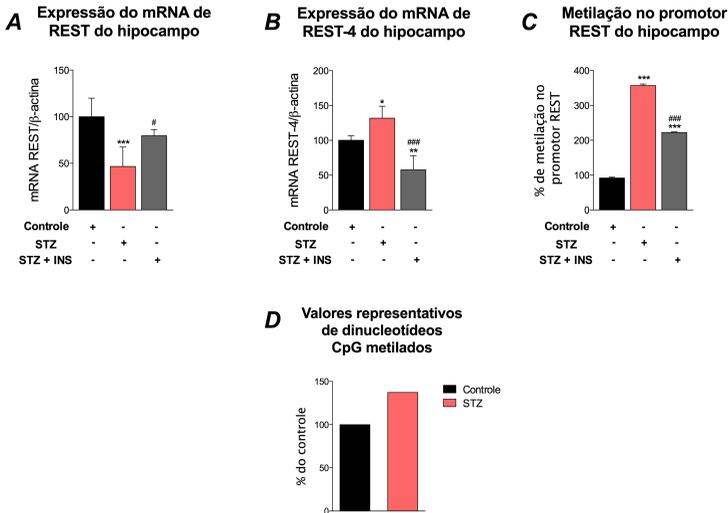


**Figura 26.** Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin® N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea), sobre a metilação global do DNA no hipocampo (A), estriado (B) e cerebelo (C) e sobre a metilação no promotor de LINE-1 no hipocampo (D), estriado (E) e cerebelo (F) de ratos Wistar. Os tecidos tiveram seu gDNA extraído pelo método de fenól/clorofórmio/álcool isoamílico. Após extração, as amostras de gDNA foram submetidas ao tratamento por bissulfito de sódio e então amplificadas por PCR com iniciadores específicos para a região global ou LINE-1. Para determinação da % de metilação das amostras, os *amplicons* foram submetidos à dupla digestão pelas enzimas *TaqI* e *TasI* e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Os valores das porcentagens foram obtidos após análise densitométrica utilizando-se o software *Scion Image*. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n= 4 animais). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  comparados com o grupo controle. ### $P < 0,001$  comparados com o grupo STZ (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

Pode ser observado que a hiperglicemia crônica levou a um aumento significativo da metilação global do DNA no hipocampo, e que o controle glicêmico realizado através da administração exógena da INS preveniu completamente este evento [ $F_{(2,5)}=9,034$ ;  $P<0.05$ ]. Por outro lado, foi analisada a metilação do DNA no elemento transponível repetido, o LINE-1, o qual exerce um papel fundamental para manter a estabilidade genômica. A Figura 26D-F mostra a metilação do DNA no LINE-1 nas mesmas estruturas cerebrais, hipocampo, estriado e cerebelo pelo método de COBRA. Pode ser observado que a hiperglicemia crônica promoveu a hipometilação do LINE-1 no hipocampo (Figura 26D) [ $F_{(2,9)}=46,53$ ;  $P<0.001$ ], levando a uma instabilidade genômica. A administração exógena de INS preveniu este efeito.

A Figura 27A mostra o efeito da hiperglicemia crônica na expressão gênica de REST, proteína que intimamente está relacionada com a proteção neuronal durante o envelhecimento e desenvolvimento de doenças crônicas, incluindo as neurodegenerativas (Lu et al., 2014). Pode ser observado que há uma diminuição significativa no conteúdo de mRNA que codifica para REST e que a administração de INS preveniu completamente esta alteração (Figura 27A, [ $F_{(2,12)}=12,41$ ;  $P<0.001$ ]). Em contrapartida, pode ser observado na Figura 27B que há um aumento significativo no gene que codifica para REST-4, forma truncada da proteína REST, e a INS preveniu parcialmente este efeito [ $F_{(2,12)}=27,44$ ;  $P<0.001$ ]. Para confirmar se as alterações na expressão gênica de REST estão relacionadas com os mecanismos epigenéticos, foi mensurado a metilação no promotor de REST. A Figura 27C mostra que o promotor de REST se encontra hipermetilado no hipocampo após um período de 60 dias de hiperglicemia crônica e que a insulina previne este efeito [ $F_{(2,6)}=4831$ ;  $P<0.001$ ]. Ainda, a Figura 27D mostra um aumento na quantidade de dinucleotídeos CpG metilados no promotor REST nos animais hiperglicêmicos (Valores representativos).

## Metilação do promotor REST e a expressão do mRNA no hipocampo de animais hiperglicêmicos



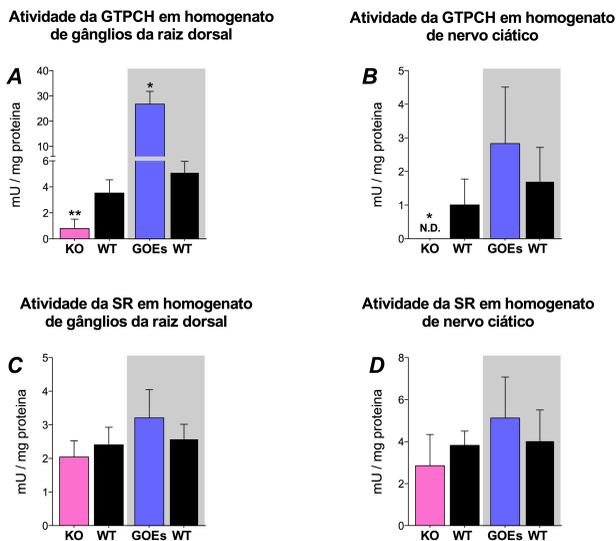
**Figura 27.** Efeito da hiperglicemia (60 dias) induzida pela administração de estreptozotocina (STZ; 55 mg/kg, via intraperitoneal) e da administração de insulina (INS; insulina Novolin<sup>®</sup> N 1,5 UI duas vezes ao dia; via subcutânea), sobre a expressão do gene que codifica para a proteína REST (A) e REST-4 (B) e sobre a metilação do promotor REST no hipocampo (C) de ratos Wistar. O painel (D) representa a graficação representativa dos dinucleotídeos CpG metilados no hipocampo. Os tecidos tiveram seu gDNA extraído pelo método de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Após extração, as amostras de gDNA foram submetidas ao tratamento por bissulfito de sódio e então amplificadas por PCR com iniciadores específicos para a região global ou LINE-1. Para determinação da % de metilação das amostras, os *amplicons* foram submetidos à dupla digestão pelas enzimas *TaqI* e *TasI* e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. Os valores das porcentagens foram obtidos após análise densitométrica utilizando-se o software *Scion Image*. Os dados representam média  $\pm$  erro padrão da média (n= 4 animais). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  comparados com o grupo controle. ### $P < 0,001$  comparados com o grupo STZ (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

### 5.3 CAPÍTULO III: Papel periférico do metabolismo das pterinas na fisiopatologia da dor neuropática periférica

Os resultados apresentados neste capítulo foram desenvolvidos durante o doutorado sanduíche, realizado no Laboratório de Neurobiologia do F. M. Kirby Neurobiology Center, *Boston Childrens Hospital e Harvard Medical School* sob a orientação dos professores Dr. Clifford J. Woolf e Alexandra Susana Latini. O Prof. Woolf possui ampla experiência no campo da neurobiologia relacionada com a dor neuropática e o envolvimento da molécula BH4 e seus metabólitos nesta enfermidade. Ainda, seu grupo de pesquisa é um dos mais renomados em todo o mundo no que se refere a dor neuropática. Além disso, o Dr. Clifford J. Woolf contribuiu com importante suporte financeiro e científico viabilizando a realização destes experimentos.

A Figura 28 mostra as atividades das enzimas GTP ciclohidroxilase (GTPCH) e sepiapterina redutase (SR) em tecidos de animais geneticamente modificados. Foram utilizados animais transgênicos com super expressão do gene que codifica para a proteína GTPCH, chamados de animais GOEs (*GTPCH overexpression*). Devido a esta modificação genética, os animais intensificaram a síntese da molécula BH4 e este efeito foi induzido especificamente nos gânglios da raiz dorsal (GRD). Além disso, foram utilizados também animais com deleção no gene que codifica para a proteína GTPCH, chamados de animais KO (nocaute). Estes animais tiveram a produção da molécula BH4 comprometida, e esta modificação também foi específica no GRD.

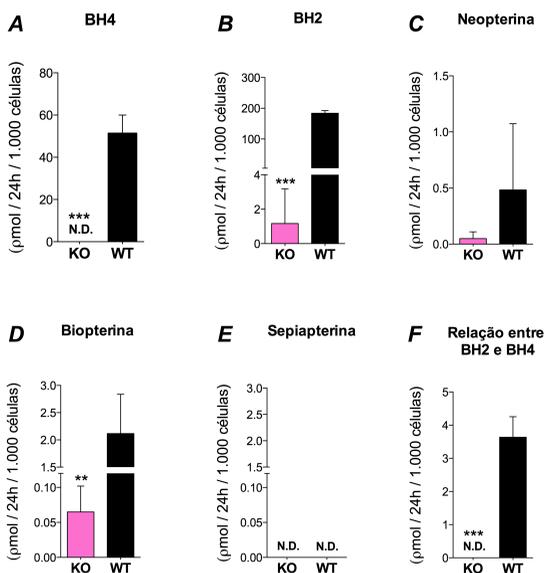
Pode ser observado na Figura 28A que houve um aumento significativo na atividade da enzima GTPCH em homogenato de GRDs dos animais GOEs [ $t_{(3)} = 5,719$ ;  $P < 0,05$ ] e, em contrapartida, uma diminuição significativa na atividade desta enzima nos animais KO [ $t_{(5)} = 4,204$ ;  $P < 0,01$ ]. Em homogenato de nervo ciático, também houve uma diminuição significativa na atividade da GTPCH nos animais KO [ $t_{(4)} = 3,011$ ;  $P < 0,05$ ] (Figura 28B). Além disso, foram avaliadas as atividades da enzima SR, nos mesmos homogenatos dos animais KO e GOEs (Figura 28C e D). Como indicado na figura, não houve diferença significativa na atividade desta enzima, quando comparado com os animais WT.



**Figura 28.** Atividade da enzima GTP ciclohidroxilase (GTPCH) em homogenato de gânglios da raiz dorsal (GRD) (A) e nervo ciático (B) e da enzima sepiapterina redutase (SR) em homogenato de GRD (C) e nervo ciático (D) em animais nocaute (KO) e animais com aumento da expressão (GOEs) da enzima GTPCH. Valores não detectáveis (N.D.). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão da média. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  comparados com os animais sem modificação genética (wild types; WT) (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Estes dados também foram confirmados em sobrenadantes de culturas primárias de neurônios presentes nos GRDs dos animais nocaute para GTPCH. Pode-se observar que após 24 horas em cultura, estes neurônios não secretam BH4 (Figura 29A; [ $t_{(5)} = 12,47$ ;  $P < 0,001$ ]), e os metabólitos da via de síntese da BH4 (BH2 e biopterina) encontram-se em concentrações menores que nos sobrenadantes de células controles (WT) - BH2 (Figura 29B; [ $t_{(5)} = 40,40$ ;  $P < 0,001$ ]), biopterina (Figura 29D; [ $t_{(5)} = 5,88$ ;  $P < 0,01$ ]) e a relação entre a BH2 e BH4 (Figura 29F; [ $t_{(4)} = 10,15$ ;  $P < 0,001$ ]) - devido a deficiência na expressão da enzima GTPCH. Ainda, pode-se observar que houve uma diminuição na concentração de neopterina, porém esta diferença não foi significativa (Figura 29C), e que a concentração de sepiapterina não foi detectada em ambos os grupos experimentais (Figura 29E).

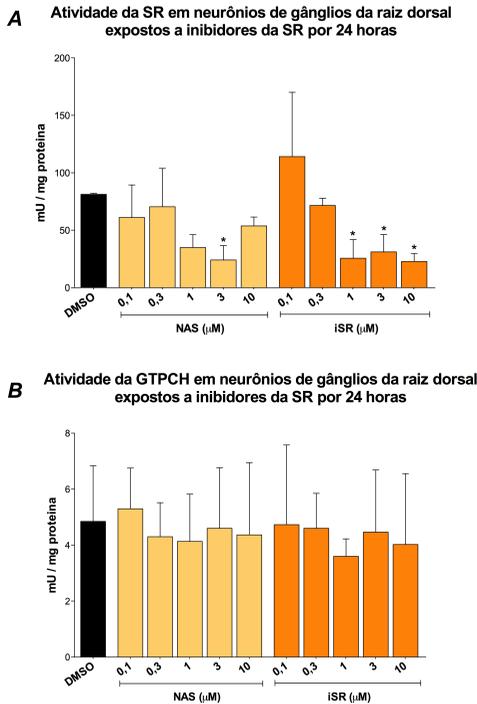
**Concentração de BH4 e seus metabólitos produzidos por neurônios de gânglios da raiz dorsal de camundongos nocaute para a enzima GTPCH**



**Figura 29:** Concentração de BH4 (A) e seus metabólitos BH2 (B), Neoptertina (C), Biopterina (D), Sepiapterina (E) e a relação entre BH2 e BH4 (F) em sobrenadante de neurônios de gânglios da raiz dorsal em camundongos KO para a enzima GTPCH. Os dados representam media  $\pm$  desvio padrão da média. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  comparados com os animais sem modificação genética (wild types; WT) (Teste  $t$  de Student para amostras independentes).

O segundo objetivo realizado durante o doutorado sanduíche foi identificar o efeito de drogas que induzem analgesia através da diminuição da produção da molécula BH4. O fundamento deste procedimento requer a inibição parcial na síntese de BH4, visto que esta é um cofator obrigatório para a produção de mediadores com relevante fisiologia, como as aminas biogênicas neurotransmissoras, dopamina e serotonina, e do óxido nítrico. Para isto, o Laboratório do Prof. Clifford Woolf junto ao Dr. Kai Johnsson da Suíça (*Institute of Chemical Sciences and Engineering, Laboratory of Protein Engineering; LPI*) desenvolveram drogas que inibem a enzima sepiapterina redutase (iSR).

Para confirmar que o efeito molecular da iSR tem como alvo a enzima SR, culturas primárias de neurônios de gânglios da raiz dorsal foram tratadas com concentrações crescentes da mesma (0,1 a 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Posteriormente, foram mensuradas as atividades das enzimas SR e GTPCH (Figuras 30A e B). Estes efeitos foram comparados com os induzidos pela N-acetil-serotonina (NAS), que recentemente foi identificada como um inibidor, embora não muito específico, da SR (Haruki et al., 2013).

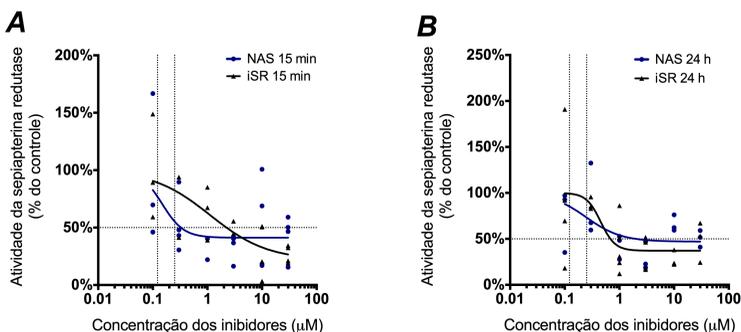


**Figura 30.** Atividade da enzima sepiapterina redutase (SR) (A) e da GTP ciclohidroxilase (GTPCH) (B) em neurônios de gânglios da raiz dorsal de camundongos C57/BL-6 tratados com N-acetil serotonina (NAS) e iSR por 24 horas nas concentrações crescentes de 0,1, 0,3, 1, 3 e 10  $\mu\text{M}$ . Os dados representam media  $\pm$  desvio padrão da media. \* $P < 0,05$  comparados com o grupo DMSO (composto utilizado para a solubilização das drogas) (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

Pode-se observar na Figura 30A que as concentrações de 1, 3 e 10  $\mu\text{M}$  de iSR causaram inibição significativa na atividade da SR [ $F_{(6,13)} = 9,646$ ;  $P < 0.05$ ], e que o NAS promove inibição da enzima SR apenas na concentração de 3  $\mu\text{M}$  [ $F_{(6,14)} = 5,118$ ;  $P < 0.05$ ]. Além disso, tanto a NAS como a iSR não afetaram a atividade da GTPCH (Figura 30B).

A Figura 31 mostra o cálculo da IC 50 na atividade da sepiapterina redutase utilizando concentrações crescentes dos inibidores NAS e iSR por 15 minutos (Figura 31A) e por 24 horas de incubação (Figura 31B).

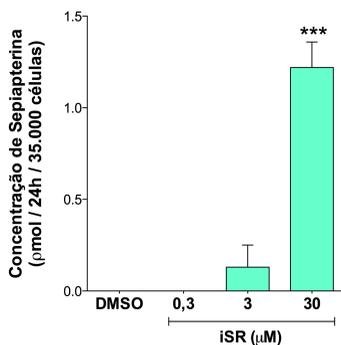
#### Cálculo da IC 50 para os inibidores da sepiapterina redutase NAS e iSR



**Figura 31.** Cálculo da IC 50 para os inibidores da sepiapterina redutase NAS e iSR após 15 minutos (A) e 24 horas de incubação (B).

Ainda, foi mensurada a concentração de sepiapterina presente no sobrenadante dos neurônios tratados com iSR. Pode-se observar na Figura 32 que o tratamento com 30  $\mu\text{M}$  de iSR aumenta significativamente a concentração de sepiapterina no sobrenadante das células. Isto ocorre devido a inibição na enzima SR, enzima presente na via de salvação de BH4. Isto representa um achado inédito e que poderá ser empregado como biomarcador para o correto tratamento farmacológico em situações de dor crônica. Desta forma, a identificação deste metabólito nestas condições foi submetido como patente.

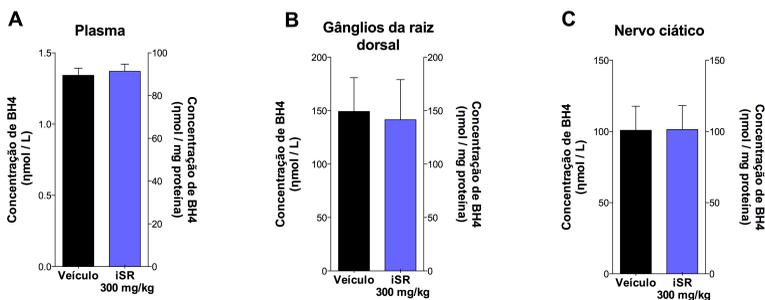
Concentração de sepiapterina em sobrenadante de neurônios de gânglios da raiz dorsal de camundongos C57/BL-6 tratados com iSR por 24 horas



**Figura 32.** Concentração de sepiapterina em sobrenadante de neurônios de gânglios da raiz dorsal de camundongos C57/BL-6 tratados com 0,3, 3 e 30  $\mu\text{M}$  de iSR por 24 horas. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão da média. \*\*\* $P < 0,001$  comparados com o grupo DMSO (composto utilizado para a solubilização das drogas) (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey).

Após a realização dos experimentos *in vitro* citados anteriormente, decidiu-se testar os efeitos da iSR no metabolismo da BH4 em sistemas *in vivo*. Para isto, camundongos C57/BL-6 foram submetidos a um modelo de dor neuropática através da injúria do nervo ciático. Após 7 dias da injúria, os camundongos receberam a administração intraperitoneal de iSR na dose de 300 mg/kg. Pode-se observar na Figura 33 que não houve diferença significativa na concentração da molécula BH4 em plasma (Figura 33A), homogenato de gânglios da raiz dorsal (Figura 33B) e de nervo ciático (Figura 33C) destes animais após a administração da iSR. Isto sugere fortemente um efeito específico da droga no local da lesão neuropática.

**Concentração de BH4 em plasma, homogenato de gânglios da raiz dorsal e nervo ciático após administração intraperitoneal de iSR (300mg/kg) em camundongos C57/BL-6 submetidos ao modelo de injúria do nervo**

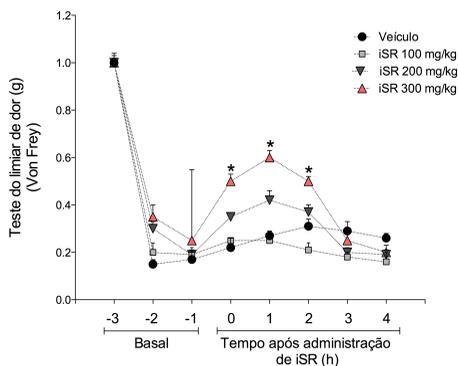


**Figura 33.** Concentração de BH4 em plasma (A), gânglios da raiz dorsal (L3, L4 e L5) (B) e nervo ciático (C) após administração por via intraperitoneal de iSR (300 mg/kg) em camundongos C57/BL-6 submetidos ao modelo de injúria do nervo ciático. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão da média. (Teste *t* de Student para amostras independentes).

Além disso, a Figura 34 mostra a indução de analgesia pela administração intraperitoneal de concentrações crescentes de iSR (100 a 300 mg/kg) nos animais submetidos a injúria do nervo. Pode-se observar uma diferença significativa no limiar da dor quando administrada a iSR na concentração de 300 mg/kg.

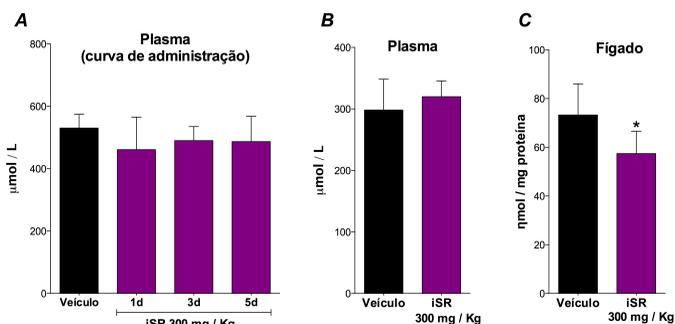
Para comprovar que a inibição da SR estaria ativando uma via alternativa para manter uma concentração basal e necessária de BH4, foi avaliada a concentração de fenilalanina no plasma e no fígado destes animais. Pode-se observar, como o esperado, que não há o acúmulo deste aminoácido no plasma quando a enzima SR está inibida (Figura 35A e B). Por outro lado, uma diminuição significativa de fenilalanina foi observada no fígado (Figura 35C) [ $t_{(11)} = 2,529$ ;  $P < 0.05$ ].

**Indução de analgesia pela administração de iSR em animais submetidos a lesão do nervo ciático**



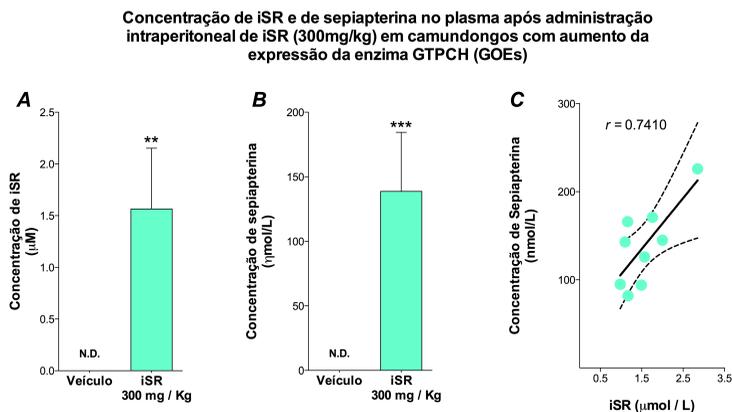
**Figura 34.** Indução de analgesia pela administração de iSR por via intraperitoneal em camundongos C57/BL-6 submetidos ao modelo de injúria do nervo ciático. iSR foi administrada 7 dias após a injúria do nervo ciático. A analgesia foi mensurada através do teste de Von Frey. \* $P < 0,05$  comparados com o grupo veículo (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Fisher).

**Concentração de fenilalanina em plasma e fígado após administração intraperitoneal de iSR (300mg/kg) em camundongos C57/BL-6 submetidos ao modelo de injúria do nervo**



**Figura 35.** Concentração de fenilalanina (Phe) presente no plasma (A e B) e no fígado (C) após 3 administrações intraperitoneais consecutivas de iSR na dose de 300 mg/kg em camundongos C57/BL-6 submetidos ao modelo de injúria do nervo ciático. O painel A representa as concentrações de Phe nos dias 1, 3 e 5 após a administração de iSR, e os painéis B e C representam a concentração no 5º dia de administração. Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão da média. \* $P < 0,05$  comparados com o grupo que recebeu salina (Veículo). (Painel A: ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Tukey; Painéis B e C: Teste *t* de Student para amostras independentes).

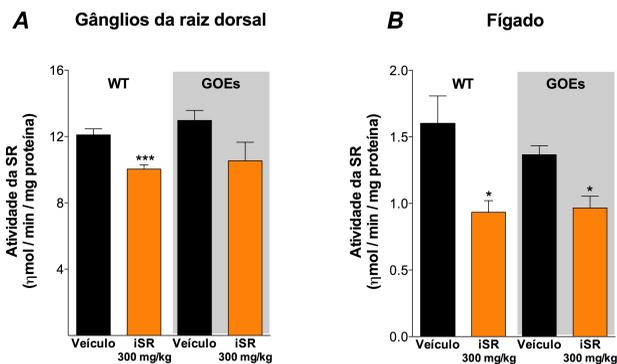
Ainda, pode ser observado na Figura 36A um aumento na concentração de iSR na circulação sanguínea após administração desta droga intraperitonealmente (300 mg/kg) nos animais GOEs [ $t_{(10)}= 4,465$ ;  $P<0.01$ ] e também um acúmulo plasmático de sepiapterina (Figura 36B) [ $t_{(10)}= 5,082$ ;  $P<0.001$ ]. Além disso, pode ser observado que há uma correlação positiva entre as concentrações de iSR e a formação de sepiapterina no plasma (Figura 36C).



**Figura 36.** Concentração de iSR (A) e de sepiapterina (B) no plasma após administração por via intraperitoneal de iSR (300 mg/kg) em animais com aumento da expressão da enzima GTPCH1 (GOEs). Foi calculada a correlação entre a concentração de iSR e a de sepiapterina no plasma (C). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão da média. \*\* $P<0,01$ ; \*\*\* $P<0,001$  comparados com os animais sem administração de iSR (Veículo). (Teste  $t$  de Student para amostras independentes).

Por fim, a Figura 37 mostra a atividade da enzima SR após a administração intraperitoneal de iSR (300 mg/kg) nos gânglios da raiz dorsal (Figura 37A) e no fígado (Figura 37B) dos animais GOEs e WT. Pode ser observado uma diminuição na atividade da SR nos gânglios da raiz dorsal dos animais WT [ $t_{(4)}= 4,608$ ;  $P<0.01$ ] e também no fígado dos animais tanto WT [ $t_{(4)}= 2,949$ ;  $P<0.05$ ] quanto GOEs [ $t_{(4)}= 3,618$ ;  $P<0.05$ ].

Atividade da SR em gânglios da raiz dorsal e no fígado após administração intraperitoneal de iSR (300mg/kg) em camundongos com aumento da expressão da enzima GTPCH (GOEs)



**Figura 37.** Atividade da sepiapterina redutase (SR) em gânglios da raiz dorsal (A) e no fígado (B) após administração por via intraperitoneal de iSR (300 mg/kg) em animais com aumento da expressão da enzima GTPCH (GOEs) e em animais sem modificação genética (wild types; WT). Os dados representam média  $\pm$  desvio padrão da média. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$  comparados com os animais sem administração de iSR (Veículo). (Teste *t* de Student para amostras independentes).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 BIOENERGÉTICA E METABOLISMO DE PTERINAS NA HIPERGLICEMIA CRÔNICA E A SUA RELAÇÃO COM A DOENÇA DE PARKINSON

A hiperglicemia crônica é a principal característica do DM, o qual é uma síndrome de etiologia múltipla decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos (Han et al., 2007; Malecki e Skupien, 2008). As complicações do DM estão caracterizadas por microvasculopatias que incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia central e periférica, as quais predis põem as complicações macrovasculares, caracterizadas por doença coronária, doença vascular periférica, infarto em tecidos periféricos e no SNC, e amputações nos membros inferiores, sendo estas as principais causas de óbito nos afetados. A natureza crônica, a gravidade das suas complicações e o número de indivíduos acometidos (11,6 milhões de diabéticos no Brasil e 387 milhões de diabéticos no mundo), tem tornado o DM um problema de saúde pública (IDF, 2014). Além disso, o DM tem sido considerado como um fator de risco para a predisposição para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e, principalmente a doença de Parkinson (Hu et al., 2007; Kroner, 2009). A incidência destas doenças neurodegenerativas parece ser maior em indivíduos portadores de DM2 (Santiago e Potashkin, 2013) os quais possuem um risco de 36% de desenvolver DP (Hu et al., 2007; Xu et al., 2011). Alguns estudos de coorte demonstraram uma correlação positiva entre pacientes portadores de DP e de DM2, indicando que 62% dos pacientes afetados pela DP que apresentam demência, são resistentes a insulina (Hu et al., 2007; Xu et al., 2011; Bosco et al., 2012). Interessantemente, pacientes portadores das duas doenças parecem ter sintomas motores mais graves (Schernhammer et al., 2011). Além disso, o DM2 contribui para a instabilidade postural e dificuldade na marcha em pacientes com PD (Kotagal et al., 2013). Contudo, existem várias evidências de que o DM está intimamente relacionado com a progressão da DP, e que estas duas doenças compartilham mecanismos comuns a níveis celulares e moleculares (Aviles-Olmos et al., 2013; Santiago e Potashkin, 2013).

Neste sentido, seria viável esperar que durante condições de hiperglicemia crônica, como acontece no DM, proteínas chaves no metabolismo energético resultem em alvos celulares dos oxidantes MG

e/ou AGEs, criando desta forma, um cenário propício para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, em particular a DP. Além disso, o estado de hiperglicemia crônica estaria favorecendo a ocorrência de alterações epigenéticas no SNC, agravando ainda mais o cenário para o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas crônicas ou predispondo a condições de maior nocicepção.

Para isto, a hiperglicemia crônica neste estudo foi induzida através da administração intraperitoneal de STZ em ratos Wistar adultos (Remor et al., 2011). Neste modelo, a persistência de altas concentrações de glicose no interior das células leva a uma condição definida como neurotoxicidade da glicose (Tomlinson e Gardiner, 2008b), a qual altera o metabolismo celular, causando o aumento da via do poliol, das hexosaminas, da ativação de PKC e da formação de AGEs (Brownlee, 2005). Por outro lado, este modelo além de gerar neurotoxicidade através da hiperglicemia persistente, também gera lipotoxicidade devido a falta de sinalização da insulina (Poitout e Robertson, 2002).

Os resultados obtidos neste trabalho doutoral demonstram que a hiperglicemia crônica causa uma desregulação bioenergética tanto central quanto periférica, induzida pela inibição da respiração mitocondrial, aumento da atividade de enzimas chaves do metabolismo como a CK, e indução de estresse oxidativo, apoptose e inflamação. Além disso, estas alterações metabólicas ocorreram juntamente com alterações epigenéticas caracterizadas por mudanças nos padrões de metilação do DNA e ainda observadas concomitantemente com déficit cognitivo, evidenciado principalmente por prejuízos na consolidação da memória de curto e longo prazo. Estas adaptações metabólicas energéticas foram identificadas em animais hiperglicêmicos, induzidos pela administração de STZ, e/ou em amostras de indivíduos afetados por DM1, e por Doença de Parkinson. Ainda, nesse material biológico, também foi identificada uma alteração no metabolismo de pterinas, caracterizado por marcada oxidação da BH4 no líquido de animais hiperglicêmicos, e altas concentrações de neopterinina no plasma de pacientes afetados tanto por DM1 e DP. Finalmente, também foi caracterizado uma forma de induzir analgesia, que envolve inibição parcial na síntese da BH4 em um modelo animal de dor neuropática.

No que se refere a indução de estresse oxidativo neste estado hiperglicêmico crônico, evidenciamos aumento de proteínas oxidadas pelo MG no cérebro, aumento na peroxidação lipídica e diminuição dos grupamentos tiólicos em sangue, e redução das concentrações de BH4 no líquido, nos animais submetidos ao modelo experimental de

hiperglicemia crônica. Este fenômeno pode estar associado ao aumento no fluxo da via dos polióis, o qual torna os tecidos mais vulneráveis ao estresse oxidativo pela consequente diminuição das concentrações de NAD(P)H (Brownlee, 2005), cofator essencial para a manutenção das atividades de enzimas relacionadas com o metabolismo da glutatona, o principal antioxidante natural. A redução nas concentrações de BH<sub>4</sub> - molécula que parece apresentar uma atividade dual, no SNC favorece a neurotransmissão e os sistemas antioxidantes, mas na periferia altas concentrações favorece o estabelecimento de estresse oxidativo (Lam e Heales, 2007) - também pode contribuir ao estado crônico de estresse oxidativo. Neste contexto, baixas concentrações de BH<sub>4</sub> tem sido demonstradas em plasma e/ou líquor de pacientes acometidos por processo crônicos incluindo DM1, alterações psiquiátricas e neurodegenerativas (Okumura et al., 2006; Foxton et al., 2007; Ota et al., 2007; Chittiprol et al., 2010). Ainda, numerosos estudos tem demonstrado que a iNOS (ou NOS-2) pode ser ativada em condições de hiperglicemia (Sobrevia et al., 1996), levando ao aumento na produção de óxido nítrico e a um rápido consumo do cofator BH<sub>4</sub>. Além disso, em condições de estresse oxidativo, a BH<sub>4</sub> pode ser oxidada a BH<sub>2</sub> e esta competir pela ligação na enzima NOS-3, visto que ambas são estruturalmente semelhantes (Landmesser et al., 2003; Crabtree e Channon, 2011). Como consequência, o acoplamento de BH<sub>2</sub> com a NOS-3 gera a produção de ânion superóxido concomitante com a formação de óxido nítrico. Assim, esta situação potencializaria a toxicidade induzida pelos altos níveis de glicose no cérebro, alterando a neurotransmissão e a fisiologia da vasculatura, contribuindo para o desenvolvimento de infarto, demência vascular ou predispor às doenças neurodegenerativas (Arvanitakis et al., 2004; Biessels et al., 2006).

Resultados prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o estado hiperglicêmico induzido pela administração de STZ causa disfunção mitocondrial periférica, e que este prejuízo é prevenido pela administração de INS (Remor et al., 2011). Estas alterações foram também confirmadas neste estudo em encéfalo de animais hiperglicêmicos, e foram expressas pelas inibições dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória (60 dias de exposição), e também por um aumento no estado IV da respiração mitocondrial em animais expostos à hiperglicemia por 10 dias. Este déficit energético poderia comprometer a viabilidade de células do SNC por desencadear apoptose, como verificado neste trabalho, e dessa forma predispor à instalação de doenças neurodegenerativas. Neste contexto, a mitocôndria possui um papel chave durante a produção de ATP, o qual é essencial para a

excitabilidade e sobrevivência dos neurônios, e qualquer mudança durante a redução do oxigênio irá favorecer a formação de EROs. Os complexos I e III da cadeia respiratória são os principais geradores de EROs (Boveris et al., 1976; Chen et al., 2003), e esta situação se intensifica quando ocorre um bloqueio durante a transferência de elétrons (Turrens e Boveris, 1980; Turrens, 1997). Além disso, as espécies reativas formadas no complexo I (no sítio redox da NADH desidrogenase) são liberadas na matriz mitocondrial (Chen et al., 2003), provocando dano oxidativo nas enzimas mitocondriais, incluindo os complexos da cadeia respiratória, enzimas do ciclo de Krebs, quinases e várias outras proteínas, bem como o DNA mitocondrial (Bandy e Davison, 1990; Zhang et al., 1990; Hausladen e Fridovich, 1994).

Por outro lado, a atividade da CK, enzima chave no metabolismo energético, se encontrou aumentada tanto no SNC como nos tecidos periféricos de animais expostos à hiperglicemia crônica. Ainda, este efeito também foi observado quando cultura primária de astrócitos corticais de rato foram expostas ao MG na concentração de 300  $\mu$ M por 3 horas e evidenciado também no plasma de indivíduos acometidos pelo DM1. A enzima CK é responsável por catalisar a reação reversível de transferência de um grupo fosforil entre o ATP e a creatina (Bessman e Carpenter, 1985). Desta forma, possui a capacidade de gerar energia em tecidos que necessitam de constante e rápido abastecimento energético, como os músculos cardíaco e esquelético e o cérebro, de uma forma muito mais rápida do que durante o processo de fosforilação oxidativa (Wallimann e Hemmer, 1994). Além disso, a localização da CK isoforma mitocondrial, permite regular o potencial de membrana mitocondrial, prevenindo dessa forma a indução do poro de transição mitocondrial (Dolder et al., 2003). Este aumento na atividade da CK poderia estar relacionado com um processo de adaptação metabólica para compensar a deficiência energética. Como foi observado um déficit energético e um aumento na ativação da caspase-3 na forma clivada nos animais que ficaram expostos a altos níveis de glicose, seria viável sugerir que o aumento na atividade da CK poderia ser um mecanismo compensatório para manter o estado energético celular, visto que não houve aumento no conteúdo proteico, nem na expressão do mRNA que codifica para esta proteína. Neste contexto, sabe-se que a expressão da CK nos diversos tecidos correlaciona de forma inversa com a capacidade de peroxidase tecidual (Meyer et al., 2006); no entanto, foi observado um aumento nesta atividade no tecido hepático após dez dias de hiperglicemia. Isto poderia estar relacionado com uma sinalização celular patológica ou ainda relacionado com

aumento da atividade da CK presente no endotélio vascular. Neste sentido, numerosos estudos sugerem que muitos genes podem sofrer mudanças epigenéticas e responder de forma diferente em condições de hiperglicemia, como por exemplo, podem aumentar a expressão de VEGF (Ishizuka et al., 2011) e NF- $\kappa$ B, o qual compromete a fosforilação oxidativa devido à formação de estresse oxidativo com consequente redução da função mitocondrial (El-Osta et al., 2008) ou diminuir os níveis de mRNA do coativador PGC-1 $\alpha$  (Mootha et al., 2003) o qual possui a capacidade de aumentar a expressão de genes responsáveis pela biogênese mitocondrial (Scarpulla, 2002). Desta forma, uma possível deficiência do PGC-1 $\alpha$  decorrente do estado hiperglicêmico, poderia resultar em diferentes alterações no metabolismo energético, tanto uma severa diminuição na atividade da cadeia transportadora de elétrons quanto um aumento na atividade da CK.

Além disso, como o aumento na atividade da CK não mostrou estar relacionado com uma maior expressão gênica ou com uma maior quantidade de proteína, pode-se concluir que poderiam existir modificações pós-traducionais que modificariam os parâmetros farmacocinéticos da enzima. Neste sentido, sabe-se que a CK possui cinco resíduos de arginina conservados em todas suas isoformas, os quais seriam alvos sensíveis do MG (para formação de AGEs), e cuja oxidação promoveria uma modificação na proteína com subsequente ganho de função, como foi previamente descrito em estudos de mutagênese dirigida para uma das argininas próxima do sítio de ligação da creatina (Tanaka e Suzuki, 2004). No entanto, não pode se descartar a possibilidade de que outras isoformas da CK possam estar reguladas positivamente como mecanismo compensatório.

Devido à deficiência na transferência de elétrons observada nos tecidos periféricos e no cérebro dos animais hiperglicêmicos, poderia se esperar um aumento na glicólise anaeróbica. No entanto, neste estudo, a atividade da HK se mostrou deficiente no tecido hepático de animais que ficaram em estado hiperglicêmico por 10 dias. Neste sentido, a deficiência da atividade da HK mitocondrial foi previamente descrita em modelos experimentais de DA com alterações na sinalização da insulina, possivelmente ocasionada pela toxicidade gerada através dos agregados proteicos característicos desta enfermidade (Saraiva et al., 2010).

A administração exógena de INS foi efetiva na prevenção das alterações observadas no metabolismo energético cerebral dos animais expostos à hiperglicemia crônica durante 60 dias. Esta propriedade protetora da insulina pode ser justificada devido ao fato de a interação

da insulina com seus receptores específicos na membrana provocam a ativação da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)-Akt (Duronio, 2008), a qual é responsável por garantir a sobrevivência das células. A proteína PTEN é uma fosfatase que defosforila a PI3K, interrompendo assim a ativação desta via. Neste sentido, a literatura tem demonstrado que a insulina diminui a expressão de PTEN e por consequência, ativaria a via da PI3K (Teshima et al., 2010).

Ainda, os experimentos relacionados com respirometria demonstraram que a mitocôndria encontra-se desacoplada no cérebro dos animais que permaneceram hiperglicêmicos por 10 dias. Este desacoplamento mitocondrial foi evidenciado pelo aumento no consumo de oxigênio no estado IV de respiração mitocondrial, que indica perda do potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ), provavelmente pelo aumento da atividade da CK. Ainda o aumento, embora não significativo (aumento de 40%; n=3) do estado III correlaciona com o aumento de CK mitocondrial, enzima encarregada de controlar o  $\Delta\psi_m$  mediante a transferência de ADP para a matriz mitocondrial (Beutner et al., 1998). Além disso, este trabalho demonstrou que 300  $\mu\text{M}$  de MG também causou um aumento no estado IV da respiração mitocondrial em células precursoras de hipocampo (H19-7). Neste sentido, estes resultados estão de acordo com resultados prévios do nosso grupo que permitiram propor que o MG atuaria como um desacoplador, por causar uma dissipação parcial do  $\Delta\psi_m$  (Glaser et al., 2014; Trabalho doutoral em Neurociências). Os desacopladores dissipam o  $\Delta\psi_m$  (Nelson e Cox, 2004) e desta forma a transferência de elétrons na cadeia respiratória é estimulada para reestabelecer este potencial, ainda que a síntese de ATP esteja bloqueada, tendo como consequência o aumento do consumo de oxigênio. Considerando que a concentração de MG em plasma de indivíduos normoglicêmicos é de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  e que em indivíduos hiperglicêmicos esta pode chegar até 6  $\mu\text{M}$  de MG (Thornalley et al., 1989), um pequeno aumento nas concentrações do metabólito já alteraria a funcionalidade da mitocôndria, levando a um aumento na produção de EROs, como observado neste estudo, e consequente disfunção mitocondrial (Shenouda et al., 2011). Em concordância, resultados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que tanto o MG quanto os AGEs causaram aumento no consumo de oxigênio mitocondrial e ainda alteração no  $\Delta\psi_m$ , mensurado através da sonda fluorescente JC-1. Esta dissipação do potencial pode levar as mitocôndrias a se fragmentarem, com o intuito de eliminar as mitocôndrias disfuncionais por posterior mitofagia. No entanto, foi

verificado que o processo de mitofagia não foi alterado, favorecendo a um acúmulo de mitocôndrias disfuncionais no interior da célula (Glaser et al., 2014; Trabalho doutoral em Neurociências). Ainda, foi observado que 300  $\mu$ M de MG causou um aumento na geração de EROs extramitocondrial. Este fenômeno provavelmente foi causado devido a uma possível diminuição na atividade do complexo I quando as células precursoras de hipocampo foram incubadas com MG. Neste sentido, sabe-se que este composto tem a capacidade de reagir com grupamentos amino livres de proteínas, modificando sua estrutura e dando origem a produtos oxidados, chamados AGEs (Ravelojaona et al., 2007; Zhang et al., 2009). Assim, o complexo I, e provavelmente outros complexos da cadeia respiratória poderiam estar sendo alvos da oxidação causada pelo toxicante MG (Rosen et al., 2001; Brownlee, 2005; Ross et al., 2013; Cardoso et al., 2014).

Após a realização destes estudos com um modelo *in vivo* de hiperglicemia crônica, o próximo passo deste trabalho avaliou a formação de AGEs e a atividade do metabolismo energético em sangue de pacientes portadores de DM1 e DP. Foi observado que pacientes DM1 apresentam altas concentrações plasmáticas de AGEs por estarem em condições de persistente hiperglicemia. Pode ser observado que quanto maior os níveis de glicose sanguínea, maior é também a quantidade de AGEs presentes na circulação destes pacientes. A atividade do complexo I e da creatinaquinase foram determinadas em linfócitos de sangue e mostraram que seu comportamento foi muito semelhante ao observado nos estudos *in vivo* com ratos Wistar. Estas alterações poderiam responder ao efeito tóxico de AGEs e/ou MG como previamente descrito por Brownlee e colaboradores (2005). Além disso, foi observada uma maior ativação do sistema imunológico devido a presença de concentrações aumentadas de neopterin em plasma dos pacientes DM1. Estudos demonstram que esta pterina se encontra elevada em pacientes com distúrbios psiquiátricos e portadores de doenças neurodegenerativas (Chittiprol et al., 2010; Leblhuber et al., 2011) e é liberada durante processos inflamatórios, incluindo os neuroinflamatórios (Zimmermann, 2001; Dale et al., 2009).

Assim, poderíamos extrapolar os resultados obtidos a partir dos modelos experimentais e dos tecidos humanos para entender a relação existente entre o DM e a maior incidência ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, incluindo a DP, DA, entre outras. Pacientes portadores das duas patologias, DM e DP, demonstram um maior risco de desenvolver demência, apresentando sintomas motores mais severos (Schernhammer et al., 2011). Além disso, o DM2 contribui

para a instabilidade postural e dificuldade na marcha em pacientes com DP (Kotagal et al., 2013). Por outro lado, aproximadamente 50% dos pacientes afetados pela DP apresentam DM ou tolerância diminuída à glicose (Barbeau et al., 1961; Boyd et al., 1971; Lipman et al., 1974; Santiago e Potashkin, 2014). Com base nisso, foi observado que os pacientes com diagnóstico confirmado para DP apresentaram um aumento na glicemia em relação aos pacientes sem histórico de doenças neurodegenerativas com a mesma faixa etária, caracterizando um estado de baixa tolerância a glicose. Este aumento nas concentrações de glicose estão contribuindo para a elevação na formação de AGEs plasmáticos destes pacientes. Estudos *post-mortem* em portadores da DP, reportam o envolvimento de estresse oxidativo em neurônios dopaminérgicos, através da produção de EROs e disfunção mitocondrial, principalmente devido a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (para revisão ver Latini et al., 2011), e que esta inibição não seria exclusiva do encéfalo, encontrando-se também em plaquetas, linfócitos e músculo esquelético dos afetados (Turrens, 1997). Neste sentido, este estudo também demonstrou uma redução na atividade do complexo I nas plaquetas de pacientes com PD, confirmando a alteração bioquímica característica desta entidade neurodegenerativa. Além disso, resultados do nosso grupo de pesquisa verificaram um aumento significativo nas concentrações de neopterin plasmática em pacientes com DP, comprovando uma maior ativação do sistema imunológico nestes pacientes (Freitas et al., 2012; Dissertação de Mestrado). Contudo, existem várias evidências de que o DM está intimamente relacionado com a progressão da DP, e que estas duas doenças compartilham mecanismos comuns a níveis celulares e moleculares (Aviles-Olmos et al., 2013; Santiago e Potashkin, 2013).

## 6.2 EFEITO DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA SOBRE PARÂMETROS COGNITIVOS E DE EPIGENÉTICA EM RATOS WISTAR ADULTOS

As alterações epigenéticas são definidas como modificações na expressão gênica, as quais não envolvem mudanças na sequência do DNA (Jirtle e Skinner, 2007; Christensen e Marsit, 2011; Peters et al., 2011). Estas alterações podem promover o desenvolvimento de fenótipo anormal e o aparecimento de eventos genéticos tais como, quebras da dupla fita de DNA, mutação e instabilidade cromossômica que podem contribuir para o aparecimento de inúmeras desordens (Sawan et al., 2008). Dentre os vários mecanismos epigenéticos conhecidos até o

momento, a metilação do DNA é uma das principais modificações epigenéticas que controla a expressão de genes em estados fisiológicos e patológicos. Neste contexto, alterações no perfil de metilação do DNA podem ocorrer em estados patológicos como no câncer e doenças metabólicas, como é o caso do DM e ainda durante processos neurodegenerativos (El-Osta et al., 2008; Barres e Zierath, 2011).

Este trabalho evidenciou um comprometimento motor e ainda prejuízos na consolidação da memória de curto e longo prazo nos animais que permaneceram hiperglicêmicos por 60 dias. Além destas alterações, foi observado um déficit na memória espacial do grupo STZ quando comparados com os demais grupos experimentais, e a administração de insulina preveniu estas alterações cognitivas. Estes achados cognitivos observados neste trabalho estão de acordo com outros estudos recentes que também demonstraram comprometimento cognitivo em roedores submetidos ao modelo de hiperglicemia induzido por STZ (Grzeda et al., 2007; Hirano et al., 2007; Ho et al., 2012). Contudo, estas alterações cognitivas provavelmente são consequências do estresse oxidativo e da severa inibição nos complexos da cadeia respiratória observados nos animais expostos à hiperglicemia crônica, os quais poderiam estar comprometendo a viabilidade dos neurônios por desencadear a apoptose e ainda estarem favorecendo o acúmulo de proteínas oxidadas por MG no encéfalo dos animais expostos à hiperglicemia persistente. Neste cenário de déficit energético e neurotoxicidade, aqui também foi demonstrado a translocação, desde o citosol para a mitocôndria, da proteína  $\alpha$ -sinucleína no hipocampo dos animais que permaneceram hiperglicêmicos por um período de 60 dias. A  $\alpha$ -sinucleína é uma proteína pré-sináptica e nativamente citosólica. Em situações de estresse celular com consequente diminuição do pH intracelular (Cole et al., 2008), esta proteína tende a translocar desde o citosol e se ligar nos lipídeos presentes nas membranas mitocondriais interna e externa, formando agregados intramitocondriais (Pham e Cappai, 2013). Segundo Bir e colaboradores (2014), a translocação da  $\alpha$ -sinucleína para o interior da mitocôndria também está relacionada com a abertura do poro de transição mitocondrial (PTP). Uma vez que este poro se abre, os prótons presentes no espaço intermembranas são dissipados, causando diminuição do  $\Delta\psi_m$  mitocondrial (Kim et al., 2003). Contudo, inúmeros estudos vem demonstrando que a diminuição do  $\Delta\psi_m$  está sendo apontado como um mecanismo de citotoxicidade, por ocasionar um aumento na formação de EROs, levando a uma situação de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, um dos principais mecanismos patogênicos propostos na DP (Cookson e van der

Brug, 2008; Schapira e Gegg, 2011; Nakamura, 2013), podendo levar as células à apoptose ou necrose (Bir et al., 2014). Ainda, o estresse oxidativo gerado pelo desacoplamento mitocondrial, parece estar também relacionado com alterações epigenéticas e a predisposição para o desenvolvimento de DM e de suas complicações vasculares (Nokoff e Rewers, 2013; Pezzolesi e Krolewski, 2013). Estudos clínicos e experimentais tem demonstrado que fatores ambientais e os nutrientes ingeridos durante o desenvolvimento embrionário, podem provocar modificações epigenéticas e regular a expressão de genes relacionados com a aparição de DM (Ling e Groop, 2009; Sharma et al., 2010). Além disso, tem sido demonstrado que as alterações epigenéticas podem resultar de uma única situação aguda de hiperglicemia, fenômeno conhecido como “memória metabólica” (El-Osta et al., 2008).

Neste sentido, este estudo evidenciou um aumento na metilação global do DNA e uma hipometilação na região promotora do LINE-1 no hipocampo dos animais que permaneceram sob condições de hiperglicemia por 60 dias, e estas alterações foram prevenidas com a administração de insulina exógena. Sabe-se que os padrões de metilação do genoma são alterados com a existência de patologias de curso crônico e, geralmente é observada a hipermetilação de algumas ilhas CpG distribuídas em seqüências repetitivas, bem como em alguns genes transcricionalmente relevantes (Fraga et al., 2005). Ainda, eventos de hipometilação no LINE-1 estão diretamente associados a uma maior instabilidade genômica, provocando alterações e/ou desregulação da expressão gênica. Sendo assim, a persistência de altas concentrações de glicose no interior das células neurais poderia favorecer a instabilidade genômica e a hipermetilação global do DNA observadas neste estudo (Pirola et al., 2010; Keating e El-Osta, 2012; Tros et al., 2014; Wegner et al., 2014). Estas mudanças no padrão de metilação permitem a ocorrência de mutações mais facilmente (Burzynski, 2005), e parecem estar diretamente envolvidas com o aumento da expressão de determinados genes, como por exemplo o NF- $\kappa$ B (Kuroda et al., 2009), o qual tem papel chave na expressão de diversos genes pró-inflamatórios que contribuem para o desenvolvimento das principais complicações vasculares no DM (Siebel et al., 2010; Tonna et al., 2010; Keating e El-Osta, 2012).

Ainda, o REST é considerado um fator protetor dos neurônios durante o envelhecimento. Isto porque este fator de transcrição é um repressor de genes neuronais muito expresso durante a fase de desenvolvimento embrionário. Após este período, a expressão de REST é silenciada e este fator permanece silenciado durante a fase adulta.

Alguns estudos vem demonstrando que durante o envelhecimento a expressão de REST volta a surgir e está muito associada com a preservação de funções cognitivas e o aumento da longevidade (Schoenherr e Anderson, 1995; Ballas et al., 2005). Neste estudo, foi evidenciado uma diminuição na expressão do gene que codifica para a proteína REST nos animais que permaneceram hiperglicêmicos por 60 dias. Corroborando com este achado, pode-se evidenciar um aumento na expressão do gene que codifica para a forma truncada desta proteína (REST-4). Segundo Lu e colaboradores (2014), em pacientes idosos portadores da DA, a expressão deste fator de transcrição está significativamente diminuída em relação a pacientes idosos que não possuem alguma doença neurodegenerativa comprovada. Dessa forma, o estado de ativação de REST, durante o envelhecimento, poderia distinguir fenômenos de neuroproteção e/ou de neurodegeneração no cérebro (Lu et al., 2014). Além disso, a região promotora de REST encontrou-se hipermetilada no hipocampo dos animais hiperglicêmicos, sendo esta mais uma evidência de que a persistente hiperglicemia está diretamente envolvida com os eventos de hipermetilação do DNA. Assim, pode-se propor que as alterações epigenéticas induzidas pela hiperglicemia crônica poderiam ser, em parte, responsáveis pelos eventos de neurodegeneração identificadas neste modelo.

### 6.3 PAPEL PERIFÉRICO DO METABOLISMO DAS PTERINAS NA FISIOPATOLOGIA DA DOR NEUROPÁTICA

Lesões no sistema somatossensório podem levar a percepções tanto negativas, definidas como a perda de sensibilidade, quanto a percepções positivas, como por exemplo, a sensação de dor exagerada (Costigan et al., 2009). A dor crônica inflamatória e/ou neuropática diferencia-se das condições de dor aguda por resultar de uma disfunção ou dano ao sistema nervoso central ou periférico, e persistir por dias, meses, ou até anos após a injúria do nervo (Zimmermann, 2001; Loeser e Treede, 2008; Somers e Clemente, 2009). Ainda, a dor neuropática pode ser caracterizada por períodos de dor contínua (sensação de queimação), dor espontânea (rajadas de dor) e dor intensa em resposta a situações não dolorosas (alodinia) ou sensação elevada a estímulos dolorosos (hiperalgesia) (Costigan et al., 2009).

A dor neuropática periférica, resulta de lesões no sistema nervoso periférico, as quais podem ser causadas por trauma mecânico, químicos neurotóxicos, infecções, e numerosas patologias de curso crônico, incluindo as doenças neurodegenerativas do envelhecimento,

câncer, doenças cardiovasculares, doenças reumáticas e DM (Woolf e Mannion, 1999; Dworkin et al., 2003). Neste sentido, a dor neuropática é uma condição neurodegenerativa que envolve aproximadamente 50% das pessoas acometidas pelo DM (Wild et al., 2004; Yang et al., 2010) e entre 40% e 85% dos pacientes portadores da DP (Broen et al., 2012; Fil et al., 2013). No caso da DP, os pacientes relatam que a dor prejudica severamente a qualidade de vida, pois os sintomas são mais angustiante do que os próprios sintomas motores desta enfermidade (Truini et al., 2013). A dor nos pacientes portadores da DP afeta principalmente o lado do corpo com sintomas motores predominantes e é mais comum em pacientes do sexo feminino do que do sexo masculino (54% e 45%, respectivamente). Contudo, os tratamentos existentes até hoje para combater a dor neuropática oferecem apenas eficácia moderada e numerosos efeitos adversos, principalmente a dependência química (Finnerup et al., 2005; Costigan et al., 2012). Além disso, nas últimas décadas foram desenvolvidos novos analgésicos, mas poucos deles foram racionalmente e quimicamente projetados para o tratamento da dor, e sim descobertos acidentalmente (Kissin, 2010).

Por muitos anos, cientistas tem procurado por mensageiros químicos que agem como mediadores na via de sinalização indutora da sensação de dor, e a BH4 tem apresentado grande destaque em seu envolvimento nos processos de nocicepção (Tegeder et al., 2006). Neste sentido, estudos já demonstraram que após lesão no nervo ciático em camundongos, os neurônios exibem um marcado e duradouro aumento na expressão do gene que codifica para a GTPCH (enzima limitante na *síntese de novo* da BH4), do conteúdo proteico e da atividade desta enzima, e como consequência, um aumento nas concentrações locais de BH4 (Tegeder et al., 2006; Latremoliere e Costigan, 2011). Por outro lado, estudos utilizando um inibidor da enzima GTPCH (DAHP; 2,4-diamino-6-hidroxipirimidine), o qual é seletivo porém com pouca afinidade (IC<sub>50</sub> 0,3 mM), causa uma diminuição nas concentrações de BH4 e produz analgesia em roedores que sofreram lesão no nervo ciático, confirmando a ação pró-nociceptiva do excesso da produção de BH4 no sistema somatossensório (Tegeder et al., 2006). Contudo, pode-se concluir que a diminuição na síntese de BH4 durante condições de dor inflamatória e/ou neuropática é um alvo promissor para contornar esta enfermidade. Neste sentido, este estudo identificou o efeito de drogas que induzem analgesia através da diminuição da produção da molécula BH4. O fundamento deste procedimento requer a inibição parcial da síntese de BH4 apenas no sistema nervoso periférico, utilizando um inibidor que não ultrapasse a barreira hematoencefálica,

visto que a BH4 é um cofator obrigatório para a produção de mediadores com relevante fisiologia, como as aminas biogênicas neurotransmissoras, dopamina e serotonina, e do ON. Para isto, o Laboratório do Prof. Clifford Woolf junto ao Laboratório do Dr. Kai Johnsson da Suíça desenvolveram drogas que inibem a enzima SR, a qual também participa da *síntese de novo* e de *salvação* da BH4, sendo *downstream* da enzima GTPCH.

Pode ser observado neste estudo, que o inibidor em teste (iSR; inibidor da SR) diminuiu significativamente a atividade da enzima SR em neurônios de gânglios da raiz dorsal de camundongos nas doses de 1, 3 e 10  $\mu\text{M}$ , e ainda produziu analgesia em camundongos que sofreram lesão no nervo ciático (300 mg/kg, via intraperitoneal). Ainda, estes efeitos foram comparados com os induzidos pela N-acetil-serotonina (NAS), que recentemente foi identificada como um inibidor, embora não muito específico da SR (IC<sub>50</sub> de 3,1  $\mu\text{M}$ ) (Haruki et al., 2013). Como previsto, o tratamento com o NAS causou inibição na atividade da SR apenas na dose de 3  $\mu\text{M}$ . Além disso, foi observado um aumento na concentração de sepiapterina no sobrenadante de neurônios dos gânglios da raiz dorsal quando incubados com 3 e 30  $\mu\text{M}$  de iSR durante 24 horas. Além disso, a administração intraperitoneal de iSR na dose de 300 mg/kg nos camundongos que sofreram lesão no nervo ciático, além de causar analgesia, também causou um aumento na concentração de sepiapterina no plasma e em homogenato de gânglios da raiz dorsal e de nervo ciático. Ainda, o aumento na concentração plasmática de sepiapterina também foi observado após administração de iSR nos animais com aumento na expressão de GTPCH (GOEs). Este aumento na concentração de sepiapterina é consequência da inibição da enzima SR, e interessantemente correlaciona com as concentrações que o iSR atinge no sangue (Blau et al., 2001). O acúmulo deste intermediário pode então ser proposto como biomarcador sensível para monitorar tratamentos farmacológicos inovadores que empreguem a inibição da SR como alvo molecular. Neste contexto, deve ser salientado que em condições fisiológicas a sepiapterina – metabólito intermediário - nunca se acumula, visto que rapidamente é transformada em BH4 durante a *síntese de novo* e na *via de salvação*. Nesta última, a própria SR e outras enzimas inespecíficas como as aldose redutases e/ou carbonil redutases podem transformar 6-piruvoil-tetrahidrobiopterina e/ou sepiapterina em BH2 e esta, posteriormente ser reduzida em BH4 pela ação da enzima DHFR (Blau et al., 2001). Sendo assim, esta *via de salvação* pode produzir quantidades suficientes de BH4 no fígado, onde existe uma alta atividade de DHFR, pra suprir a funcionalidade das enzimas que

utilizam esta molécula como cofator essencial, como por exemplo a fenilalanina hidroxilase, quando a SR é inibida (Blau et al., 2001). Para comprovar o efeito específico do iSR, este estudo demonstrou que após a inibição da enzima SR, identificada pelo acúmulo de sepiapterina, não houve acúmulo do aminoácido fenilalanina no plasma nos animais que sofreram lesão do nervo ciático.

## 7 CONCLUSÕES

### CAPÍTULO I:

- A hiperglicemia crônica provocou inibições nas atividades dos complexos da cadeia respiratória e um aumento na atividade da CK no cérebro e/ou tecidos periféricos em animais que permaneceram hiperglicêmicos por 60 dias. O aumento na atividade da CK se deve provavelmente como mecanismo compensatório para a deficiência energética observada;
- A persistente hiperglicemia induziu ao estresse oxidativo sistêmico e central;
- A administração de insulina protegeu as alterações no metabolismo energético celular, mas não foi efetiva na prevenção de estresse oxidativo;
- Pacientes acometidos por DM1 apresentaram inibições na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético similares as apresentadas nos experimentos *in vivo*. Além disso, estes pacientes demonstraram uma maior formação de AGEs e ativação do sistema imunológico;
- Pacientes acometidos por DP apresentaram inibição na atividade do complexo I mitocondrial, maior formação de AGEs e tolerância diminuída a glicose.

### CAPÍTULO II:

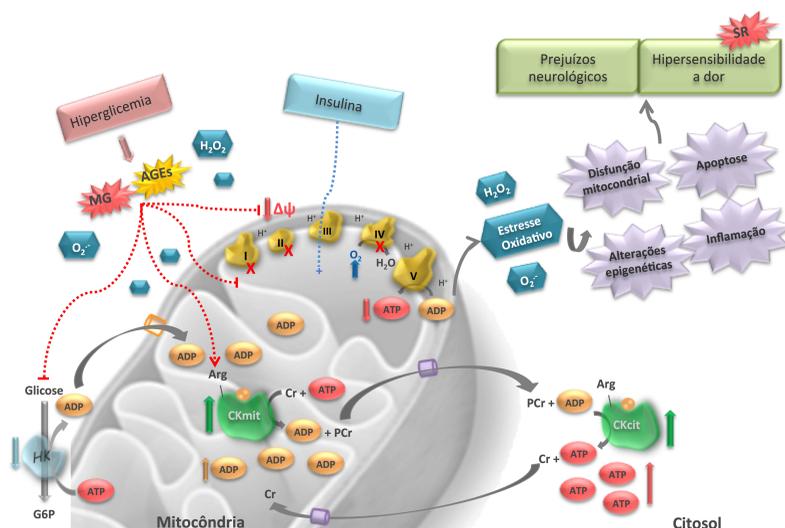
- A hiperglicemia crônica comprometeu a consolidação da memória de curta e longa duração em animais hiperglicêmicos e a administração de INS preveniu apenas o déficit na memória de longa duração;
- A persistente hiperglicemia provocou apoptose no córtex cerebral e induziu a redistribuição subcelular da  $\alpha$ -sinucleína no hipocampo;
- Induziu alterações epigenéticas caracterizadas pela hipermetilação global do DNA e instabilidade genômica, além de diminuir a expressão de REST como mecanismo de neurodegeneração.

### CAPÍTULO III:

- O aumento nas concentrações de BH4 induziram ao aumento das sensações dolorosas e a inibição na síntese desta molécula pela iSR causou diminuição na hipersensibilidade a dor;
- As concentrações basais de BH4 necessárias para a síntese de neurotransmissores foram compensadas por uma via alternativa, a via de salvação;
- O acúmulo de sepiapterina após inibição da SR representa um achado inédito e pode ser empregado como biomarcador para o correto tratamento farmacológico em situações de dor crônica.

## 8 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a hiperglicemia crônica causa uma adaptação bioenergética tanto central quanto periférica, acompanhada de estresse oxidativo, apoptose e modificações epigenéticas. Estas alterações observadas podem ser devido a oferta constante do toxicante MG e/ou AGEs no interior das células do SNC derivados da persistente hiperglicemia, e este cenário parece ser um gatilho para induzir a instalação e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e/ou neurológicas, em particular a DP, e/ou predispor a nocicepção.



**Figura 38. Efeitos celulares envolvidos durante a hiperglicemia crônica.** As altas concentrações de glicose sanguínea causam uma adaptação bioenergética tanto central quanto periférica acompanhada de estresse oxidativo, apoptose e modificações epigenéticas, e este cenário parece ser um gatilho para induzir a instalação e o desenvolvimento das doenças neurodegenerativas e/ou predispor a nocicepção.

## 9 PERSPECTIVAS

Serão realizados experimentos adicionais para complementar e aprimorar a qualidade dos resultados apresentados neste trabalho doutoral. Para isto, serão analisados os seguintes parâmetros:

1) Mensurar a atividade da CK (cerebral, cardíaca e muscular) no cérebro de animais hiperglicêmicos por um método alternativo que envolve detecção eletroquímica (dependente de pH) com o intuito de confirmar os dados obtidos pelo método padrão de espectrofotometria, empregado neste trabalho (Schlattner et al., 2000). Ainda, pretende-se quantificar as diferentes isoformas de CK para identificar se realmente a isoforma cerebral estaria relacionada com a maior atividade enzimática observada no cérebro dos animais hiperglicêmicos. Estes experimentos adicionais serão realizados no Laboratório do Prof. Uwe Schlatter, no *Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics* na *University Joseph Fourier*, Grenoble, França;

2) O toxicante MG, formado em condições de hiperglicemia crônica, poderia ocasionar modificações e/ou oxidações em algumas proteínas, como por exemplo a proteína reguladora do metabolismo energético, proteína quinase dependente de AMP (AMPK). Isto porque esta proteína possui 3 resíduos de arginina no sítio de ligação do AMP que são sensíveis a ação deste composto (Gugliucci, 2009). Uma vez oxidada, a AMPK poderia perder sua capacidade de sensor baixas quantidades de energia e proporcionar a ativação da CK para compensar. Para verificar esta hipótese, a enzima AMPK purificada será oxidada a partir de incubação desta com o oxidante MG para formar (AGE-AMPK). Após oxidação, linhagens gliais e neuronais serão incubadas com AGE-AMPK e/ou metformina (scavenger de MG) para posterior avaliação da atividade da CK.

## 10 REFERÊNCIAS

- ADA (2012) American Diabetes Association. *Diabetes care* 35::S64-71.
- Ahmed N, Ahmed U, Thornalley PJ, Hager K, Fleischer G, Munch G (2005) Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *Journal of neurochemistry* 92:255-263.
- Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA (2004) Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Archives of neurology* 61:661-666.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS (2001) Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358:221-229.
- Aviles-Olmos I, Limousin P, Lees A, Foltynie T (2013) Parkinson's disease, insulin resistance and novel agents of neuroprotection. *Brain : a journal of neurology* 136:374-384.
- Babcock GT, Wikstrom M (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356:301-309.
- Ballas N, Grunseich C, Lu DD, Speh JC, Mandel G (2005) REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 121:645-657.
- Bandy B, Davison AJ (1990) Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free radical biology & medicine* 8:523-539.
- Barbeau A, Giguere R, Hardy J (1961) [Clinical experience with tolbutamide in Parkinson's disease]. *L'union medicale du Canada* 90:147-151.
- Barres R, Zierath JR (2011) DNA methylation in metabolic disorders. *The American journal of clinical nutrition* 93:897S-900.
- Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rotig A, Rustin P, Tzagoloff A (2002) Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286:53-63.
- Baynes JW, Dominiczak MH (2007) *Bioquímica Médica*. Rio de Janeiro: Mosby.
- Baynes JW, Thorpe SR (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48:1-9.
- Beisswenger BG, Delucia EM, Lapoint N, Sanford RJ, Beisswenger PJ (2005) Ketosis leads to increased methylglyoxal production on the Atkins diet. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043:201-210.

- Bessman SP, Carpenter CL (1985) The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* 54:831-862.
- Beutner G, Ruck A, Riede B, Brdiczka D (1998) Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochimica et biophysica acta* 1368:7-18.
- Biemel KM, Reihl O, Conrad J, Lederer MO (2001) Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes: unraveling the structure of a pentosidine precursor. *The Journal of biological chemistry* 276:23405-23412.
- Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Muller M, Nawroth PP (1997) Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96:2262-2271.
- Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P (2006) Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5:64-74.
- Bir A, Sen O, Anand S, Khemka VK, Banerjee P, Cappai R, Sahoo A, Chakrabarti S (2014) alpha-Synuclein-induced mitochondrial dysfunction in isolated preparation and intact cells: Implications in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*.
- Bittl JA, Ingwall JS (1985) Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A <sup>31</sup>P NMR magnetization transfer study. *The Journal of biological chemistry* 260:3512-3517.
- Bjerrum OJ, Heegaard NHH (1988) CRC handbook of immunoblotting of proteins.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 62:63-88.
- Blau N, Bonafe L, Thony B (2001) Tetrahydrobiopterin deficiencies without hyperphenylalaninemia: diagnosis and genetics of dopa-responsive dystonia and sepiapterin reductase deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 74:172-185.
- Bonafe L, Thony B, Penzien JM, Czarnecki B, Blau N (2001) Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *American journal of human genetics* 69:269-277.

- Bosco D, Plastino M, Cristiano D, Colica C, Ermio C, De Bartolo M, Mungari P, Fonte G, Consoli D, Consoli A, Fava A (2012) Dementia is associated with insulin resistance in patients with Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences* 315:39-43.
- Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *The Biochemical journal* 156:435-444.
- Boyd AE, 3rd, Lebovitz HE, Feldman JM (1971) Endocrine function and glucose metabolism in patients with Parkinson's disease and their alternation by L-Dopa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 33:829-837.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and tissue research* 318:121-134.
- Broen MP, Braaksma MM, Patijn J, Weber WE (2012) Prevalence of pain in Parkinson's disease: a systematic review using the modified QUADAS tool. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 27:480-484.
- Brownlee M (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual review of medicine* 46:223-234.
- Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820.
- Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54:1615-1625.
- Burzynski SR (2005) Aging: gene silencing or gene activation? *Medical hypotheses* 64:201-208.
- Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine* 29:222-230.
- Capaldi RA (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 59:569-596.
- Cardoso S, Carvalho C, Marinho R, Simoes A, Sena CM, Matafome P, Santos MS, Seica RM, Moreira PI (2014) Effects of methylglyoxal and pyridoxamine in rat brain mitochondria bioenergetics and oxidative status. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 46:347-355.
- Casazza JP, Felver ME, Veech RL (1984) The metabolism of acetone in rat. *The Journal of biological chemistry* 259:231-236.

- Cassina A, Radi R (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328:309-316.
- Castro AA, Wiemes BP, Matheus FC, Lapa FR, Viola GG, Santos AR, Tasca CI, Prediger RD (2013) Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. *Brain research* 1513:103-116.
- Cereda E, Barichella M, Pedrolli C, Klersy C, Cassani E, Caccialanza R, Pezzoli G (2012) Diabetes and risk of Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*.
- Ceriello A, Ihnat MA, Thorpe JE (2009) Clinical review 2: The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94:410-415.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.
- Chang T, Wu L (2006) Methylglyoxal, oxidative stress, and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 84:1229-1238.
- Channon KM (2004) Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends in cardiovascular medicine* 14:323-327.
- Chaplen FW, Fahl WE, Cameron DC (1998) Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:5533-5538.
- Cheer K, Shearman C, Jude EB (2009) Managing complications of the diabetic foot. *BMJ* 339:b4905.
- Chen BS, Wu SN (2011) Functional role of the activity of ATP-sensitive potassium channels in electrical behavior of hippocampal neurons: experimental and theoretical studies. *Journal of theoretical biology* 272:16-25.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry* 278:36027-36031.
- Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JW, Vaughan DE (1998) Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-

- I promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 273:8225-8231.
- Chin MH, Qian WJ, Wang H, Petyuk VA, Bloom JS, Sforza DM, Lacan G, Liu D, Khan AH, Cantor RM, Bigelow DJ, Melega WP, Camp DG, 2nd, Smith RD, Smith DJ (2008) Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis revealed by proteomic and transcriptomic analyses of the striata in two mouse models of Parkinson's disease. *Journal of proteome research* 7:666-677.
- Chittiprol S, Venkatasubramanian G, Neelakantachar N, Babu SV, Reddy NA, Shetty KT, Gangadhar BN (2010) Oxidative stress and neopterin abnormalities in schizophrenia: a longitudinal study. *Journal of psychiatric research* 44:310-313.
- Christensen BC, Marsit CJ (2011) Epigenomics in environmental health. *Frontiers in genetics* 2:84.
- Cole NB, Dieuliis D, Leo P, Mitchell DC, Nussbaum RL (2008) Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Experimental cell research* 314:2076-2089.
- Combettes-Souverain M, Issad T (1998) Molecular basis of insulin action. *Diabetes Metab* 24:477-489.
- Cookson MR, van der Brug M (2008) Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein. *Experimental neurology* 209:5-11.
- Cordaux R, Batzer MA (2009) The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature reviews Genetics* 10:691-703.
- Costigan M, Latremoliere A, Woolf CJ (2012) Analgesia by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis. *Current opinion in pharmacology* 12:92-99.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2009) Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual review of neuroscience* 32:1-32.
- Crabtree MJ, Channon KM (2011) Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 25:81-88.
- Cruz AP, Frei F, Graeff FG (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 49:171-176.
- Dale RC, Brilot F, Fagan E, Earl J (2009) Cerebrospinal fluid neopterin in paediatric neurology: a marker of active central nervous system

- inflammation. *Developmental medicine and child neurology* 51:317-323.
- de Lucas RD, Caputo F, Mendes de Souza K, Sigwalt AR, Ghisoni K, Lock Silveira PC, Remor AP, da Luz Scheffer D, Guglielmo LG, Latini A (2014) Increased platelet oxidative metabolism, blood oxidative stress and neopterin levels after ultra-endurance exercise. *Journal of sports sciences* 32:22-30.
- de Paula Martins R, Glaser V, da Luz Scheffer D, de Paula Ferreira PM, Wannmacher CM, Farina M, de Oliveira PA, Prediger RD, Latini A (2013) Platelet oxygen consumption as a peripheral blood marker of brain energetics in a mouse model of severe neurotoxicity. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 45:449-457.
- Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.
- Desai K, Wu L (2007) Methylglyoxal and advanced glycation endproducts: new therapeutic horizons? *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2:89-99.
- Di Donato S (2000) Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *Journal of inherited metabolic disease* 23:247-263.
- Ding QF, Hayashi T, Packiasamy AR, Miyazaki A, Fukatsu A, Shiraishi H, Nomura T, Iguchi A (2004) The effect of high glucose on NO and O<sub>2</sub>- through endothelial GTPCH1 and NADPH oxidase. *Life sciences* 75:3185-3194.
- Dolder M, Walzel B, Speer O, Schlattner U, Wallimann T (2003) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *The Journal of biological chemistry* 278:17760-17766.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12222-12226.
- Ducreux D, Attal N, Parker F, Bouhassira D (2006) Mechanisms of central neuropathic pain: a combined psychophysical and fMRI study in syringomyelia. *Brain: a journal of neurology* 129:963-976.

- Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, Scherrer U (2001) Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 104:342-345.
- Duronio V (2008) The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *The Biochemical journal* 415:333-344.
- Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, Bushnell MC, Farrar JT, Galer BS, Haythornthwaite JA, Hewitt DJ, Loeser JD, Max MB, Saltarelli M, Schmader KE, Stein C, Thompson D, Turk DC, Wallace MS, Watkins LR, Weinstein SM (2003) Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Archives of neurology* 60:1524-1534.
- El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, Cooper ME, Brownlee M (2008) Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med* 205:2409-2417.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77.
- Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407-421.
- Everse J, Coates PW (2009) Neurodegeneration and peroxidases. *Neurobiology of aging* 30:1011-1025.
- Feener EP, Xia P, Inoguchi T, Shiba T, Kunisaki M, King GL (1996) Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor expression. *Contrib Nephrol* 118:180-187.
- Figlewicz DP, Brot MD, McCall AL, Szot P (1996) Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain research* 736:54-60.
- Fil A, Cano-de-la-Cuerda R, Munoz-Hellin E, Vela L, Ramiro-Gonzalez M, Fernandez-de-Las-Penas C (2013) Pain in Parkinson disease: a review of the literature. *Parkinsonism & related disorders* 19:285-294.
- Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH (2005) Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 118:289-305.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ (1985) Differential

- investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23-36.
- Folmer V, Soares JC, Rocha JB (2002) Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1279-1285.
- Foxton RH, Land JM, Heales SJ (2007) Tetrahydrobiopterin availability in Parkinson's and Alzheimer's disease; potential pathogenic mechanisms. *Neurochemical research* 32:751-756.
- Fradin D, Le Fur S, Mille C, Naoui N, Groves C, Zelenika D, McCarthy MI, Lathrop M, Bougneres P (2012) Association of the CpG methylation pattern of the proximal insulin gene promoter with type 1 diabetes. *PLoS One* 7:e36278.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:10604-10609.
- Freitas CF (2012) Associação entre os níveis séricos de neptarina e a Doença de Parkinson. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Florianópolis.
- Furukawa Y, Kish SJ, Bebin EM, Jacobson RD, Fryburg JS, Wilson WG, Shimadzu M, Hyland K, Trugman JM (1998) Dystonia with motor delay in compound heterozygotes for GTP-cyclohydrolase I gene mutations. *Annals of neurology* 44:10-16.
- Gabriely I, Yang XM, Cases JA, Ma XH, Rossetti L, Barzilai N (2002) Hyperglycemia induces PAI-1 gene expression in adipose tissue by activation of the hexosamine biosynthetic pathway. *Atherosclerosis* 160:115-122.
- Galina A, Reis M, Albuquerque MC, Puyou AG, Puyou MT, de Meis L (1995) Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *The Biochemical journal* 309 ( Pt 1):105-112.
- Ganz MB, Seftel A (2000) Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 278:E146-152.
- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S (1999) Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of neurology* 56:33-39.

- Geraldes P, King GL (2010) Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circulation research* 106:1319-1331.
- German DC, White CL, 3rd, Sparkman DR (1987) Alzheimer's disease: neurofibrillary tangles in nuclei that project to the cerebral cortex. *Neuroscience* 21:305-312.
- Giacco F, Brownlee M (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research* 107:1058-1070.
- Gispén WH, Biessels GJ (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23:542-549.
- Glaser V (2014) Efeitos da hiperglicemia crônica e seus metabólitos, metilglicoxal e produtos terminais de glicação, na fisiologia e dinâmica mitocondrial no sistema nervoso central. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis.
- Glaser V, Leipnitz G, Stralioatto MR, Oliveira J, dos Santos VV, Wannmacher CM, de Bem AF, Rocha JB, Farina M, Latini A (2010) Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. *Neurotoxicology* 31:454-460.
- Gnaiger E (2001) Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respiration physiology* 128:277-297.
- Golzari Z, Shabkhiz F, Soudi S, Kordi MR, Hashemi SM (2010) Combined exercise training reduces IFN-gamma and IL-17 levels in the plasma and the supernatant of peripheral blood mononuclear cells in women with multiple sclerosis. *International immunopharmacology* 10:1415-1419.
- Gonzalez FJ (1988) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacological reviews* 40:243-288.
- Grimshaw CE (1992) Aldose reductase: model for a new paradigm of enzymic perfection in detoxification catalysts. *Biochemistry* 31:10139-10145.
- Grzeda E, Wisniewska RJ, Wisniewski K (2007) Effect of an NMDA receptor agonist on T-maze and passive avoidance test in 12-week streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological reports* : PR 59:656-663.
- Gugliucci A (2009) "Blinding" of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: a mechanism that allows perpetuation of hepatic insulin resistance? *Medical hypotheses* 73:921-924.
- Guyton AC (2006) *Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier 11.

- Hagan JJ, Middlemiss DN, Sharpe PC, Poste GH (1997) Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. *Trends Pharmacol Sci* 18:156-163.
- Han D, Williams E, Cadenas E (2001) Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *The Biochemical journal* 353:411-416.
- Han Y, Randell E, Vasdev S, Gill V, Gadag V, Newhook LA, Grant M, Hagerty D (2007) Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Mol Cell Biochem* 305:123-131.
- Haruki H, Pedersen MG, Gorska KI, Pojer F, Johnsson K (2013) Tetrahydrobiopterin biosynthesis as an off-target of sulfa drugs. *Science* 340:987-991.
- Hausladen A, Fridovich I (1994) Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *The Journal of biological chemistry* 269:29405-29408.
- Hempel A, Maasch C, Heintze U, Lindschau C, Dietz R, Luft FC, Haller H (1997) High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circulation research* 81:363-371.
- Hindle JV (2010) Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age and ageing* 39:156-161.
- Hirano S, Miyata S, Kamei J (2007) Antidepressant-like effect of leptin in streptozotocin-induced diabetic mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 86:27-31.
- Ho N, Balu DT, Hilario MR, Blendy JA, Lucki I (2012) Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiology & behavior* 105:702-708.
- Holscher C, Li L (2010) New roles for insulin-like hormones in neuronal signalling and protection: new hopes for novel treatments of Alzheimer's disease? *Neurobiology of aging* 31:1495-1502.
- Howells DW, Smith I, Hyland K (1986) Estimation of tetrahydrobiopterin and other pterins in cerebrospinal fluid using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *Journal of chromatography* 381:285-294.
- Hu G, Jousilahti P, Bidel S, Antikainen R, Tuomilehto J (2007) Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes care* 30:842-847.

- Hughes BP (1962) A method for the estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. *Clin Chim Acta* 7:597-603.
- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP (1988) Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *The Biochemical journal* 256:205-212.
- IBGE (2010) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- IDF (2014) International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas Sixth edition*.
- Ihnat MA, Thorpe JE, Ceriello A (2006) Hypothesis: the "metabolic memory", the new challenge of diabetes. *Diabetic Med* 24:582-586.
- Imtiaz B, Tolppanen AM, Kivipelto M, Soininen H (2014) Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. *Biochemical pharmacology* 88:661-670.
- Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H (2003) Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 14:S227-232.
- Ishizuka T, Hinata T, Watanabe Y (2011) Superoxide induced by a high-glucose concentration attenuates production of angiogenic growth factors in hypoxic mouse mesenchymal stem cells. *The Journal of endocrinology* 208:147-159.
- James AM, Smith RA, Murphy MP (2004) Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys* 423:47-56.
- Jellinger KA (1988) Pathology of Parkinson's syndrome. In: *Handbook of experimental pharmacology*, vol. 88 (Springer, ed), pp 47-112 New York.
- Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14:153-197.
- Jiang L, Saetre P, Radomska KJ, Jazin E, Lindholm Carlstrom E (2006) QKI-7 regulates expression of interferon-related genes in human astrocyte glioma cells. *PLoS One* 5.
- Jirtle RL, Skinner MK (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature reviews Genetics* 8:253-262.

- Johnson IT, Belshaw NJ (2008) Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46:1346-1359.
- Kalapos MP (2008) The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-biological interactions* 171:251-271.
- Kaneko T, Baba N, Matsuo M (2001) Structure-activity relationship of antioxidants for inhibitors of linoleic acid hydroperoxide-induced toxicity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cytotechnology* 35:43-55.
- Kaufman S (1963) The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 50:1085-1093.
- Keating ST, El-Osta A (2012) Chromatin modifications associated with diabetes. *Journal of cardiovascular translational research* 5:399-412.
- Kennedy EP, Lehninger AL (1950) The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 185:275-285.
- Kennedy EP, Lehninger AL (1951) Activation of fatty acid oxidation by dihydrodiphosphopyridine nucleotide. *The Journal of biological chemistry* 190:361-368.
- Kietadisorn R, Juni RP, Moens AL (2012) Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 302:E481-495.
- Kim JS, Qian T, Lemasters JJ (2003) Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* 124:494-503.
- Kissin I (2010) The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. *Anesthesia and analgesia* 110:780-789.
- Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences* 31:89-97.
- Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED (1998) High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *The Journal of clinical investigation* 101:160-169.
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS letters* 416:15-18.

- Kotagal V, Albin RL, Muller ML, Koeppe RA, Frey KA, Bohnen NI (2013) Diabetes is associated with postural instability and gait difficulty in Parkinson disease. *Parkinsonism & related disorders* 19:522-526.
- Koutsilieri E, Scheller C, Grunblatt E, Nara K, Li J, Riederer P (2002) Free radicals in Parkinson's disease. *Journal of neurology* 249 Suppl 2:II1-5.
- Kowluru RA, Odenbach S (2004) Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes* 53:3233-3238.
- Kroner Z (2009) The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 14:373-379.
- Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL (2000) Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101:676-681.
- Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, Ku HT, Al-Abdullah IH, Kandeel F, Mullen Y, Pfeifer GP, Ferreri K (2009) Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS One* 4:e6953.
- Lam AA, Heales SJ (2007) Nitric oxide accelerates the degradation of tetrahydrobiopterin but not total neopterin in cerebrospinal fluid; potential implications for the assessment of tetrahydrobiopterin metabolism. *Annals of clinical biochemistry* 44:394-396.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL,

- Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, International Human Genome Sequencing C (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of clinical investigation* 111:1201-1209.
- Lapolla A, Traldi P, Fedele D (2005) Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clinical biochemistry* 38:103-115.

- Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M (2005) Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Molecular genetics and metabolism* 86:188-199.
- Latini A, de Bem AF, Raisman-Vozari R, Tasca CI (2012) Biochemical mechanisms of neurodegeneration in Parkinson's Disease: Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Glutamatergic Excitotoxicity. In: *Frontiers in Parkinson's Disease Research* (Nova Science Publishers, I., ed) New York.
- Latremoliere A, Costigan M (2011) GCH1, BH4 and pain. *Current pharmaceutical biotechnology* 12:1728-1741.
- Leblhuber F, Schroecksadel K, Beran-Praher M, Haller H, Steiner K, Fuchs D (2011) Polyneuropathy and dementia in old age: common inflammatory and vascular parameters. *Journal of neural transmission* 118:721-725.
- Lee Y, Lee CH, Oh U (2005) Painful channels in sensory neurons. *Molecules and cells* 20:315-324.
- Lehninger AL, Smith SW (1949) Efficiency of phosphorylation coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen. *The Journal of biological chemistry* 181:415-429.
- Leu-Semenescu S, Karroum E, Brion A, Konofal E, Arnulf I (2009) Dopamine dysregulation syndrome in a patient with restless legs syndrome. *Sleep medicine* 10:494-496.
- Ling C, Groop L (2009) Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes* 58:2718-2725.
- Lipman IJ, Boykin ME, Flora RE (1974) Glucose intolerance in Parkinson's disease. *Journal of chronic diseases* 27:573-579.
- Lipton SA, Gu Z, Nakamura T (2007) Inflammatory mediators leading to protein misfolding and uncompetitive/fast off-rate drug therapy for neurodegenerative disorders. *International review of neurobiology* 82:1-27.
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92:180-185.
- Liu Y, Zhang XJ, Yang CH, Fan HG (2009) Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF-kappaB expression. *Brain research* 1268:174-180.
- Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ (1994) Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylgarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-

- acetyllysine, and bovine serum albumin. *The Journal of biological chemistry* 269:32299-32305.
- Loeser JD, Treede RD (2008) The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 137:473-477.
- Longo N (2009) Disorders of bipterin metabolism. *Journal of inherited metabolic disease* 32:333-342.
- Lopes MW, Soares FM, de Mello N, Nunes JC, de Cordova FM, Walz R, Leal RB (2012) Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochemical research* 37:1868-1878.
- Lotsch J, Belfer I, Kirchhof A, Mishra BK, Max MB, Doehring A, Costigan M, Woolf CJ, Geisslinger G, Tegeder I (2007) Reliable screening for a pain-protective haplotype in the GTP cyclohydrolase 1 gene (GCH1) through the use of 3 or fewer single nucleotide polymorphisms. *Clinical chemistry* 53:1010-1015.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193:265-275.
- Lu T, Aron L, Zullo J, Pan Y, Kim H, Chen Y, Yang TH, Kim HM, Drake D, Liu XS, Bennett DA, Colaiacovo MP, Yankner BA (2014) REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* 507:448-454.
- Malecki M, Skupien J (2008) Problems in differential diagnosis of diabetes types. *Pol Arch Med Wewn* 118:435-440.
- Malecki MT, Klupa T (2005) Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. *Pharmacological reports* : PR 57 Suppl:20-32.
- Mann DM, Oliver R, Snowden JS (1993) The topographic distribution of brain atrophy in Huntington's disease and progressive supranuclear palsy. *Acta neuropathologica* 85:553-559.
- Marchetti P, Dotta F, Lauro D, Purrello F (2008) An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regul Pept* 146:4-11.
- Marshall S, Monzon R (1989) Amino acid regulation of insulin action in isolated adipocytes. Selective ability of amino acids to enhance both insulin sensitivity and maximal insulin responsiveness of the protein synthesis system. *The Journal of biological chemistry* 264:2037-2042.
- Matos FJ (2013) Efeito do estrito controle da glicemia sobre parâmetros neuroquímicos em animais hiperglicêmicos. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de

- Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis.
- Mayer B, John M, Bohme E (1990) Purification of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS letters* 277:215-219.
- Meininger CJ, Marinos RS, Hatakeyama K, Martinez-Zaguilan R, Rojas JD, Kelly KA, Wu G (2000) Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *The Biochemical journal* 349:353-356.
- Messier C, Gagnon M (1996) Glucose regulation and cognitive functions: relation to Alzheimer's disease and diabetes. *Behavioural brain research* 75:1-11.
- Meyer LE, Machado LB, Santiago AP, da-Silva WS, De Felice FG, Holub O, Oliveira MF, Galina A (2006) Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP recycling activity. *The Journal of biological chemistry* 281:37361-37371.
- Molognoni F, Cruz AT, Meliso FM, Morais AS, Souza CF, Xander P, Bischof JM, Costa FF, Soares MB, Liang G, Jones PA, Jasiulionis MG (2011) Epigenetic reprogramming as a key contributor to melanocyte malignant transformation. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society* 6:450-464.
- Moore F, Colli ML, Cnop M, Esteve MI, Cardozo AK, Cunha DA, Bugliani M, Marchetti P, Eizirik DL (2009) PTPN2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates interferon-gamma-induced pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes* 58:1283-1291.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics* 34:267-273.
- Morini M, Roccatagliata L, Dell'Eva R, Pedemonte E, Furlan R, Minghelli S, Giunti D, Pfeffer U, Marchese M, Noonan D, Mancardi G, Albin A, Uccelli A (2004) Alpha-lipoic acid is effective in prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 148:146-153.

- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Mukherjee B, Anbazhagan S, Roy A, Ghosh R, Chatterjee M (1998) Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother* 52:89-95.
- Mulero-Navarro S, Esteller M (2008) Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Critical reviews in oncology/hematology* 68:1-11.
- Munch G, Westcott B, Menini T, Gugliucci A (2012) Advanced glycation endproducts and their pathogenic roles in neurological disorders. *Amino Acids* 42:1221-1236.
- Nagatsu T, Ichinose H (1996) GTP cyclohydrolase I gene, tetrahydrobiopterin, and tyrosine hydroxylase gene: their relations to dystonia and parkinsonism. *Neurochemical research* 21:245-250.
- Nakamura K (2013) alpha-Synuclein and mitochondria: partners in crime? *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 10:391-399.
- Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B (2005) Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 353:2643-2653.
- Nelson D, Cox MM (2004) *Principles of Biochemistry*. 698.
- Neville BG, Parascandolo R, Farrugia R, Felice A (2005) Sepiapterin reductase deficiency: a congenital dopa-responsive motor and cognitive disorder. *Brain : a journal of neurology* 128:2291-2296.
- Njoroge FG, Monnier VM (1989) The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. *Progress in clinical and biological research* 304:85-107.
- Nokoff N, Rewers M (2013) Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1281:1-15.
- Obrosova IG (2009) Diabetes and the peripheral nerve. *Biochimica et biophysica acta* 1792:931-940.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 276:38388-38393.

- Okumura M, Masada M, Yoshida Y, Shintaku H, Hosoi M, Okada N, Konishi Y, Morikawa T, Miura K, Imanishi M (2006) Decrease in tetrahydrobiopterin as a possible cause of nephropathy in type II diabetic rats. *Kidney international* 70:471-476.
- Olivera S, Fernandez A, Latini A, Rosillo JC, Casanova G, Wajner M, Cassina P, Barbeito L (2008) Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. *Neurobiology of disease* 32:528-534.
- Oosawa Y, Ashcroft SJ, Ashcroft FM (1992) Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels from an insulin-secreting cell line incorporated into planar lipid bilayers. *Diabetologia* 35:619-623.
- Ormazabal A, Garcia-Cazorla A, Fernandez Y, Fernandez-Alvarez E, Campistol J, Artuch R (2005) HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins. *Journal of neuroscience methods* 142:153-158.
- Ota A, Kaneko YS, Mori K, Nakashima A, Nagatsu I, Nagatsu T (2007) Effect of peripherally administered lipopolysaccharide (LPS) on GTP cyclohydrolase I, tetrahydrobiopterin and norepinephrine in the locus coeruleus in mice. *Stress* 10:131-136.
- Papoulis A, al-Abed Y, Bucala R (1995) Identification of N<sup>2</sup>-(1-carboxyethyl)guanine (CEG) as a guanine advanced glycosylation end product. *Biochemistry* 34:648-655.
- Peters A, Laffel L, American Diabetes Association Transitions Working G (2011) Diabetes care for emerging adults: recommendations for transition from pediatric to adult diabetes care systems: a position statement of the American Diabetes Association, with representation by the American College of Osteopathic Family Physicians, the American Academy of Pediatrics, the American Association of Clinical Endocrinologists, the American Osteopathic Association, the Centers for Disease Control and Prevention, Children with Diabetes, The Endocrine Society, the International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes, Juvenile Diabetes Research Foundation International, the National Diabetes Education Program, and the Pediatric Endocrine Society (formerly Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society). *Diabetes care* 34:2477-2485.
- Pezzolesi MG, Krolewski AS (2013) The genetic risk of kidney disease in type 2 diabetes. *The Medical clinics of North America* 97:91-107.

- Pham CL, Cappai R (2013) The interplay between lipids and dopamine on alpha-synuclein oligomerization and membrane binding. *Bioscience reports* 33.
- Phillips SA, Thornalley PJ (1993) The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem* 212:101-105.
- Pieper GM, Riaz ul H (1997) Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:528-532.
- Pirola L, Balcerczyk A, Okabe J, El-Osta A (2010) Epigenetic phenomena linked to diabetic complications. *Nature reviews Endocrinology* 6:665-675.
- Poitout V, Robertson RP (2002) Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143:339-342.
- Poli G, Schaur RJ (2000) 4-Hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. *IUBMB Life* 50:315-321.
- Pompliano DL, Peyman A, Knowles JR (1990) Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 29:3186-3194.
- Poyton RO, McEwen JE (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* 65:563-607.
- Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ (2005) Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146:1576-1587.
- Prediger RD, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, Figueiredo CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL (2007) Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behavioural brain research* 177:205-213.
- Pressley JC, Louis ED, Tang MX, Cote L, Cohen PD, Glied S, Mayeux R (2003) The impact of comorbid disease and injuries on resource use and expenditures in parkinsonism. *Neurology* 60:87-93.
- Ravelojaona V, Peterszegi G, Molinari J, Gesztesi JL, Robert L (2007) [Demonstration of the cytotoxic effect of Advanced Glycation Endproducts (AGE-s)]. *J Soc Biol* 201:185-188.

- Ray S, Ray M (1981) Isolation of methylglyoxal synthase from goat liver. *The Journal of biological chemistry* 256:6230-6233.
- Remor AP, de Matos FJ, Ghisoni K, da Silva TL, Eidt G, Burigo M, de Bem AF, Silveira PC, de Leon A, Sanchez MC, Hohl A, Glaser V, Goncalves CA, Quincozes-Santos A, Borba Rosa R, Latini A (2011) Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: involvement of advanced glycosylated end products. *Biochimica et biophysica acta* 1812:1460-1471.
- Richard JP (1991) Kinetic parameters for the elimination reaction catalyzed by triosephosphate isomerase and an estimation of the reaction's physiological significance. *Biochemistry* 30:4581-4585.
- Roesler R, Walz R, Quevedo J, de-Paris F, Zanata SM, Graner E, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (1999) Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain research Molecular brain research* 71:349-353.
- Rorsman P, Renstrom E (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46:1029-1045.
- Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L (2001) The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 17:189-212.
- Ross T, Szczepanek K, Bowler E, Hu Y, Larner A, Lesnefsky EJ, Chen Q (2013) Reverse electron flow-mediated ROS generation in ischemia-damaged mitochondria: role of complex I inhibition vs. depolarization of inner mitochondrial membrane. *Biochimica et biophysica acta* 1830:4537-4542.
- Rowland LP (1998) Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 160 Suppl 1:S6-24.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35-51.
- Sabatino ME, Sosa Ldel V, Petiti JP, Mukdsi JH, Mascanfroni ID, Pellizas CG, Gutierrez S, Torres AI, De Paul AL (2013) Functional Toll-like receptor 4 expressed in lactotrophs mediates LPS-induced proliferation in experimental pituitary hyperplasia. *Experimental cell research* 319:3020-3034.

- Saks VA, Tiivel T, Kay L, Novel-Chate V, Daneshrad Z, Rossi A, Fontaine E, Keriél C, Leverve X, Ventura-Clapier R, Anflous K, Samuel JL, Rappaport L (1996a) On the regulation of cellular energetics in health and disease. *Mol Cell Biochem* 160-161:195-208.
- Saks VA, Ventura-Clapier R, Aliev MK (1996b) Metabolic control and metabolic capacity: two aspects of creatine kinase functioning in the cells. *Biochimica et biophysica acta* 1274:81-88.
- Sakurai S, Yonekura H, Yamamoto Y, Watanabe T, Tanaka N, Li H, Rahman AK, Myint KM, Kim CH, Yamamoto H (2003) The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14:S259-263.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- Sandyk R (1993) The relationship between diabetes mellitus and Parkinson's disease. *Int J Neurosci* 69:125-130.
- Santiago AP, Chaves EA, Oliveira MF, Galina A (2008) Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie* 90:1566-1577.
- Santiago JA, Potashkin JA (2013) Shared dysregulated pathways lead to Parkinson's disease and diabetes. *Trends in molecular medicine* 19:176-186.
- Santiago JA, Potashkin JA (2014) System-based approaches to decode the molecular links in Parkinson's disease and diabetes. *Neurobiology of disease*.
- Saraiva LM, Seixas da Silva GS, Galina A, da-Silva WS, Klein WL, Ferreira ST, De Felice FG (2010) Amyloid-beta triggers the release of neuronal hexokinase I from mitochondria. *PLoS One* 5:e15230.
- Saraste M (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys* 23:331-366.
- Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z (2008) Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation research* 642:1-13.
- Sawynok J (2003) Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacological reviews* 55:1-20.
- Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M (2005) DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *Journal of cellular physiology* 204:21-35.

- Scarpulla RC (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286:81-89.
- Schapira AH, Gegg M (2011) Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis. *Parkinson's disease* 2011:159160.
- Schernhammer E, Hansen J, Rugbjerg K, Wermuth L, Ritz B (2011) Diabetes and the risk of developing Parkinson's disease in Denmark. *Diabetes care* 34:1102-1108.
- Schlattner U, Eder M, Dolder M, Khuchua ZA, Strauss AW, Wallimann T (2000) Divergent enzyme kinetics and structural properties of the two human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. *Biological chemistry* 381:1063-1070.
- Schoenherr CJ, Anderson DJ (1995) The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267:1360-1363.
- Schwab RS (1960) Progression and prognosis in Parkinson's disease. *J Nerv Ment Dis* 130:556-566.
- Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF (2000) AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta(II) in neonatal mesangial cells. *American journal of physiology Renal physiology* 278:F676-683.
- Shankar RR, Wu Y, Shen HQ, Zhu JS, Baron AD (2000) Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 49:684-687.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31:27-36.
- Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, Shu J, Chen X, Waterland RA, Issa JP (2007) Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS genetics* 3:2023-2036.
- Shenouda SM, Widlansky ME, Chen K, Xu G, Holbrook M, Tabit CE, Hamburg NM, Frame AA, Caiano TL, Kluge MA, Duess MA, Levit A, Kim B, Hartman ML, Joseph L, Shirihai OS, Vita JA (2011) Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation* 124:444-453.
- Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, Heath WF, Bursell S, King GL (1993) Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *The American journal of physiology* 265:E783-793.
- Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger P, Thorpe SR, Onorato J, Brownlee M (1998) Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation

- endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *The Journal of clinical investigation* 101:1142-1147.
- Siebel AL, Fernandez AZ, El-Osta A (2010) Glycemic memory associated epigenetic changes. *Biochemical pharmacology* 80:1853-1859.
- Sipos I, Tretter L, Adam-Vizi V (2003) The production of reactive oxygen species in intact isolated nerve terminals is independent of the mitochondrial membrane potential. *Neurochemical research* 28:1575-1581.
- Sisignano M, Park CK, Angioni C, Zhang DD, von Hehn C, Cobos EJ, Ghasemlou N, Xu ZZ, Kumaran V, Lu R, Grant A, Fischer MJ, Schmidtke A, Reeh P, Ji RR, Woolf CJ, Geisslinger G, Scholich K, Brenneis C (2012) 5,6-EET is released upon neuronal activity and induces mechanical pain hypersensitivity via TRPA1 on central afferent terminals. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32:6364-6372.
- Sivitz WI, Yorek MA (2010) Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 12:537-577.
- Sjovall F, Morota S, Hansson MJ, Friberg H, Gnaiger E, Elmer E (2010) Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Critical care* 14:R214.
- Sobrevia L, Nadal A, Yudilevich DL, Mann GE (1996) Activation of L-arginine transport (system y<sup>+</sup>) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *The Journal of physiology* 490 ( Pt 3):775-781.
- Somers DL, Clemente FR (2009) Contralateral high or a combination of high- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation reduces mechanical allodynia and alters dorsal horn neurotransmitter content in neuropathic rats. *J Pain* 10:221-229.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* 277:44784-44790.
- Sucher R, Schroecksnadel K, Weiss G, Margreiter R, Fuchs D, Brandacher G (2010) Neopterin, a prognostic marker in human malignancies. *Cancer Lett* 287:13-22.
- Szwergold BS, Kappler F, Brown TR (1990) Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science* 247:451-454.

- Tanaka K, Suzuki T (2004) Role of amino-acid residue 95 in substrate specificity of phosphagen kinases. *FEBS letters* 573:78-82.
- Taniguchi S, McDonagh AM, Pickering-Brown SM, Umeda Y, Iwatsubo T, Hasegawa M, Mann DM (2004) The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration with respect to the cytological and biochemical characteristics of tau protein. *Neuropathology and applied neurobiology* 30:1-18.
- Tegeeder I, Costigan M, Griffin RS, Abele A, Belfer I, Schmidt H, Ehnert C, Nejm J, Marian C, Scholz J, Wu T, Allchorne A, Diatchenko L, Binshtok AM, Goldman D, Adolph J, Sama S, Atlas SJ, Carlezon WA, Parsegian A, Lotsch J, Fillingim RB, Maixner W, Geisslinger G, Max MB, Woolf CJ (2006) GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. *Nat Med* 12:1269-1277.
- Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Nishio S, Nagano-Torigoe Y, Miyazaki H, Ezaki K, Yufu K, Hara M, Nakagawa M, Saikawa T (2010) High-glucose condition reduces cardioprotective effects of insulin against mechanical stress-induced cell injury. *Life sciences* 87:154-161.
- The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group (2008) Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 358:2545-2559.
- The Advance Collaborative Group (2008) Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 358:2560-2572.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-986.
- Thony B, Auerbach G, Blau N (2000) Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *The Biochemical journal* 347 Pt 1:1-16.
- Thony B, Blau N (2006) Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. *Human mutation* 27:870-878.
- Thornalley PJ (1990) The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *The Biochemical journal* 269:1-11.
- Thornalley PJ (1993) The glyoxalase system in health and disease. *Molecular aspects of medicine* 14:287-371.

- Thornalley PJ (2008) Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact* 23:125-150.
- Thornalley PJ, Hooper NI, Jennings PE, Florkowski CM, Jones AF, Lunec J, Barnett AH (1989) The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice* 7:115-120.
- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *The Biochemical journal* 344 Pt 1:109-116.
- Todd JA (2010) Etiology of type 1 diabetes. *Immunity* 32:457-467.
- Tomlinson DR, Gardiner NJ (2008a) Diabetic neuropathies: components of etiology. *J Peripher Nerv Syst* 13:112-121.
- Tomlinson DR, Gardiner NJ (2008b) Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 9:36-45.
- Tonna S, El-Osta A, Cooper ME, Tikellis C (2010) Metabolic memory and diabetic nephropathy: potential role for epigenetic mechanisms. *Nature reviews Nephrology* 6:332-341.
- Tost J (2010) DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Molecular biotechnology* 44:71-81.
- Trevilatto PC, Line SR (2000) Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *The Journal of forensic odonto-stomatology* 18:6-9.
- Tros F, Meirhaeghe A, Hadjadj S, Amouyel P, Bougneres P, Fradin D (2014) Hypomethylation of the promoter of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A in response to hyperglycemia. *Physiological reports* 2.
- Truini A, Frontoni M, Cruccu G (2013) Parkinson's disease related pain: a review of recent findings. *Journal of neurology* 260:330-334.
- Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience reports* 17:3-8.
- Turrens JF, Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *The Biochemical journal* 191:421-427.
- Uccioli L, Giacomini PG, Monticone G, Magrini A, Durola L, Bruno E, Parisi L, Di Girolamo S, Menzinger G (1995) Body sway in diabetic neuropathy. *Diabetes care* 18:339-344.
- Vaca CE, Fang JL, Conradi M, Hou SM (1994) Development of a 32P-postlabelling method for the analysis of 2'-deoxyguanosine-3'-

- monophosphate and DNA adducts of methylglyoxal. *Carcinogenesis* 15:1887-1894.
- Vander Jagt DL, Hunsaker LA (2003) Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chemico-biological interactions* 143-144:341-351.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr. (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:9220-9225.
- Voet D, Voet JD (1995) *Biochemistry*. New York: John Wiley & sons, Inc.
- Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-1488.
- Wallimann T, Hemmer W (1994) Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 133-134:193-220.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *The Biochemical journal* 281 ( Pt 1):21-40.
- Wang X, Desai K, Chang T, Wu L (2005) Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. *J Hypertens* 23:1565-1573.
- Wegner M, Neddermann D, Piorunska-Stolzmann M, Jagodzinski PP (2014) Role of epigenetic mechanisms in the development of chronic complications of diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 105:164-175.
- Weinberg JB (1998) Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Mol Med* 4:557-591.
- Weksler ME, Pawelec G, Franceschi C (2009) Immune therapy for age-related diseases. *Trends Immunol* 30:344-350.
- Wells L, Vosseller K, Hart GW (2001) Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291:2376-2378.
- Wells-Knecht MC, Thorpe SR, Baynes JW (1995) Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry* 34:15134-15141.

- Wendt T, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM (2002) Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and vascular inflammation: insights into the pathogenesis of macrovascular complications in diabetes. *Current atherosclerosis reports* 4:228-237.
- Werner ER, Werner-Felmayer G, Mayer B (1998) Tetrahydrobiopterin, cytokines, and nitric oxide synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 219:171-182.
- Westwood ME, McLellan AC, Thornalley PJ (1994) Receptor-mediated endocytic uptake of methylglyoxal-modified serum albumin. Competition with advanced glycation end product-modified serum albumin at the advanced glycation end product receptor. *The Journal of biological chemistry* 269:32293-32298.
- White MF, Kahn CR (1994) The insulin signaling system. *The Journal of biological chemistry* 269:1-4.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care* 27:1047-1053.
- Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C (1997) Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* 46:1497-1503.
- Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG (1993) Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42:801-813.
- Winer N, Sowers JR (2004) Epidemiology of diabetes. *J Clin Pharmacol* 44:397-405.
- Wirostko B, Wong TY, Simo R (2008) Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog Retin Eye Res* 27:608-621.
- Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.
- Wu L, Juurlink BH (2002) Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 39:809-814.
- Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T (1992) Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1102:119-166.
- Xu J, Wu Y, Song P, Zhang M, Wang S, Zou MH (2007) Proteasome-dependent degradation of guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase

- I causes tetrahydrobiopterin deficiency in diabetes mellitus. *Circulation* 116:944-953.
- Xu Q, Park Y, Huang X, Hollenbeck A, Blair A, Schatzkin A, Chen H (2011) Diabetes and risk of Parkinson's disease. *Diabetes care* 34:910-915.
- Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP (2004) A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic acids research* 32:e38.
- Yang W, Lu J, Weng J, Jia W, Ji L, Xiao J, Shan Z, Liu J, Tian H, Ji Q, Zhu D, Ge J, Lin L, Chen L, Guo X, Zhao Z, Li Q, Zhou Z, Shan G, He J (2010) Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med* 362:1090-1101.
- Yu PH, Wright S, Fan EH, Lun ZR, Gubisne-Harberle D (2003) Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochimica et biophysica acta* 1647:193-199.
- Zhang P, Liu N, Wang Y (2009) Insulin may cause deterioration of proliferative diabetic retinopathy. *Medical hypotheses* 72:306-308.
- Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *The Journal of biological chemistry* 265:16330-16336.
- Zimmermann M (2001) Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:23-37.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787.
- Zochodne DW (2007) Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. *Muscle Nerve* 36:144-166.