

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

Administração intracerebroventricular de metformina altera a regulação da temperatura corporal, diminui o apetite e aumenta a mortalidade em camundongos

Jussânia de Almeida Gnoatto

Orientador: Dr. Alexandre Pastoris Muller

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –

BIOQUÍMICA

Administração intracerebroventricular de metformina altera a regulação da temperatura corporal, diminui o apetite e aumenta a mortalidade em camundongos

Jussânia de Almeida Gnoatto

Orientador: Dr. Alexandre Pastoris Muller

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2013

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”. (Albert Einstein)

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”. (Carl Sagan)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Joacir e Janete, obrigada pelo incentivo, torcida, amor, e por sempre acreditarem em mim, com certeza sem o apoio de vocês seria muito mais difícil chegar até aqui;

Aos meus irmãos, Jader e Juliano, que sempre estiveram do meu lado, amo vocês;

À minha família, em especial à minha Madrinha Terezinha, pelo incentivo, amizade e confiança, ao meu tio Inácio (em memória) pelo carinho e conselhos e ao meu tio Delmar por ter me ajudado a entrar no mundo científico;

Ao meu querido orientador, Alexandre Pastoris Muller, obrigada pelo apoio, ensinamentos e paciência, sem a tua ajuda com certeza seria muito mais difícil concluir esta etapa;

Ao meu Co-orientador Roska, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo de pesquisa, pelas risadas, parceria e ensinamentos;

Ao Prof. Diogo, pelo carinho, amizade e otimismo, obrigada pelo convívio e ensinamentos durante esses anos;

A minha querida IC e amiga Andressa, obrigada pelo apoio e amizade durante esses dois anos, sendo meu braço direito e às vezes o esquerdo também. Com certeza sem a tua ajuda e dedicação seria muito complicado conciliar o mestrado com o meu trabalho no DMAE;

Às minhas amigas Ana, Júlia, Camila, Clarissa, Gisele, Jeney, Luciana, Cati, Débora, Fernanda e Denise, pelas risadas, companheirismo, amizade, exemplos e acima de tudo por sempre estarem por perto, mesmo nos meus momentos de ausência, amo muito todas vocês;

Ao pessoal do lab 26 e 28, pelo prazeroso convívio durante esses anos, em especial ao meu amigo Dudu, aos meus colegas de grupo Russo, Clá e Andressa.

Ao meu namorado Marcelo, pelo amor, carinho, amizade, companheirismo, te amo.

Aos meus colegas do DMAE, pela paciência, apoio e amizade, em especial ao Pedrinho, Edgar e Ênio, a ajuda de vocês foi essencial para a conclusão desta etapa;

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica;

Ao Prof. Carlos Alberto, obrigada por ter aceitado o convite de relator da minha dissertação de mestrado.

ÍNDICE

PARTE I

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1 FATORES AMBIENTAIS E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	4
1.1.1 OBESIDADE, DIABETES E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	4
1.2 INSULINA E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	7
1.3 TRATAMENTOS PARA O DIABETES MELLITUS.....	9
1.3.1 METFORMINA: MECANISMO DE AÇÃO.....	10
1.3.2 METFORMINA: METABOLISMO PERIFÉRICO.....	11
1.3.3 METFORMINA: AÇÃO CEREBRAL.....	13
1.4 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO: TERMORREGULAÇÃO.....	16
1.5 OBJETIVOS.....	19
1.5.1 OBJETIVO GERAL.....	19
1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19

PARTE II

CAPÍTULO I – ARTIGO CIENTÍFICO EM PREPARAÇÃO.....	22
---	----

PARTE III

1. DISCUSSÃO.....	51
2. PERSPECTIVAS.....	58

REFERÊNCIAS

PARTE I

RESUMO

A metformina (Met) é descrita como um sensibilizador da insulina, levando a redução na resistência e uma significativa diminuição de seus níveis no jejum. Embora o alvo molecular da Met ainda não esteja totalmente descrito, acredita-se que este fármaco age inibindo o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, resultado em um aumento da razão celular de AMP/ATP. Alguns estudos vêm demonstrando que a Met é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo capaz de modular o sistema nervoso central (SNC). Entretanto os efeitos desse fármaco no SNC ainda são pouco estudados. A Met no cérebro desempenha funções, como: regulação do apetite, fosforilação da AMPK, modulação da expressão de neuropeptídeos, inibição do complexo I da cadeia respiratória. Em nosso trabalho administramos intracerebroventricularmente (i.c.v) Met nas doses de 50 e 100ug durante sete dias em camundongos, e observamos uma brusca diminuição no peso, consumo alimentar, temperatura e sobrevivência, bem como na quantidade das gorduras epididimais e mesentéricas. A Met i.c.v foi capaz de aumentar a sensibilidade periférica à glicose e à insulina, aumentou a produção basal de H_2O_2 em preparações mitocondriais de hipocampo e hipotálamo. Em culturas neuronais observamos uma diminuição da viabilidade mitocondrial após o tratamento com Met e um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em resumo nossos dados apontam um efeito neurotóxico da Met quando utilizada em altas doses diretamente no SNC, resultando em hipotermia, hipoglicemia, alteração da função mitocondrial com um impacto deletério na sobrevivência de camundongos.

ABSTRACT

Metformin is an insulin-sensitizer, leading to decrease in insulin resistance and in fasting insulin levels. The precise molecular target of metformin (Met) is unknown; however, some reports showed the inhibition of complex I on mitochondrial electron transport chain as a possible target, resulting in an increase of the cellular AMP / ATP. Some studies have shown that Met is able of crossing the blood brain barrier, modulating central nervous system (CNS) function. However the toxicity of this drug in the CNS has been less explored. In brain Met is proposed to regulate appetite, phosphorylation of AMPK, expression of neuropeptides and inhibits of complex I of the mitochondrial respiratory chain. In our work Met were injected intracerebroventricular (i.c.v) at doses 50 and 100ug in mice for seven days. We observed a decrease in body weight, food intake, visceral and epididymal fat content, corporal temperature and survival rate. Metformin was also able to increase peripheral sensitivity to insulin and glucose. The basal production of H₂O₂ in mitochondrial preparations hippocampus and hypothalamus was increased by metformin. Similarly, in neuronal cultures there was decreased mitochondrial viability after treatment with metformin and increased production of reactive oxygen species (ROS). In summary, our data indicate that high doses of metformin directly have neurotoxic effects to the CNS, expressed by hypothermia, hypoglycemia, disrupting mitochondrial function and decreasing survival rate.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK: Proteína cinase AMP ativada

AgRP: Proteína relacionada ao gene agouti

DM: Diabetes Mellitus

GLP-1: Peptídeo semelhante ao glucagon 1

GLUT-1: Transportador de glicose 1

IR: Receptor de insulina

I.C.V: Intracerebroventricular

NPY: Neuropeptídeo Y

POMC: Pró-ópio melanocortina

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SNC: Sistema Nervoso Central

STAT3: Sinal de transdução e ativação da transcrição 3

TAG: Triacilglicerol

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fatores ambientais e o Sistema Nervoso Central (SNC)

1.1.1 Obesidade, Diabetes e o Sistema Nervoso Central.

A obesidade é uma doença crônica, multifatorial que cresce rapidamente na sociedade ocidental sendo considerada uma síndrome do século XXI (Arner 2003). Fatores ambientais, como dieta e o sedentarismo, e fatores genéticos, contribuem para o desenvolvimento desta doença (Bains, Wells et al. 2004). A obesidade afeta negativamente o funcionamento dos tecidos periféricos, principalmente muscular e adiposo, e do Sistema Nervoso Central (SNC) (Stranahan, Norman et al. 2008).

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídeos na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma, sem que isso seja nocivo para sua integridade funcional. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocar TAG em períodos em que a oferta de energia é abundante, e para mobilizá-los pela lipólise quando há déficit calórico. A regulação da lipogênese e lipólise ocorrem por meio da oferta de nutrientes e sinais aferentes provenientes dos sistemas nervoso e endócrino (Ahima and Flier 2000).

O sistema nervoso autônomo tem controle direto sobre o tecido adiposo através de seus componentes simpático e parassimpático. A inervação simpática relaciona-se principalmente com as ações catabólicas, tais como a lipólise mediada pelos receptores β -adrenérgicos (Penicaud,

Cousin et al. 2000), por outro lado, o sistema nervoso parassimpático está envolvido na execução dos efeitos anabólicos sobre os depósitos adiposos, como captação de glicose e de ácidos graxos estimulada pela insulina (Kreier, Fliers et al. 2002). O adipócito visceral é metabolicamente mais ativo que o subcutâneo, possui alta atividade lipolítica provocando a liberação de grande quantidade de ácidos graxos livres e é o principal responsável pelos problemas associados com a obesidade (Calle and Kaaks 2004).

O tecido adiposo além da função de armazenamento também age como um órgão endócrino podendo influenciar a fisiologia de outros tecidos (Rajala and Scherer 2003). Ele libera diversas proteínas na corrente sanguínea conhecidas como adipocinas que exercem diferentes funções no organismo incluindo a regulação da homeostasia energética e a resposta a hormônios. As moléculas mais estudadas são os peptídeos hormonais como leptina, adiponectina e resistina e citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (Scherer 2006).

Em indivíduos obesos a intolerância à glicose, resistência periférica à insulina, hipertensão, dislipidemias e aterosclerose estão frequentemente presentes como comorbidades. O conjunto destes fatores é denominado síndrome metabólica (SM) e a sua prevalência é de 30 % na população adulta entre 20 e 60 anos (Antunes, Levandovski et al. 2010). Vários estudos demonstram que o consumo exagerado de dietas ricas em carboidratos simples (hiperpalatável) e/ou rica em gorduras saturadas (hiperlipídica) é capaz de provocar o aparecimento da SM, além de provocar alterações comportamentais associadas a doenças neuropsiquiátricas

(Mattson 2010). Na maior parte dos indivíduos, a SM evolui para o diabetes mellitus (DM) tipo II e /ou para doenças cardiovasculares.

O DM é o mais grave distúrbio metabólico que acomete os seres humanos, sendo considerado um grupo de doenças relacionadas, caracterizadas por hiperglicemia, como resultado de um defeito na secreção e/ou ação da insulina. O DM tipo I é caracterizado por uma destruição autoimune das células β pancreáticas, levando a uma deficiência na produção de insulina, já o DM tipo II é caracterizado por resistência e relativa (ao invés de absoluta) deficiência na sinalização de insulina. Ambas as formas estão associadas com complicações em longo prazo, que afetam os olhos, rins, coração, vasos sanguíneos os nervos e o cérebro (Gispén and Biessels 2000). Estudos clínicos e experimentais demonstram claramente que o DM está associado a déficits cognitivos devido a prejuízos em mecanismos celulares e moleculares ligados à plasticidade sináptica (Figura 1) (Cameron and Cotter 1994) que acabam favorecendo o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Craft and Watson 2004).

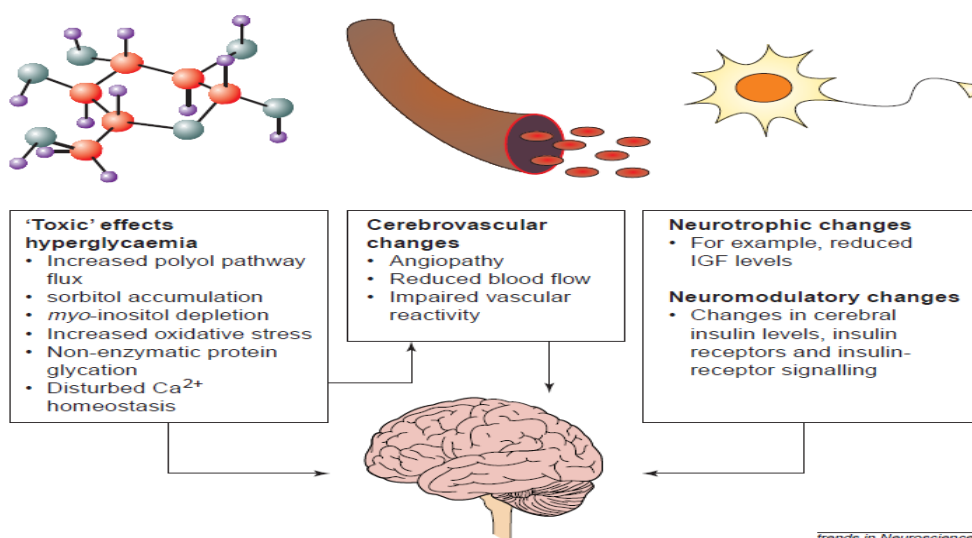


Figura 1: A encefalopatia diabética é uma patogênese não totalmente elucidada, que pode ser dividida em três componentes principais: i) efeitos neurotóxicos da hiperglicemia, incluindo aumento do estresse oxidativo e distúrbios na homeostase do Ca^{2+} ; ii) alterações vasculares; iii) alterações neurotróficas e neuromodulatórias relacionadas com os níveis de insulina e de seu receptor (IR) no cérebro. (Cameron and Cotter 1994)

1.2 Insulina e o Sistema Nervoso Central

O cérebro é protegido de muitas substâncias presentes no sangue através de uma barreira física composta por células especializadas, denominada barreira hematoencefálica. Esta barreira transporta seletivamente tanto substâncias do sangue para o SNC quanto inversamente, além de facilitar o aparecimento de doenças neurológicas, quando sua integridade está alterada (Neuwelt, Bauer et al. 2011). Desta maneira, várias substâncias como hormônios ou fármacos, por exemplo, presentes no sistema periférico, podem atravessar a barreira hematoencefálica e atuar como neuromoduladores, influenciando positivamente ou negativamente várias funções cerebrais (Neuwelt, Bauer et al. 2011).

Inicialmente acreditava-se que o cérebro era insensível à insulina, entretanto, no início da década de 60, foi descoberto que este órgão apresenta receptores de insulina (IR), sendo desta maneira, sensível aos seus efeitos. A insulina exerce importantes funções no cérebro, que envolvem regulação do metabolismo energético, assim como efeitos tróficos e neuromodulatórios importantes para o desenvolvimento e sobrevivência de células neurais (Park 2001). Alguns estudos já demonstraram que o IR está presente em todas as regiões do cérebro, principalmente nos neurônios do hipocampo, córtex cerebral e amígdala. Neste sentido, já foi

observado em diferentes modelos animais que a interrupção ou alteração na sinalização cerebral da insulina causa prejuízo cognitivo e morte neuronal (Lannert and Hoyer 1998).

Alguns autores propõem que a redução do transporte de insulina em toda a barreira hematoencefálica e, conseqüentemente, a redução de sua sinalização cerebral, pode levar a uma resistência cerebral aos efeitos da insulina com efeitos devastadores para a função cerebral (Steen, Terry et al. 2005; Hoyer and Lannert 2007).

Apesar de não se saber ao certo se a resistência periférica à insulina se reflete necessariamente em resistência cerebral, prevenir ou corrigir anormalidades periféricas tem demonstrado ser benéfico em reduzir os prejuízos na função cerebral, principalmente relacionados à função cognitiva. Curiosamente, quando a insulina é administrada periféricamente em doses que não alteram consideravelmente a glicemia, algumas disfunções cognitivas em pacientes com doença de Alzheimer (DA) são revertidas (Neumann, Rojo et al. 2008). Quando se utiliza a insulina intracerebral em modelos animais na maioria das vezes esse hormônio causa uma melhora na função cognitiva (Babri, Badie et al. 2007).

A insulina age ativando, tanto periféricamente como centralmente, vias de sinalização intracelular. Estudos apontam também que a insulina exerce um efeito neuroprotetor e neuromodulador (Frolich, Blum-Degen et al. 1998). Outro importante aspecto é que além de modular o sistema nervoso central, a insulina age no sistema nervoso periférico, simpático e parassimpático, controlando o metabolismo, consumo alimentar e também a

termorregulação (Arruda, Milanski et al. 2011; Florant and Healy 2012; Guenther, Bruder et al. 2012).

1.3 Tratamentos para o Diabetes Mellitus

Vários agentes antidiabéticos surgiram no mercado nas últimas décadas, expandindo as opções terapêuticas para o controle glicêmico em indivíduos com diabetes mellitus e as suas complicações. Os fármacos mais prescritos são os secretagogos e/ou sensibilizadores de insulina (Nicholson and Hall 2011).

Os secretagogos estimulam o pâncreas a secretar insulina resultando na redução da produção de glicose hepática e melhora na absorção de glicose pelos músculos. Há duas classes de secretagogos: sulfoniluréias e não-sulfoniluréias (Luna, Hughes et al. 1999).

Os sensibilizadores melhoram a ação da insulina através de uma variedade de mecanismos, podem agir inibindo a gliconeogênese e a glicólise, inibindo a absorção hepática de glicose ou aumentando a captação de glicose nos tecidos periféricos. Existem três categorias de sensibilizadores: biguanidas, tiazolidinonas e inibidores da glicosidase (Nicholson and Hall 2011).

Os inibidores da glicosidase agem no intestino inibindo a enzima glicosidase retardando a absorção de carboidratos, os mais comuns são acarbose, miglitol e voglibose. Os seus efeitos colaterais são inchaços, cólicas abdominais, flatulência e diarreia (Fonseca and Kulkarni 2008).

As tiazolidinonas aumentam a sensibilidade à insulina através do aumento da eficiência dos transportadores de glicose. As duas tiazolidinonas disponíveis são a rosiglitazona e a pioglitazona. As tiazolidinonas possuem um efeito positivo sobre os lipídios, diminuindo os triglicerídeos e a lipoproteína de alta densidade. O principal efeito colateral desta classe é ganho de peso corporal (Fonseca, Rosenstock et al. 2000).

As biguanidas agem inibindo a gliconeogênese hepática e em menor extensão a glicogenólise, aumentando a sensibilidade à insulina. A metformina é a única biguanida disponível, sendo muito utilizado para o tratamento do diabetes tipo II. Esta droga é capaz de reduzir os níveis de glicose no sangue tanto no jejum quanto no período pós-prandial. Os principais efeitos colaterais da metformina são: cólicas abdominais, náuseas, diarreia, perda de peso e em casos mais extremos acidose láctica (Stumvoll, Haring et al. 2007).

1.3.1 Metformina: Mecanismo de ação

A metformina (1,1 dimetilbiguanida) da classe das biguanidas é uma das drogas antidiabéticas orais mais prescritas no mundo e deve manter essa posição apesar de inúmeros antidiabéticos orais que vêm sendo introduzidos no tratamento da resistência à insulina e do diabetes mellitus tipo II (Bailey and Turner 1996; Wysowski, Armstrong et al. 2003; Esteghamati, Noshad et al. 2013)

A metformina é um derivado da guanidina, o composto ativo hipoglicemiante da *Galega officinalis*. Essa erva medicinal foi usada por

séculos na Europa como tratamento para o diabetes. Mais tarde descobriu-se o composto químico responsável pelo efeito hipoglicemiante da planta, denominado galegina (Bailey and Day 1989). Em 1957 foi publicada a primeira descrição científica da metformina (Ungar, Freedman et al. 1957). Em 1979, na França, entrou em uso clínico pela primeira vez, e foi aprovada pelos Estados Unidos somente em 1994 (Nightingale 1994). Quase 60 anos depois da primeira publicação o mecanismo exato de ação da metformina ainda não está completamente esclarecido. Ensaio clínicos recentes sugerem que a metformina possui eficácia clínica não apenas para o diabetes, podendo ser benéfico para outros distúrbios, como, nefropatia diabética, doenças cardiovasculares, ovário policístico, e prevenção e/ou tratamento para o câncer (Viollet, Guigas et al. 2012). Sendo assim, vêm crescendo o número de estudos clínicos e experimentais envolvendo a metformina, visando elucidar seu mecanismo de ação, a fim de explorar seus potenciais alvos farmacológicos.

1.3.2 Metformina: Metabolismo periférico

Esta droga é descrita como um sensibilizador da insulina, levando a redução na resistência à insulina e uma significativa diminuição de seus níveis no jejum. As propriedades glicoregulatórias da metformina são atribuídas principalmente pela redução da produção da glicose hepática e um aumento na captação da glicose pelos tecidos periféricos (Lv, Wen et al. 2012).

O aumento na sensibilidade à insulina pelo tratamento com metformina é em parte atribuído ao aumento da expressão do IR e da atividade da tirosina cinase (Gunton, Delhanty et al. 2003). Esses efeitos estimulam a cascata de fosforilação de proteínas sinalizadoras que regulam, por exemplo, o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, transporte de metabólitos e proliferação celular (Singh, Gupta et al. 2012).

A partir da década de 60 surgiram vários estudos clínicos e em modelos animais, e hoje, acredita-se, que a função primária da metformina é diminuir a produção da glicose hepática (Cusi, Consoli et al. 1996), principalmente através da inibição da gliconeogênese (Hundal, Krssak et al. 2000; Natali and Ferrannini 2006). Sabe-se, também, que a metformina aumenta os níveis plasmáticos de GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*), uma incretina, que é produzida pelo pâncreas e intestino que atua regulando o metabolismo da glicose (Maida, Lamont et al. 2011).

Além destes efeitos tem se observado um efeito modulador da metformina em mitocôndrias. Sabe-se que esta droga age inibindo o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (El-Mir, Nogueira et al. 2000) (Figura 2), resultando em um aumento na razão celular de AMP/ATP, causando a ativação da AMPK (proteína cinase AMP ativada) (Zhou, Myers et al. 2001). A AMPK coordena a atividade de diversas vias metabólicas que agem para restaurar a energia e o equilíbrio celular. Por exemplo, ela aumenta a translocação de GLUT 1 para a membrana promovendo a captação de glicose (Fryer, Fougelle et al. 2002) e fosforila a fosfofrutocinase 2 ativando a via glicolítica (Marsin, Bertrand et al. 2000). Por outro lado, AMPK estimulada por metformina fosforila proteínas como, TSC2 e Raptor

(proteína alvo de rapamicina em mamíferos 2 – mTOR) inibindo a síntese proteica e fosforila a acetil COA carboxilase, resultando na inibição da síntese lipídica, suprimindo desta maneira as vias que consomem energia (Winder, Wilson et al. 1997).

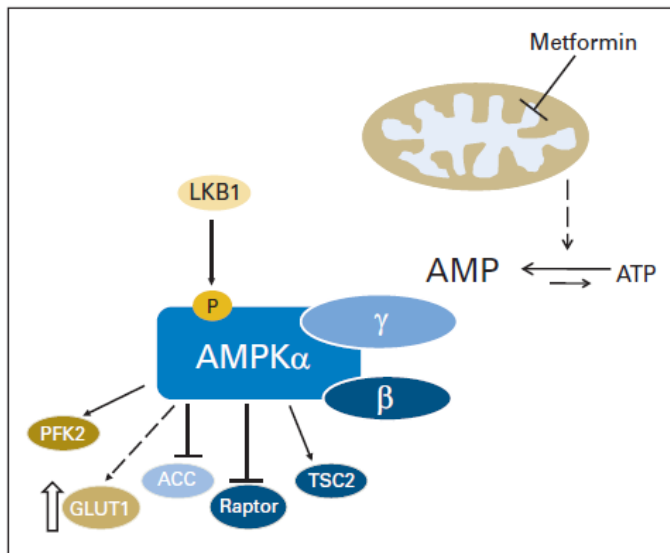


Figura 2: A metformina inibe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, levando à ativação da AMPK, através do aumento da razão AMP/ATP. (El-Mir, Nogueira et al. 2000)

1.3.3 Metformina: Ação cerebral

Os efeitos da metformina no cérebro não foram totalmente elucidados, entretanto o interesse sobre os mecanismos de ação desta droga no sistema nervoso central cresceu nos últimos anos, tendo em vista, o seu potencial farmacológico sobre a resistência cerebral à insulina, que exerce um papel crítico, tanto no metabolismo periférico quanto no metabolismo central (Gupta, Bisht et al. 2011).

Alguns estudos vêm demonstrando que a metformina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo capaz de modular atividades do sistema nervoso central. Quando esta droga é administrada por

gavagem em ratos, os níveis máximos de metformina atingem o cérebro 6 horas após a administração, sendo detectada, no estriado, hipocampo, córtex, hipotálamo, glândula pituitária, bulbo olfativo e cerebelo (Labuzek, Suchy et al. 2010). Em um trabalho com cultura hipotalâmica primária a metformina causou uma diminuição de pAMPK, alterando o balanço energético destas células (Chau-Van, Gamba et al. 2007). A metformina no cérebro desempenha funções, como: regulação do apetite, fosforilação da AMPK, modulação da expressão de neuropeptídeos, inibição do complexo I da cadeia respiratória, entre outros, ainda não descobertos.

Dados recentes sugerem que a metformina também possui um perfil anorexigênico, modulando proteínas hipotalâmicas importantes ligadas ao controle do apetite. Foi demonstrado que a metformina induz anorexia via ação direta no hipotálamo através do aumentando da fosforilação da STAT3 (sinal de transdução e ativação da transcrição 3), consequentemente causando diminuição do apetite (Lee, Choi et al. 2012). Uma subpopulação de neurônios hipotalâmicos co-expressam AgRP (proteína relacionada ao agouti), NPY (neuropeptídeo Y) e POMC (pró-ópio – melanocortina) estes peptídeos são modulados por sinais periféricos hormonais, tais como, insulina, leptina e grelina e são elementos chave do controle metabólico (Gropp, Shanabrough et al. 2005). A aplicação intracerebroventricular de metformina induz anorexia em ratos via modulação destes neurônios hipotalâmicos (Lee, Choi et al. 2012). A metformina além de modular o consumo alimentar, também é capaz de promover a inibição transitória na respiração mitocondrial via complexo I (Owen, Doran et al. 2000; Brunmair, Staniek et al. 2004).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) está envolvida em inúmeros processos celulares tanto fisiológicos como patológicos. Classicamente, dois locais de produção de ROS são reconhecidos na cadeia respiratória, o complexo I e III (Larsen, Rabol et al. 2012).

Em condições fisiológicas normais as mitocôndrias são organelas essenciais para a produção de energia (Ricquier and Bouillaud 2000), os subprodutos das cadeias respiratórias, (ROS) (Wang, Wang et al. 2010) possuem efeitos fisiológicos e sinalizadores para as células, entretanto se não depurados corretamente podem causar danos às células. A desregulação na produção de ROS pode levar a várias condições patológicas no cérebro (Onyango, Lu et al. 2010). A metformina exerce um efeito inibitório na produção de ROS através da inibição do complexo I, bloqueando o fluxo reverso de elétrons entre os complexos I e III da cadeia respiratória (Batandier, Guigas et al. 2006; Kane, Anderson et al. 2010).

Estudos anteriores demonstraram uma correlação entre disfunção mitocondrial e doenças neurodegenerativas (Moreira, Santos et al. 2007). A metformina por modular a função mitocondrial pode alterar o metabolismo fisiológico da mitocôndria e as consequências desta modulação estão sendo investigadas em modelos animais, com o objetivo de elucidar, os mecanismos de ação e suas implicações farmacológicas.

A metformina foi originalmente prescrita para o tratamento do diabetes tipo II, mas há interesse neste fármaco para o tratamento de outras doenças, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, e sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, bem como modular

a sensibilidade à insulina no sistema nervoso periférico e central. Uma possível estratégia para otimizar a função cerebral via modulação por metformina e minimizar os efeitos metabólicos periféricos seria a utilização de administração direta cérebro.

Mesmo considerando as potencialidades farmacológicas da metformina como um agente neuroprotetor poucos trabalhos até hoje estudaram os efeitos da administração central de metformina e as suas implicações na fisiologia cerebral. Uma importante questão ainda não determinada é se a metformina seria capaz de aumentar a sinalização de insulina no cérebro assim como ela faz no sistema periférico. Essa questão ainda não foi abordada por outros estudos e parece ser promissora em termos de estratégia terapêutica para evitar a resistência cerebral à insulina.

1.4 Sistema Nervoso Autônomo: Termorregulação

O sistema nervoso autônomo e endócrino atuam no controle homeostático, equilíbrio hídrico, controle glicêmico e temperatura corporal. A termorregulação é realizada por um sistema de controle fisiológico, que consiste em termorreceptores centrais e periféricos, um sistema de condução aferente, o controle central de integração dos impulsos térmicos (hipotálamo) e um sistema de respostas eferentes levando a respostas compensatórias (Richard, Monge-Roffarello et al. 2012).

No hipotálamo situa-se o sistema de controle central, que regula a temperatura do corpo ao integrar os impulsos térmicos provenientes de quase todos os tecidos do organismo e não apenas em relação à

temperatura central do organismo, o que é considerado como temperatura corporal média. Quando o impulso integrado excede ou fica abaixo da faixa limiar de temperatura, ocorrem respostas termorreguladoras autonômicas, que mantêm a temperatura do corpo em valor adequado (Szekely 2000).

No hipotálamo anterior é feita a integração das informações aferentes térmicas, enquanto que no hipotálamo posterior iniciam-se as respostas efetoras. Na área pré-óptica do hipotálamo existem neurônios sensíveis e não sensíveis à temperatura, sendo que os primeiros podem ser classificados em neurônios sensíveis ao calor e neurônios sensíveis ao frio, estes últimos predominantes (Szekely 2000).

A hipotermia ocorre nos mamíferos quando a temperatura central (TC) do organismo cai abaixo de 35°C, de modo que a TC corresponde à temperatura do coração, pulmão, encéfalo e órgãos esplênicos, já a temperatura periférica (TP) corresponde à pele e aos músculos. Quando a soma entre a retenção e a produção de calor for menor que os fatores que predispoem ao frio, o ser humano se torna hipotérmico, e pode ser classificada em hipotermia acidental (primária) e secundária (Douglas CR; 2000). A hipotermia acidental ou primária é definida como decorrente da redução espontânea da temperatura central, pode estar associada com disfunções orgânicas agudas ou doenças crônicas agudizadas. A hipotermia secundária se caracteriza por disfunções ou lesões do centro termo regulador, causadas por doenças orgânicas ou uso de substâncias com ação no sistema nervoso central (Simon, Pierau et al. 1986).

Estudos demonstraram que a hipotermia e a diminuição do peso corporal podem servir como marcadores de morte em modelos animais submetidos a doenças infecciosas (Trammell and Toth 2011). A regulação da temperatura também é relacionada com a homeostase energética, esta regulação é modulada através do nervo vago. Hipotermia e hipometabolismo são observados em estudos experimentais envolvendo camundongos submetidos ao jejum. Inúmeras substâncias presentes no cérebro estão envolvidas no controle do consumo alimentar e metabolismo energético, alguns sendo anabólicos (aumento do consumo alimentar e conservação de energia, hipometabolismo e hipotermia) e catabólicos (diminuição do consumo alimentar, gasto energético, hipermetabolismo e liberação de calor). Estes incluem neurotransmissores como, norepinefrina, dopamina, serotonina, acetilcolina; aminoácidos, como, glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA) e vários outros peptídeos (Szekely 2000).

A termogênese induzida pela dieta é caracterizada pelo aumento na produção de calor a partir do metabolismo dos substratos energéticos. O bloqueio dos receptores β adrenérgicos pode inibir o efeito térmico após uma refeição rica em carboidratos e a redução da atividade nervosa simpática após a administração central de clonidina, um agonista dos receptores α adrenérgicos, também é capaz de reduzir a termogênese induzida pela dieta, sugerindo que a resposta termogênica após o consumo alimentar envolve circuitos de regulação cerebrais.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da administração intracerebroventricular (i.c.v) de metformina durante sete dias em camundongos, na sensibilidade periférica à insulina, taxa de sobrevivência e na produção mitocondrial de ROS.

1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito anorexígeno da Met i.c.v em relação:
 - Peso corporal
 - Consumo alimentar
 - Avaliar a quantidade de gordura epididimal e mesentérica;
- Avaliar os efeitos da metformina sobre o metabolismo da glicose;
- Avaliar o efeito do tratamento na homeostasia da temperatura corporal;
- Taxa de sobrevivência;
- Investigar a capacidade mitocondrial de geração de ROS (ex vivo) em hipocampo e hipotálamo;
- Avaliar especificamente o impacto da metformina na capacidade mitocondrial de geração de ROS (in vitro) em cultura cortical de neurônio;
- Investigar se a metformina afeta a viabilidade neuronal;
- Avaliar o perfil redox e neurotóxico da metformina em amostras de cérebro e sangue pelos seguintes parâmetros: glutathione

peroxidase, superóxido dismutase, TBARS, S100B e RAGE em amostras de cérebro e sangue;

PARTE II

ARTIGO CIENTÍFICO EM PREPARAÇÃO

Central metformin disrupting body temperature connects metabolic alterations and decreased survival rate

Jussania Gnoatto^a, Andressa Brochier^a, Clarissa Branco Haas^a, Adriano Martimbianco de Assis^a, Jean Pierre Oses^b, Luis Valmor Portela^a, Alexandre Pastoris Muller^{a*}

- a. Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica. Rua: Ramiro Barcelos, 2600 anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.
- b. Programa de Pós-Graduação em Saúde & Comportamento Centro de Ciências da Vida e da Saúde Universidade Católica de Pelotas. Rua Almirante Barroso, 1202 sala G109 96010-280 Pelotas, Rio Grande do Sul Brasil.

***Corresponding author:**

Alexandre Pastoris Muller, PhD

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 anexo

CEP 90035-003

Porto Alegre, RS, Brazil

Email: alexandrep.muller@gmail.com

Telephone: 55 51 33085557

Abstract

Metformin is an insulin-sensitizer, leading to decrease in insulin resistance and in fasting insulin levels. The precise molecular target of metformin is unknown; however, some reports showed the inhibition of complex I on mitochondrial electron transport chain as a possible target, resulting in an increase of the cellular AMP / ATP. Some studies have shown that metformin is able of crossing the blood brain barrier, modulating central nervous system (CNS) function. However the toxicity of this drug in the CNS has been less explored. Within brain metformin is proposed to regulate appetite, phosphorylation of AMPK, expression of neuropeptides and inhibits of complex I of the mitochondrial respiratory chain. In our work metformin were injected intracerebroventricular (i.c.v) at high doses (50 and 100ug) in mice for seven days. We observed a decrease in body weight, food intake, visceral and epididymal fat content, corporal temperature and survival rate. Metformin was also able to increase peripheral sensitivity to insulin and glucose. The basal production of H₂O₂ in mitochondrial preparations hippocampus and hypothalamus was increased by metformin. Similarly, in neuronal cultures there was decreased mitochondrial viability after treatment with metformin and increased production of reactive oxygen species (ROS). In summary, our data indicate that a high dose of metformin directly has neurotoxic effects to the CNS, expressed by hypothermia, hypoglycemia, disrupting mitochondrial function and decreasing survival rate.

Introduction

Diabetes mellitus is a chronic disease impacting patients and society. The estimate of worldwide prevalence of diabetes in 2007 was about 246 million people with type 2 diabetes mellitus (T2DM) representing between 85-95% of the patients (Poolsup, Suksomboon et al. 2012). Prevention and pharmacological management of type 2 diabetes (T2D) has become a major public health challenge around the world (Viollet, Guigas et al. 2012). Metformin (1,1-dimethylbiguanide), a biguanide derivative, is the most widely prescribed drug to treat hyperglycemia in T2D patients being usually prescribed together with lifestyle modification (i.e. diet, weight control, and physical activity)(Adler, Shaw et al. 2009; Nathan, Buse et al. 2009).

Metformin is an insulin-sensitizer, leading to reduction in peripheral insulin resistance and a significant decrease in plasma fasting insulin levels (Viollet, Guigas et al. 2012). The improvement in insulin sensitivity by metformin could be ascribed to its positive effects on insulin receptor expression and tyrosine kinase activity (Gunton, Delhanty et al. 2003). Moreover, a growing body of evidence from clinical studies and animal models suggests that metformin primarily decreases hepatic glucose production (Cusi, Consoli et al. 1996; Hundal, Krssak et al. 2000; Natali and Ferrannini 2006). Although the precise molecular target of metformin is unknown evidence suggests the inhibition of complex I of mitochondrial electron transport chain as a preferential target (El-Mir, Nogueira et al. 2000). In the last two decades insulin was recognized as a neuromodulatory and neurotropic factor (Laurin, Verreault et al. 2001; Park, Jang et al. 2005) affecting fundamental brain functions as cognition, neurotransmission and neuronal survival (Reagan 2007). In contrast, impaired

brain insulin signaling (Park 2001) or hiperactivation of insulin receptor sensitivity (Muller, Gnoatto et al. 2011) is related to neurodegeneration and impaired cognitive function (Rewers, Zaccaro et al. 2004; Grunblatt, Salkovic-Petrisic et al. 2007). Thus, it seems that brain insulin signaling should be finely controlled.

Once inject peripherally metformin can cross the blood-brain barrier and is distributed to all brain areas (Wilcock, Wyre et al. 1991; Labuzek, Suchy et al. 2010). It is possible that drugs that affect peripheral insulin sensitivity also achieve similar effects on brain facilitating insulin neurotrophic and neuromodulatory functions. Although some benefits have been already described there are concerns regarding mid to long-term brain exposition to insulin sensitizers that needs to be elucidated.

In the present study, we aimed to investigate the effects of intracerebroventricular administration (i.c.v) of metformin on peripheral and central physiological outcomes linked with metabolism and mitochondrial ROS production.

Material and Methods

Animals and drugs

Male CF1 mice (40 – 50 g), 2 months old, were obtained from Foundation for Health Science Research (FEPPS, Porto Alegre/RS, Brazil). Animals were placed into a controlled temperature room (22 °C) under a 12 h light/12 h dark cycle (lights on at 7 am) and had free access to food and water.

A total of thirty mice (n=30) were randomly engaged into one of these groups: control (Vehicle = 10), metformin 50 ug (Met 50 = 10) and metformin 100 ug (Met 100 = 10). All experiments were in agreement with the Committee on the Care and Use of Experimental Animal Resources, UFRGS, Brazil. Chloridrate of metformin (EMS S/A) was dissolved in saline (NaCl, 0.9%) at a concentration of 50ug and 100ug.

Treatment and surgical procedure

Animals were anesthetized by an i.p injection of ketamine (Cetamin, Schering-Plough Coopers, Brazil, 100mg/kg body weight) and xylazine (Coopazine, Syntec, Brazil, 10mg/kg body weight). A 27-gauge, 7mm guide cannula was placed 1 mm posterior to the bregma, 1 mm right from the midline and 1 mm above the lateral brain ventricle. Through a 2-mm hole made at the cranial bone, the cannula was implanted 1.5mm ventral to the superior surface of the skull and fixed with jeweler's acrylic cement (Schmidt, Avila et al. 2005). On the third day post-surgery the mice already displayed normal food intake and water consumption as well as spontaneous locomotion; they were thus considered ready for in vivo experiments. Animals received a daily intracerebroventricular (i.c.v) infusion of metformin (Met 50ug or Met 100ug) or saline (NaCl, 0.9%) over 7 consecutive days.

Body mass parameters, blood sampling and survival rate

The body weight and food intake was measured daily during seven consecutive days. The body temperature was measured at first, second, fourth, sixth and seventh days of administration. The animals were sacrificed by decapitation. Blood was collected and centrifuged at 10,000 x g/10 min to obtain

serum samples. Serum was stored at -20°C until the day of analysis. Hippocampus and hypothalamus were dissected to prepare homogenates. Fat tissues from mesenteric and epididymal regions were dissected and weighted as previously described (Parekh, Petro et al. 1998). The survival rate was evaluated during the treatment.

Glucose tolerance test (GTT) and Insulin sensitivity test (IST)

An intraperitoneal injection of glucose (2 mg/g body weight) was performed in 12 h fasted mice 24 h after the last i.c.v metformin injection. The blood was collected by a small puncture on tail immediately before (0 min), 30, 60, and 120 minutes after the injection (Muller, Tort et al. 2010). At each time, glucose was measured by a glucosimeter (AccuChek Active, Roche Diagnostics®, USA).

An intraperitoneal injection of insulin (1U/Kg) was performed in 12 h fasted mice 24 h after the last i.c.v metformin injection. The blood was collected by a small puncture on tail immediately before (0 min), 30, 60, and 120 minutes after the injection (Berleze, Muller et al. 2009). At each time, glucose was measured by a glucosimeter (AccuChek Active, Roche Diagnostics®, USA).

ROS production

The mitochondrial release of H_2O_2 was assessed by the Amplex Red oxidation method. The total homogenate from hippocampus and hypothalamus (0.1 mg protein/ml) were incubated in the standard respiration buffer supplemented with 10 μM Amplex Red and 2 units/mL horseradish peroxidase in polarized and depolarized buffers. The fluorescence was monitored at excitation (563 nm) and emission wavelengths (587 nm) in Spectra Max M5

microplate reader (Molecular Devices) (Muller, Zimmer et al. 2012). Each experiment was repeated at least three times with hippocampal and hypothalamus preparations. The maximal rate (100%) of mitochondrial H₂O₂ formation in depolarized state was assumed to be the difference between the rate of H₂O₂ formation in the absence and in the presence of succinate up to 30 min. ADP was used as control to mitochondrial function by inhibition of ROS production.

Neuronal Cortex Cultures, Neuronal viability and ROS production

Cortices from 16-day-old Wistar rat embryos were dissected and 150.000 cells/well were plaque in neurobasal medium plus B27 supplement (Brewer, Torricelli et al. 1993). After 7 days of culture, the neurobasal medium was replaced by RPMI 1640 medium without B27, which contains glucose 10 mM. To investigate the effects of metformin in neuronal mitochondrial viability, neurons were supplemented with metformin at doses of 0.5mM, 1mM, 2mM, 4mM and 10mM for 60 min. Neuronal viability assay was performed by the colorimetric [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT, Sigma) method. After the treatment neurons were incubated with 0.5 mg/ml of MTT, followed by incubation at 37°C for 45 min. The formazan product generated during the incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide and measured at 560 and 630 nm. Results are expressed as a percentage of control (Moreira, Knorr et al. 2010). To investigate the effects of metformin in ROS production, neurons were supplemented with metformin at doses of 1 mM, 4 mM and 10mM for 60 min. After that cells were incubated with 2µM CM-H2DCFDA for 40 minutes at 37°C with 4% CO₂. The cells were examined under

a Nikon Eclipse TE300 epifluorescence microscope at a fixed exposure time (da-Silva, Gomez-Puyou et al. 2004).

Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

This is widely adopted as a method for the measurement of lipid redox states, as previously described (Draper and Hadley 1990) but adapted to microplate. The samples (around 200 μg of protein) were mixed with 50 μL of 50% TCA and 100 μL of 0.82% thiobarbituric acid and were then heated in a dry bath for 45 min. The level of TBARS was determined by measuring the absorbance of each sample at 532 nm. The concentration of TBARS in the samples was then determined from a calibration curve using 1,1,3,3-tetramethoxypropane (which had been subjected to the same treatment as the supernatants) as a standard. Results are expressed as nanomoles of TBARS per milligram of protein.

Superoxide dismutase assay

Superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated by quantifying the inhibition superoxide-dependent autoxidation of epinephrine, verifying the absorbance of the samples at 480 nm (Boveris 1984). In a plate with 96 wells, we added tissues homogenates (30 μL), 150 μL of 50 mM glycine buffer pH 10.2, and 10 μL of 10 μM catalase. In the auto-oxidation wells were added 180 μL of 50 mM glycine buffer pH 10.2 and 10 μL of 10 μM catalase. The reaction was initiated by adding 10 μL of 60 mM epinephrine. The absorbance was taken at 480 nm, being recorded for 10 min, at 32 °C. Units of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to decrease in 50% the oxidation of

epinephrine by superoxide. The specific activity was expressed in units per mg of protein.

Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was measured according to (Wendel 1981) using tert-butylhydroperoxide as substrate. The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 100 mM potassium phosphate buffer/1 mM ethylenediamine tetra acetic acid, pH 7.2, 2 mM GSH, 0.15 U/mL glutathione reductase, 0.4 mM Azide, 0.5 mM tert-butylhydroperoxide, 0.1 mM NADPH. One GPx unit (U) is defined as 1 μ mol of NADPH consumed per minute. The specific activity was calculated as U/mg protein.

S100B and RAGE ELISA assay

S100B serum levels were measured with sandwich-ELISA, using a commercial kit according to the manufacturer instructions (Sangtec[®]100 ELISA, DiaSorin, Inc., Stillwater, USA) (Oses, Leke et al. 2004). RAGE hippocampus levels were measured with sandwich-ELISA, using a commercial kit according to the manufacturer instructions (DuoSet ELISA Development, R&D Systems, Inc., USA) (Liu, Xing et al. 2012).

Statistical Analysis

The data was represented as mean \pm S.E.M. The line graphs were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by Bonferroni post-hoc. The column bar graphs were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc. P

values < 0.05 was considered statistically different. Cumulative survival probability was plotted on a Kaplan–Meier.

Results

Metformin affected food intake and body weight, temperature and survival rate

The food intake was decreased by Met 50ug and Met 100ug from second to seventh day of administration (Figure 1 A; * Met 100 $<$ vehicle, # Met 50 $<$ vehicle $p < 0.05$). The vehicle group had normal food intake over seven days (Figure 1 A). The administration intracerebroventricular (i.c.v) of Met 50ug decreased body weight from third to seventh day (Figure 1 B; # Met 50ug $<$ vehicle, $p < 0.05$). Met 100ug decreased the body weight from second to seventh day (Figure 1 B;* Met 100ug $<$ vehicle, $p < 0.05$). The body weight remains normal vehicle group (Figure 1 B). Met 50ug decreased body temperature from fourth to seventh day of treatment (Figure 1 C; # Met 50ug $<$ vehicle; $p < 0.05$) while Met 100ug decreased the body temperature from second to seventh day (Figure 1 C;* Met 100ug $<$ vehicle; & Met 100ug $<$ Met 50ug $<$ vehicle $p < 0.05$). The vehicle group showed normal body temperature over seven days (FIG 1C). The survival rate curve showed that in Met 50ug group animals start to die at third day of administration and in the seventh day only 60% of animals survive (Figure 1 D). In Met 100ug, animals start to die at first day of administration and in the last day only 40% of animals survive (Figure 1 D).

Fat pads

Met 50 and 100ug decreased epididymal (Figure 2 A; * Met 100ug and 50ug < vehicle; $p < 0.05$) and mesenteric fat pads (Figure 2 B; * Met 100ug and 50ug < vehicle; $p < 0.05$) when compared to vehicle group. Moreover, mesenteric fat pad in Met 100ug was lower compared to Met 50ug (# Figure 2 B, Met 100ug < met 50ug; $p < 0.05$)

GTT and IST

Baseline (time 0) glucose level of Met 100ug was decreased compared to vehicle and Met 50ug (Figure 3 A; * Met 100ug < vehicle and Met 50ug; $p < 0.05$). After glucose injection Met 100 group had lower glucose levels compared to others groups at 30, 60 and 120 min (Figure 3 A; * Met 100ug < vehicle and Met 50ug; $p < 0.05$). In the ITT, Met 100ug group showed a lower glucose level compared the vehicle and Met 50ug. At 30, 60 and 120 min after insulin injection Met 50ug and Met 100ug groups showed a lower glucose level when compared to vehicle group. Moreover, Met 100ug showed lower glucose compared to Met 50ug (Figure 3 B; * Met 50ug < vehicle; & Met 100ug < met 50ug; $p < 0.05$)

Metformin i.c.v 100ug disturbs the mitochondrial H₂O₂ production on hippocampus and hypothalamus

Hippocampus and hypothalamus homogenates were responsive to succinate, an activator of mitochondrial H₂O₂ production. ADP decreased H₂O₂ production in vehicle and Met 50ug (Figure 4 A and B; * H₂O₂ production succinate > H₂O₂ production baseline; $p < 0.05$). Met 100ug showed increased in the H₂O₂ production at basal level (Figure 4 A and B # H₂O₂ production

without substrate Met 100ug > Met 50ug and vehicle; $p < 0.05$). Succinate did not stimulate H_2O_2 production over basal levels (Figure 4 A and B).

MTT and ROS production in neurons

Neuronal mitochondrial viability was measured by MTT colorimetric assay. Metformin was added to the culture at doses: 0.5mM-10mM for 60 min. The mitochondrial viability decreased in a dose dependent manner (Figure 5 A * vehicle > treated groups; $p < 0.05$). The ROS production in neurons was measured by fluorescent probe CM-H₂DCFDA. Met was added to the culture at doses: 1, 4 and 10mM for 60min. The ROS production increased in Met groups in a dose dependent manner. (Figure 5 B * vehicle < Met 1, 4 and 10mM; $p < 0.05$)

Oxidative stress parameters and neuroinflammatory parameters

Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and TBARS were measured in blood, hippocampus and hypothalamus. There were no significant differences between groups. There was no difference in RAGE in hippocampus between groups. Glial response to Met i.c.v. administration was evaluated through S100B levels in hippocampus and serum. Also, there was no difference between groups (Table 1).

Discussion

The present work showed that seven days of Met (50-100ug) i.c.v impairs the capacity of mice in regulates body temperature, decreased the body weight and caused death. In addition, Met greatly alter glucose homeostasis, decreased fat pads and disturbs brain mitochondrial function.

Drugs designed to increase the peripheral insulin sensitivity may potentially exert similar effects on brain; however there are few studies evaluating this assumption using metformin direct on brain. Improving brain insulin sensitivity might be a feasible strategy to prevent or treat neurodegenerative disorders that course with brain insulin resistance. It has been shown that up to 24 h Met has dose dependent anorexic effects decreasing food intake and optimizing energy production via regulation of hypothalamic circuits (Lv, Wen et al. 2012). Indeed, Met i.c.v. 24h increased phosphorylation of STAT3, a hypothalamic protein involved in satiety response (Lee, Choi et al. 2012). We showed that seven days of i.c.v administration decreased food intake which paralleled with decreased body weight and fats. This reinforces the proposed role of metformin on control of food intake and energy expenditure by modulating AgRP neurons (Gropp, Shanabrough et al. 2005).

The proposed effects of Met on adipose tissue are associated to inhibition of lipogenesis and stimulation of lipolysis (Luna and Feinglos 2001). We achieved a decreased epididymal and mesenteric fat pads that seems to be caused by Met. However, these findings could be secondary to decreased food intake and impaired thermoregulation, which increased fat oxidation. These

settings of results suggest that administration at lower doses of Met i.c.v may be promising strategy for experimental studies of obesity and diabetes (Petersen, Andersen et al. 2001). The impact of Met in hypothalamus the main brain regulatory center of feeding behavior and caloric expenditure as well as on fat pads deserves further attention.

Another aspect involving intracerebral injections of Met is the influence on peripheral sympathetic nerve activity (Petersen and DiBona 1996; Petersen, Andersen et al. 2001). Here, we postulate that Met-induced hypothermia was due to impair sympathetic nerve activity, which can be considered the primary alteration associated with increased mortality rate. It was demonstrated that the integrity of sympathetic nerve response is necessary to maintain an adequate inflammatory response and thermoregulatory functions (Whitaker, Sulzer et al. 2010; Trammell and Toth 2011). Also, at higher doses tested here Met affects the mechanisms involved in the regulation of glucose homeostasis resulting in hypoglycemia and impaired insulin sensitivity.

One well determined molecular target of Met is the complex I of the mitochondrial electron transfer chain. Met inhibits complex I thus decreasing oxidative respiration (El-Mir, Nogueira et al. 2000) and increasing ROS production. In hippocampus and hypothalamus, i.c.v Met 100ug disrupted the mitochondrial response to the substrate ADP while the administration on neuronal cultures similarly increased ROS production and decreased mitochondrial viability. This rises that together with impaired thermoregulation, mitochondrial hypofunction is the basis behind energy homeostasis and neurotoxicity.

In conclusion we showed that direct administration of Met on brain over seven days causes severe hypothermia, hypoglycemia and disturbs mitochondrial function/viability which parallel with increased mortality rate in mice.

References

- Adler, A. I., E. J. Shaw, et al. (2009). "[New drugs for control of blood glucose in type 2 diabetes: summary of the NICE guidelines]." Praxis (Bern 1994) **98**(20): 1161-1163.
- Berleze, K. J., A. P. Muller, et al. (2009). "Gestational and postnatal low protein diet alters insulin sensitivity in female rats." Exp Biol Med (Maywood) **234**(12): 1437-1444.
- Boveris, A. (1984). "Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria." Methods Enzymol **105**: 429-435.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, et al. (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." J Neurosci Res **35**(5): 567-576.
- Cusi, K., A. Consoli, et al. (1996). "Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Endocrinol Metab **81**(11): 4059-4067.
- da-Silva, W. S., A. Gomez-Puyou, et al. (2004). "Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria." J Biol Chem **279**(38): 39846-39855.
- Draper, H. H. and M. Hadley (1990). "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation." Methods Enzymol **186**: 421-431.
- El-Mir, M. Y., V. Nogueira, et al. (2000). "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I." J Biol Chem **275**(1): 223-228.
- Gropp, E., M. Shanabrough, et al. (2005). "Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding." Nat Neurosci **8**(10): 1289-1291.
- Grunblatt, E., M. Salkovic-Petrisic, et al. (2007). "Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein." J Neurochem **101**(3): 757-770.
- Gunton, J. E., P. J. Delhanty, et al. (2003). "Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2." J Clin Endocrinol Metab **88**(3): 1323-1332.
- Hundal, R. S., M. Krssak, et al. (2000). "Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes." Diabetes **49**(12): 2063-2069.
- Labuzek, K., D. Suchy, et al. (2010). "Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide." Pharmacol Rep **62**(5): 956-965.
- Laurin, D., R. Verreault, et al. (2001). "Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons." Arch Neurol **58**(3): 498-504.
- Lee, C. K., Y. J. Choi, et al. (2012). "Intracerebroventricular injection of metformin induces anorexia in rats." Diabetes Metab J **36**(4): 293-299.
- Liu, H., A. Xing, et al. (2012). "Regulation of beta-amyloid level in the brain of rats with cerebrovascular hypoperfusion." Neurobiol Aging **33**(4): 826 e831-842.
- Luna, B. and M. N. Feinglos (2001). "Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus." Am Fam Physician **63**(9): 1747-1756.
- Lv, W. S., J. P. Wen, et al. (2012). "The effect of metformin on food intake and its potential role in hypothalamic regulation in obese diabetic rats." Brain Res **1444**: 11-19.
- Moreira, J. D., L. Knorr, et al. (2010). "Dietary omega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats." J Nutr Biochem **21**(4): 351-356.

- Muller, A. P., J. Gnoatto, et al. (2011). "Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice." Hippocampus **21**(10): 1082-1092.
- Muller, A. P., A. H. Tort, et al. (2010). "Metabolic and behavioral effects of chronic olanzapine treatment and cafeteria diet in rats." Behav Pharmacol **21**(7): 668-675.
- Muller, A. P., E. R. Zimmer, et al. (2012). "Physical exercise exacerbates memory deficits induced by intracerebroventricular STZ but improves insulin regulation of H₂O₂ production in mice synaptosomes." J Alzheimers Dis **30**(4): 889-898.
- Natali, A. and E. Ferrannini (2006). "Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review." Diabetologia **49**(3): 434-441.
- Nathan, D. M., J. B. Buse, et al. (2009). "Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetes Care **32**(1): 193-203.
- Oses, J. P., R. Leke, et al. (2004). "Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylentetrazol." Brain Res Bull **64**(3): 237-242.
- Parekh, P. I., A. E. Petro, et al. (1998). "Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice." Metabolism **47**(9): 1089-1096.
- Park, C. R. (2001). "Cognitive effects of insulin in the central nervous system." Neurosci Biobehav Rev **25**(4): 311-323.
- Park, S., J. S. Jang, et al. (2005). "Exercise enhances insulin and leptin signaling in the cerebral cortex and hypothalamus during dexamethasone-induced stress in diabetic rats." Neuroendocrinology **82**(5-6): 282-293.
- Petersen, J. S., D. Andersen, et al. (2001). "Intracerebroventricular metformin attenuates salt-induced hypertension in spontaneously hypertensive rats." Am J Hypertens **14**(11 Pt 1): 1116-1122.
- Petersen, J. S. and G. F. DiBona (1996). "Acute sympathoinhibitory actions of metformin in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **27**(3 Pt 2): 619-625.
- Poolsup, N., N. Suksomboon, et al. (2012). "Efficacy of various antidiabetic agents as add-on treatments to metformin in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis." ISRN Endocrinol **2012**: 798146.
- Reagan, L. P. (2007). "Insulin signaling effects on memory and mood." Curr Opin Pharmacol **7**(6): 633-637.
- Rewers, M., D. Zaccaro, et al. (2004). "Insulin sensitivity, insulinemia, and coronary artery disease: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study." Diabetes Care **27**(3): 781-787.
- Schmidt, A. P., T. T. Avila, et al. (2005). "Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice." Neurochem Res **30**(1): 69-73.
- Trammell, R. A. and L. A. Toth (2011). "Markers for predicting death as an outcome for mice used in infectious disease research." Comp Med **61**(6): 492-498.
- Viollet, B., B. Guigas, et al. (2012). "Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview." Clin Sci (Lond) **122**(6): 253-270.
- Wendel, A. (1981). "Glutathione peroxidase." Methods Enzymol **77**: 325-333.
- Whitaker, A. M., J. Sulzer, et al. (2010). "Sympathetic modulation of the host defense response to infectious challenge during recovery from hemorrhage." Neuroimmunomodulation **17**(6): 349-358.

Wilcock, C., N. D. Wyre, et al. (1991). "Subcellular distribution of metformin in rat liver."
J Pharm Pharmacol **43**(6): 442-444.

Legend to figures:

Figure 1. Effects of i.c.v. metformin administration on food intake, body weight, body temperature and survival rate. A) The treatment with metformin decreased food intake, # Met 50ug < vehicle and * Met 100ug < vehicle from second day on until seventh day; B) Met 50ug decreased body weight: # Met 50 < vehicle from third day on until seventh day. Met 100ug decreased body weight: * Met 100 < vehicle from second day on until seventh day. & Met 100ug < Met 50ug < vehicle on seventh day. C) Body temperature: The rectal body temperature was measured during Met i.c.v administration. # Met 50ug < vehicle on fourth day, * Met 100ug < vehicle on the first day on until seventh and & Met 100ug < Met 50ug < vehicle; one-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by Bonferroni post-hoc, $p < 0.05$. D) Survival: Metformin decreased survival, in Met 50ug 40 % of de mice died and in Met 100ug 60 % died. Cumulative survival probability was plotted on a Kaplan–Meier; $p < 0.05$.

Figure 2: Epididymal and mesenteric fat pads. A) The treatment with metformin decreased epididymal fat pad, * Met 100ug and Met 50ug < vehicle; one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc, $p < 0.05$. B) The treatment with metformin decreased mesenteric fat pad, * Met 100ug and Met 50ug < vehicle; # Met 100ug < Met 50ug; one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc, $p < 0.05$.

Figure 3: Glucose tolerance test (GTT) and Insulin sensitivity test (IST). A) The treatment with metformin altered the glucose tolerance test. At baseline (time 0) * Met 100ug < Met 50ug and vehicle. After glucose injection * Met 100ug < Met 50ug and vehicle on until the 120 minutes. # Met 50ug < vehicle at time (120 minutes); one-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by Bonferroni post-hoc, $p < 0.05$. B) The treatment with metformin altered the insulin sensitivity test. At baseline (time 0) and thirty minutes * Met 100ug < vehicle, at 120 minutes # Met 100ug < Met 50ug < vehicle; one-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by Bonferroni post-hoc, $p < 0.05$.

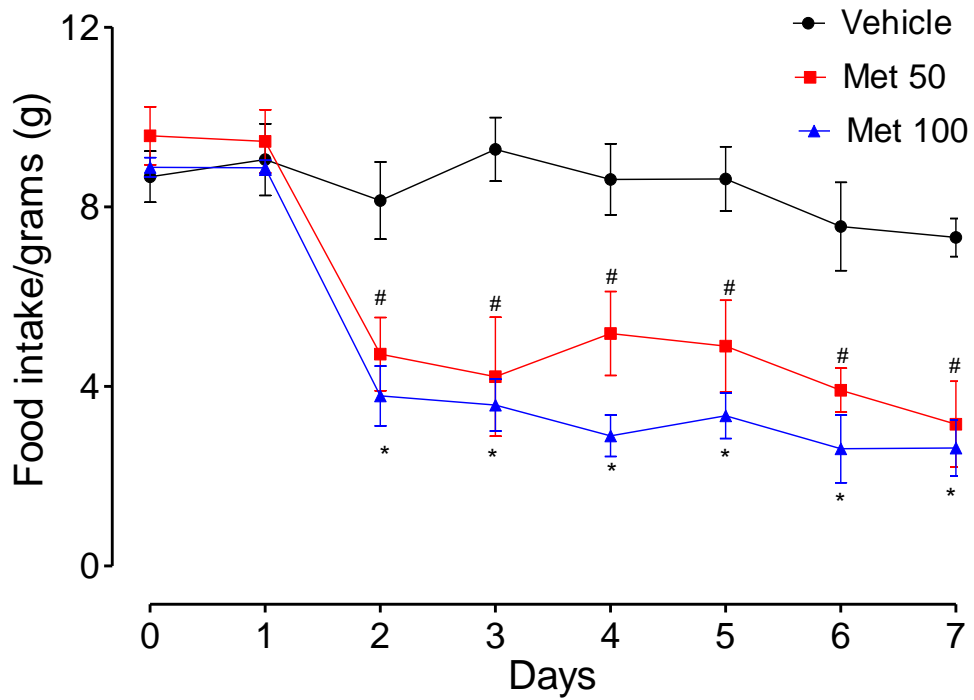
Figure 4: The treatment with metformin increased H₂O₂ production in hippocampus and hypothalamus at the highest dose: 100ug. A) H₂O₂ production in hippocampus, * H₂O₂ production succinate > H₂O₂ production baseline in Met 50ug and vehicle groups, # H₂O₂ production baseline in Met 100ug > H₂O₂ production baseline in Met 50ug and vehicle groups; one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc, $p < 0.05$. B) H₂O₂ production in hypothalamus, * H₂O₂ production succinate > H₂O₂ production baseline in Met 50ug and vehicle groups, # H₂O₂ production baseline in Met 100ug > H₂O₂ production baseline in Met 50ug and vehicle groups; one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc, $p < 0.05$.

Figure 5: Neuronal mitochondrial viability by MTT assay and ROS production in neurons. A) MTT, the viability was altered by treatment with metformin in dose-dependent manner, $F(5,18) = 168.135$ (dose-

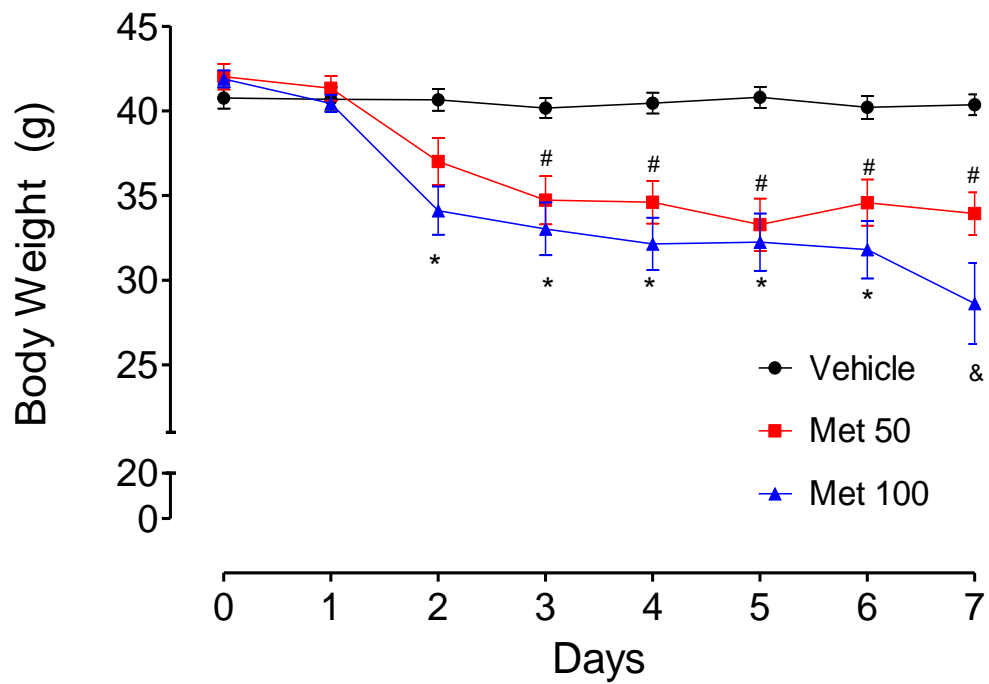
effect), $p=0.0001$. R squared= 0.973 (linear regression), * Vehicle > others groups. B) Quantification of green fluorescence microscopy images (% of control). The ROS production in neurons was measured by fluorescent probe CM-H2DCFDA. Met increased the ROS production in dose-dependent manner, $F(3,12)=11.472$ (dose-effect), $p=0.001$. R squared= 0.677 (linear regression), * Vehicle < Met 1, 4 and 10mM.

Figure 1

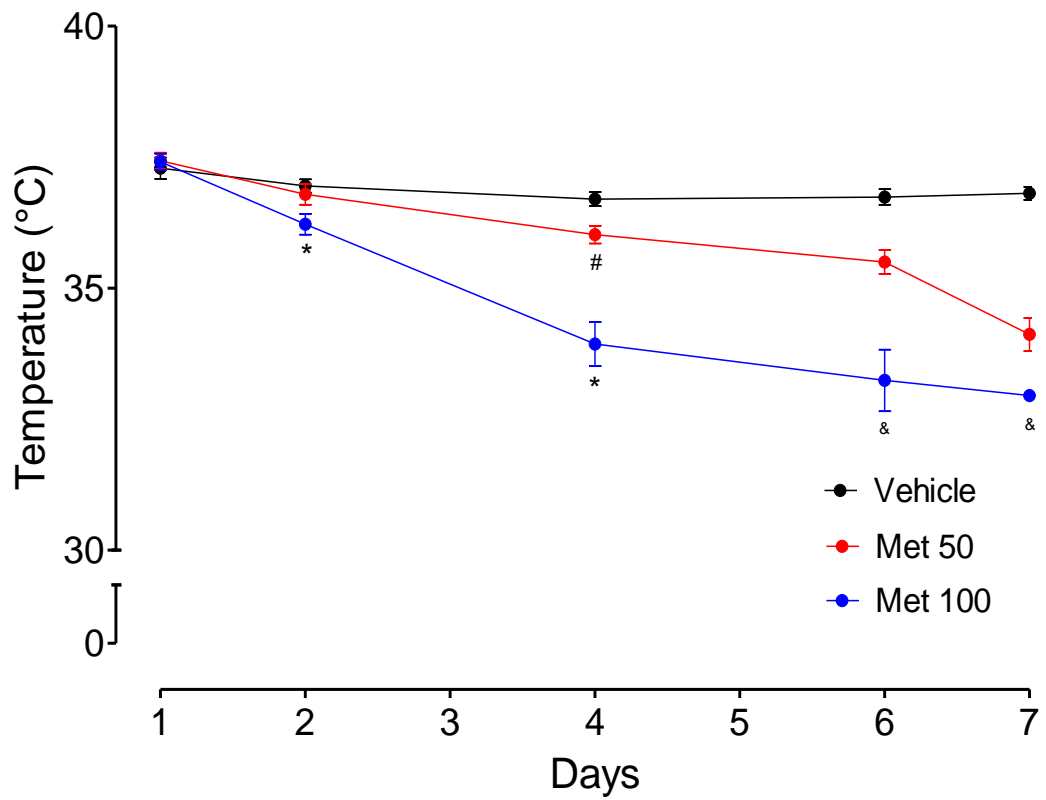
A



B



C



D

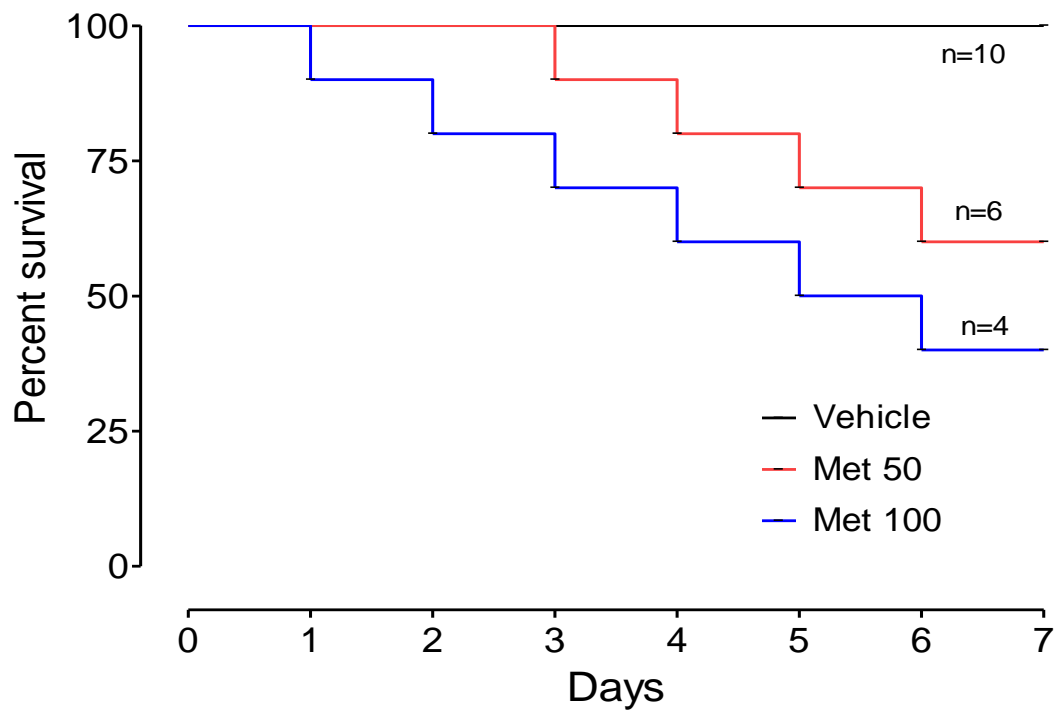
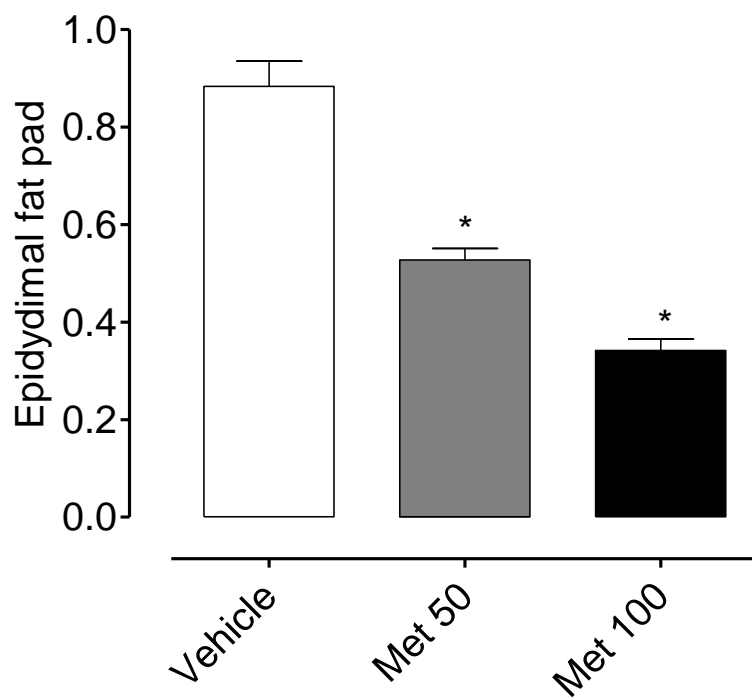


Figure 2

A



B

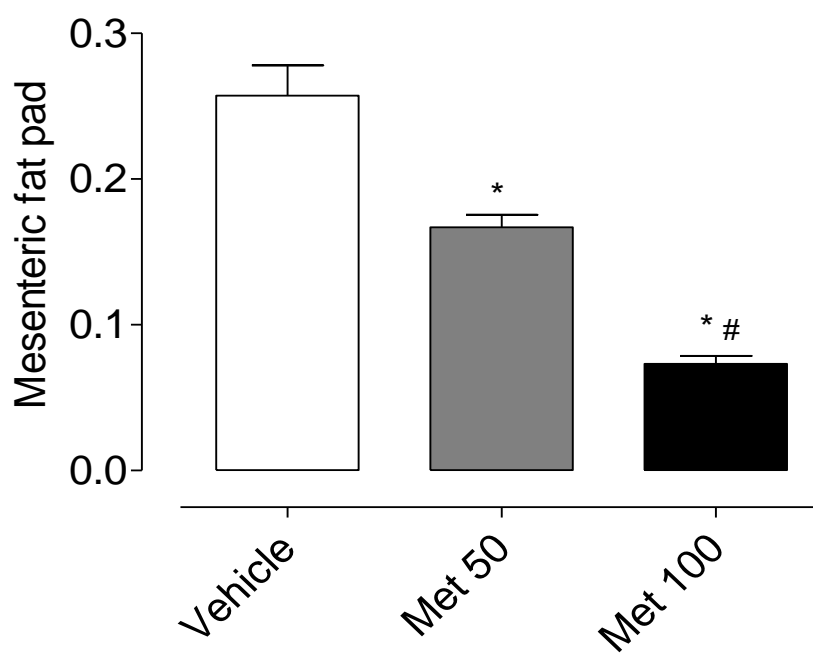
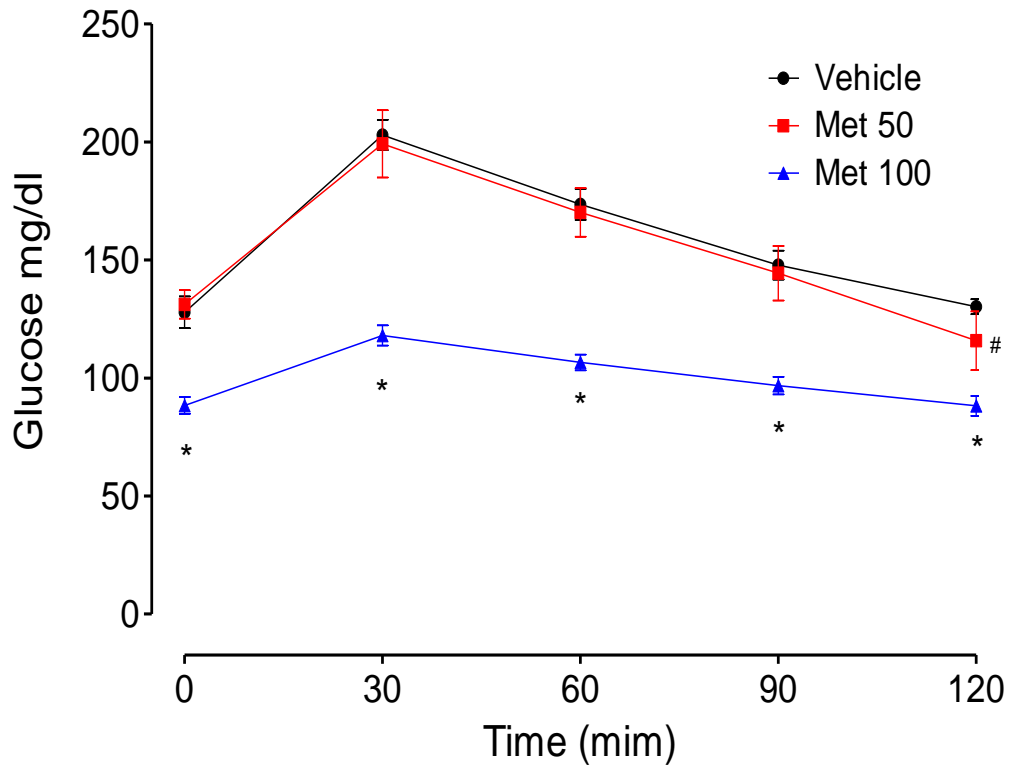


Figure 3

A



B

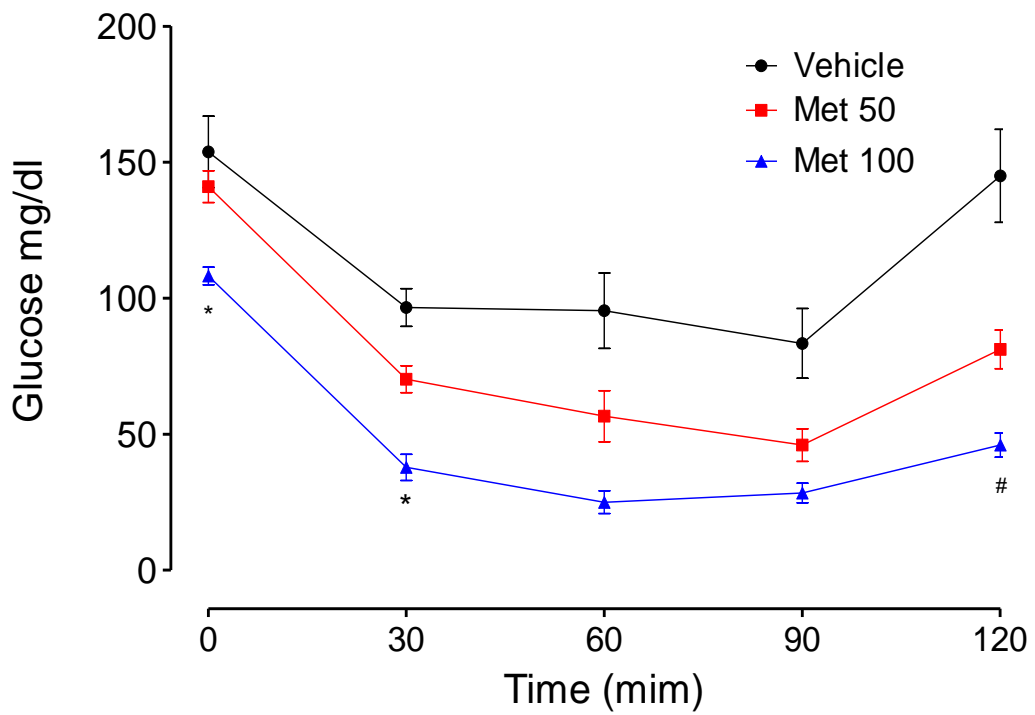
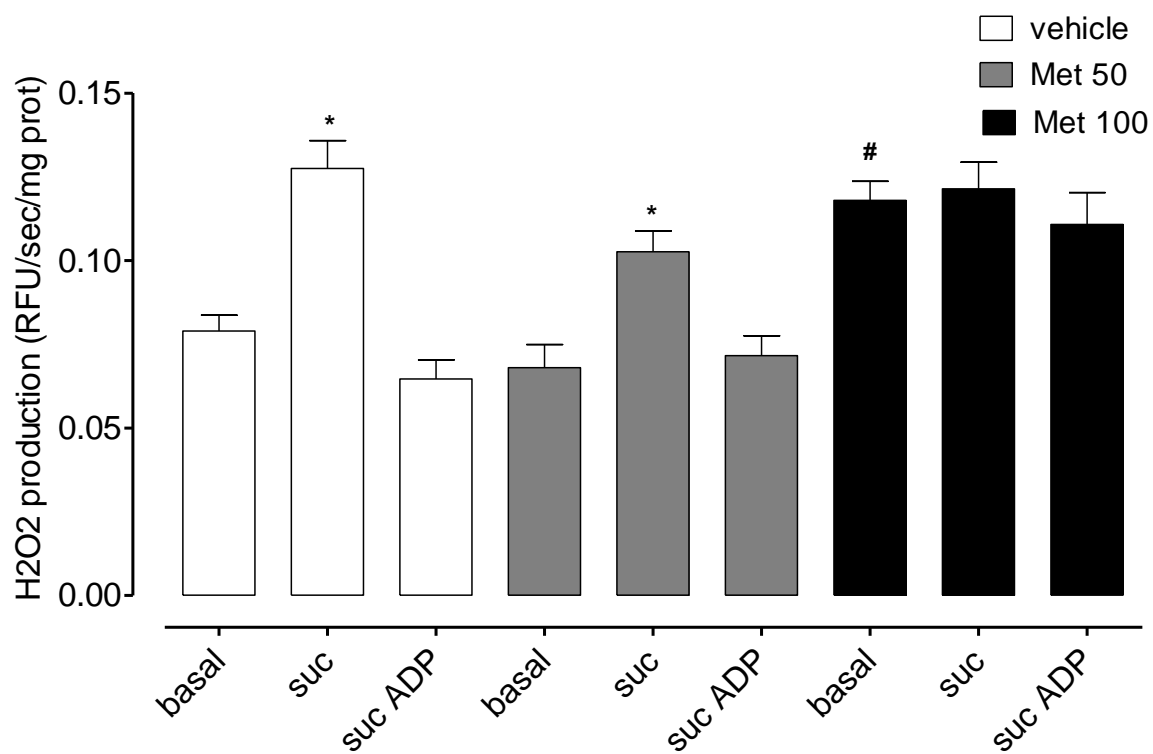


Figure 4

A



B

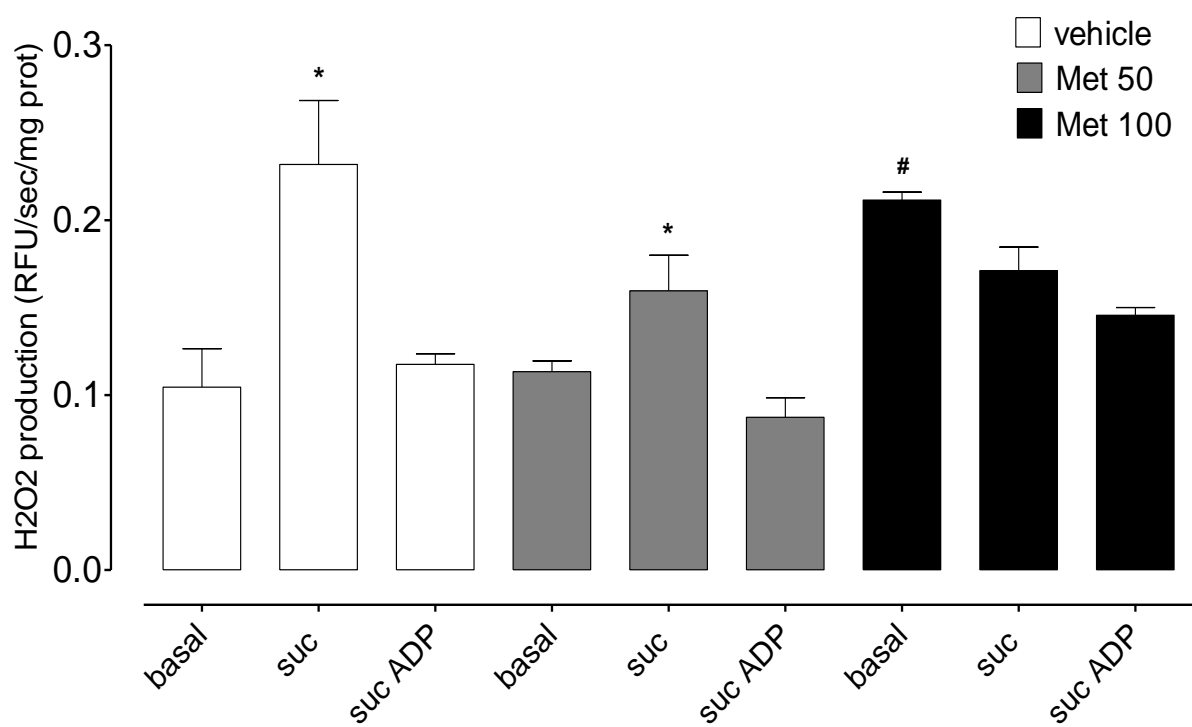
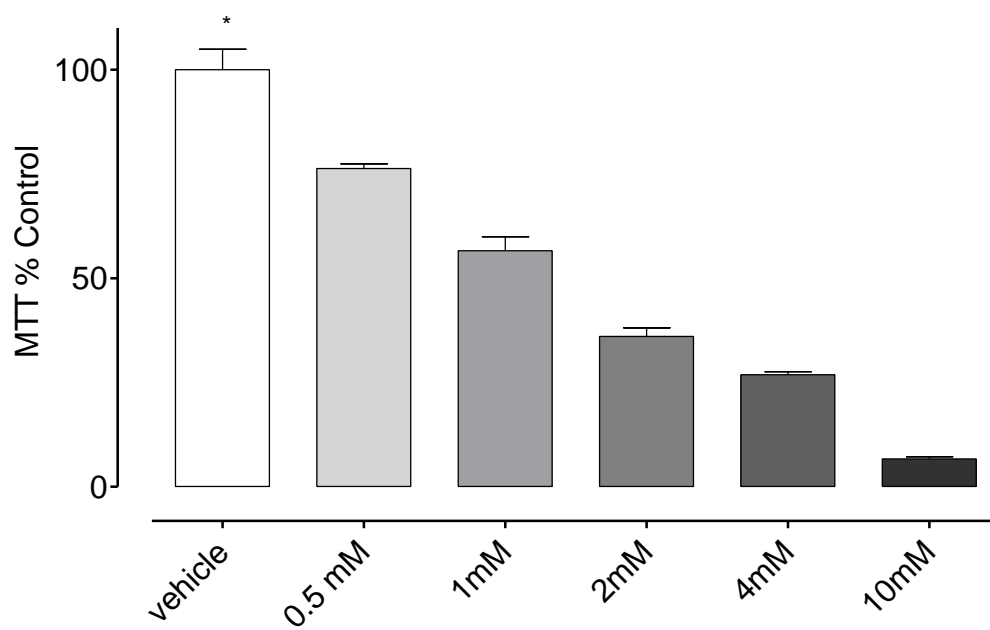
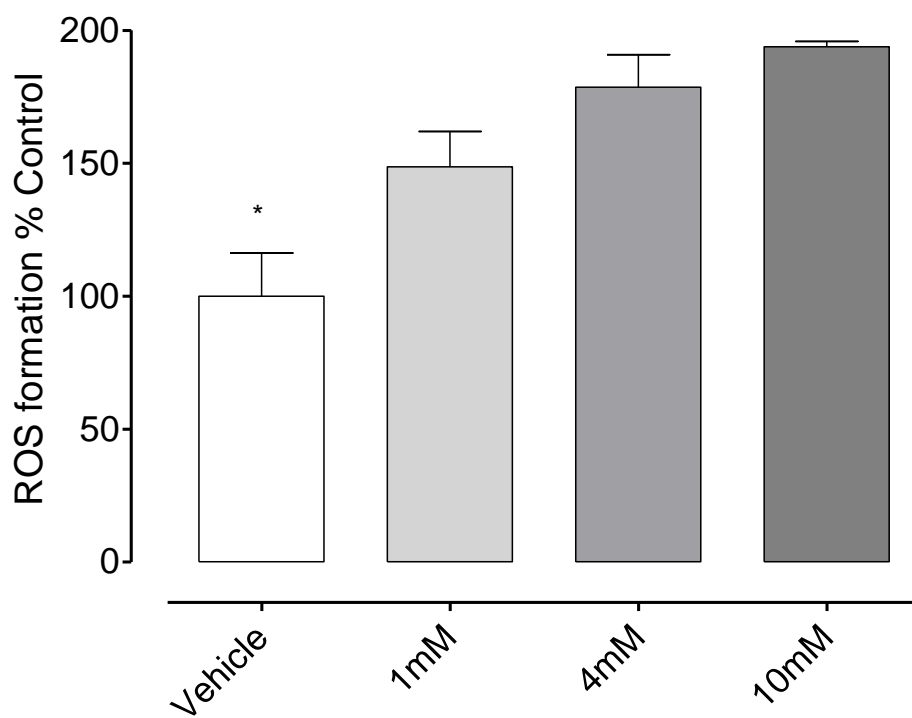


Figure 5

A



B



Representative Images of figure 5 B

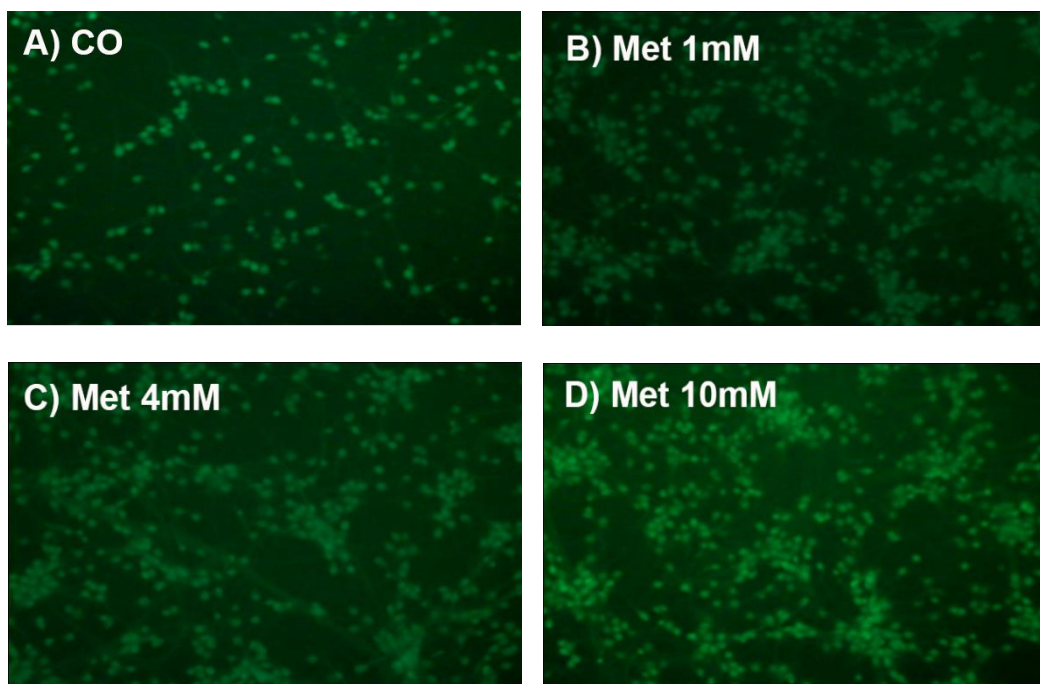


Table 1.	Vehicle	Met 50ug	Met 100ug
<i>Glutathioneperoxidase U GPx/mg protein</i>			
Hippocampus	27 ± 1.5	35 ± 3.7	33 ± 3.9
Hypothalamus	48 ± 9.8	37 ± 7.9	44 ± 3.1
Serum	34 ± 7.1	25 ± 8.2	37 ± 8.3
<i>SuperoxideDismutase U SOD/mgprotein</i>			
Hippocampus	11 ± 0.5	10 ± 0.2	11 ± 1.2
Hypothalamus	11 ± 0.2	10 ± 0.6	12 ± 1.5
Serum	5.0 ± 0.7	6.0 ± 0.5	6.0 ± 1.0
<i>TBARS nmol TBARS/ mg protein</i>			
Hippocampus	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00
Hypothalamus	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.02
Serum	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
<i>S 100B ng/mg</i>			
Hippocampus	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.1
Serum	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.03
<i>RAGE pg/mg</i>			
Hippocampus	12 ± 1.7	13 ± 1.3	9.0 ± 1.4

PARTE III

1. DISCUSSÃO

A obesidade é considerada uma epidemia mundial, sendo responsável por uma série de doenças relacionadas, de alto impacto na sociedade. O excesso de peso predispõe o organismo a uma série de doenças, como o diabetes mellitus tipo II. A metformina é um antidiabético oral da classe das biguanidas, que é amplamente utilizada no Brasil e nos Estados Unidos para o tratamento do diabetes, devido aos seus efeitos benéficos sobre os níveis de glicose e lipídeos no plasma, e diminuição do peso corporal (Komori, Yoshida et al. 2004).

Neste trabalho, através da administração i.c.v, avaliamos os efeitos da metformina no sistema nervoso periférico e central. Esta droga é utilizada por via oral e atravessa a barreira hematoencefálica podendo desempenhar funções importantes neste órgão. Há poucos estudos envolvendo metformina e cérebro, portanto, uma investigação sobre o mecanismo de ação da droga e suas funções cerebrais é relevante, sabendo que existe uma correlação entre resistência à insulina e doenças cerebrais (De Felice 2013).

Em nosso estudo verificamos que a administração i.c.v. de metformina prejudicou drasticamente a sobrevivência dos animais em ambas as doses utilizadas (50 e 100ug). Além disso, diminuiu o peso, consumo alimentar e a temperatura corporal, estes resultados podem estar relacionados com o efeito central da metformina sobre o cérebro e uma possível interação entre sistema nervoso central e periférico. A administração intracerebroventricular aguda de metformina é capaz de diminuir a pressão arterial e a atividade do

nervo simpático renal, sugerindo que esta droga pode inibir a atividade do nervo simpático periférico através da estimulação do sistema nervoso central e esta inibição simpática resulta no aumento da variabilidade da atividade nervosa eferente (Andersen, Haugan et al. 1997; Broman, Kallskog et al. 1998; Petersen, Andersen et al. 2001). Os nervos aferentes enviam informações sobre a termorregulação para o hipotálamo que produz uma resposta enviada ao sistema periférico pelos nervos eferentes.

Observamos em nosso trabalho uma queda na temperatura corporal já no segundo dia de tratamento, no sétimo dia a temperatura média do grupo Met 50 foi, 34°C e do grupo Met 100, 32°C enquanto que o grupo controle manteve a temperatura média inicial de 37°C. Esta desregulação no controle da temperatura observada nos animais tratados com metformina pode estar relacionada com a inibição do nervo simpático eferente e consequentemente com o aumento da mortalidade.

Denis Richard et al 2012, mostraram que ativação da termogênese no tecido adiposo marrom é controlada estritamente pelo sistema nervoso simpático. O tecido adiposo marrom é inervado pelos neurônios pós-ganglionares dos nervos eferentes, estes neurônios liberam noradrenalina cuja ação dos receptores β adrenérgicos leva a quebra dos triglicerídeos em ácidos graxos estimulando a termogênese. A atividade do sistema nervoso simpático no tecido adiposo marrom é controlada pelos centros cerebrais autônomos, incluindo hipotálamo e tronco cerebral, que são regiões que participam da termogênese induzida pelo frio e no balanço da regulação energética (Richard, Monge-Roffarello et al. 2012).

Esta desregulação na temperatura corporal, observada em nosso trabalho, é um fator relevante e está associado ao aumento da mortalidade em doenças infecciosas (Trammell and Toth 2011). Observamos um aumento na mortalidade dos animais tratados com metformina, de 40 % na dose de 50ug e de 60% na maior dose, 100ug.

Outro aspecto relacionado com os efeitos no sistema nervoso central da metformina é a regulação do apetite. Estudos mostram que a metformina administrada por via oral em ratos obesos diabéticos suprime o apetite (Huupponen, Ojala-Karlsson et al. 1992; Rouru, Huupponen et al. 1992; Paolisso, Amato et al. 1998; Ashwell and McMurry 2003). O mecanismo de indução da anorexia via metformina ainda não está totalmente esclarecido, mas acredita-se que é devido ao aumento da sensibilidade à insulina, afetando o equilíbrio energético do corpo e as necessidades calóricas resultando na diminuição da ingesta alimentar (Lv, Wen et al. 2012). A AMPK é um sensor metabólico de energia, quando os níveis celulares de AMP aumentam, esta proteína é ativada por fosforilação. O aumento da pAMPK no músculo esquelético aumenta a produção de energia, enquanto que no hipotálamo este aumento age diminuindo o apetite (Lee, Choi et al. 2012). A metformina também é capaz de modular a ingesta alimentar através do aumento nos níveis de GLP-1 no plasma. Peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) é uma incretina liberada pelas células L do intestino após o consumo alimentar e está relacionada a saciedade e inibição da ingesta alimentar (Yasuda, Inoue et al. 2004).

Os resultados de *Wen-Shan et al 2012*, mostraram que a metformina atravessa a barreira hematoencefálica e modula a regulação do consumo

alimentar no hipotálamo através da inibição do neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada ao Agouti (AgRP). NPY e AgRP são neuropeptídeos que estimulam o consumo alimentar. Portanto, inúmeros estudos já demonstraram que a metformina modula o controle alimentar, através de vários mecanismos propostos, envolvendo o controle entre sistema nervoso central e periférico.

É crescente o número de estudos que investigam os potenciais alvos farmacológicos deste fármaco, os mecanismos de ação e seus efeitos adversos. A revisão de *Viollet, B. et al 2012*, aponta os mecanismos celulares e moleculares da metformina descobertos até agora, e o seu potencial para o tratamento do câncer, síndrome do ovário policístico, diabetes gestacional e controle do ciclo circadiano, indicando que este fármaco atua em vários sistemas.

Os efeitos da metformina sobre o metabolismo da insulina e glicose e o controle do consumo alimentar estão sendo bem investigados nos últimos anos, devido à importância desta droga no tratamento de doenças que afetam o metabolismo da glicose e a resistência à insulina (Vella, Buetow et al. 2010; Poolsup, Suksomboon et al. 2012)

Observamos uma diminuição nos níveis de glicose sanguíneos e um aumento na sensibilidade à insulina, em ambas as doses (50ug e 100ug), nos testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, respectivamente. Nosso trabalho demonstrou que a administração i.c.v de metformina é capaz de modular o sistema nervoso central e conseqüentemente alterar parâmetros metabólicos periféricos. Além disso, o nosso tratamento diminuiu a ingesta alimentar e o peso corporal. O

aumento da sensibilidade à insulina é devido aos seus efeitos positivos sobre a expressão do receptor de insulina e a atividade da tirosina cinase. No entanto, ensaios clínicos e estudos em modelos animais sugerem que a função primária da metformina é diminuir a produção de glicose hepática através da inibição da gliconeogênese e conseqüentemente, aumentar a sensibilidade à insulina (Vella, Buetow et al. 2010; Petrie, Adler et al. 2011; Vella, Buetow et al. 2011; Viollet, Guigas et al. 2012).

Outro efeito deste fármaco é diminuir a lipogênese e estimular a lipólise (Luna and Feinglos 2001). Observamos em nosso trabalho, que o tratamento com metformina nas doses de 50 e 100ug foi capaz de diminuir a gordura mesentérica e epididimal. A diminuição da gordura visceral contribui com a diminuição da atividade simpática (Dulloo and Young 1991). A administração i.c.v de metformina em doses que não alterem parâmetros vitais como peso corporal, temperatura e sobrevivência e não causem excitotoxicidade como descrito neste trabalho (Petersen, Andersen et al. 2001), podem ser utilizados como modelos de estudo, para elucidar mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade e a integração entre sistema nervoso central e periférico.

O alvo molecular preciso da metformina, ainda não é totalmente conhecido, mas estudos indicam que esta droga age inibindo o complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, bloqueando a respiração oxidativa, resultando no aumento da razão celular de AMP/ATP, ativando a AMPK, que atua coordenando vias metabólicas e de crescimento, que juntas agem para restaurar o equilíbrio energético [37, 108, 109].

Além das alterações periféricas a metformina também foi capaz de modular a função mitocondrial no cérebro. Observamos um aumento na produção basal de H_2O_2 nos animais tratados com a maior dose de metformina (100ug), quando comparado ao grupo controle e ao grupo metformina 50ug. Quando adicionamos succinato um substrato energético para a mitocôndria há um aumento produção de H_2O_2 devido ao fluxo reverso de elétrons entre os complexos I e III. No grupo Met 100 succinato não aumentou a produção de ROS e tampouco a adição de ADP provocou alteração na respiração mitocondrial apontando um possível efeito deletério do tratamento nesta dose causado pela metformina na função mitocondrial.

Sabendo que a metformina modula a função mitocondrial e que o nosso tratamento i.c.v aumentou a produção basal de H_2O_2 na maior dose utilizada, analisamos também o efeito in vitro desta droga em cultura primária de neurônios. A viabilidade das mitocôndrias neuronais foram afetadas pelo tratamento com metformina, de forma dose dependente. Observamos uma razão inversamente proporcional, entre dose e viabilidade, quanto maior a dose menor a viabilidade neuronal, indicando que altas doses induzem uma excitotoxicidade neuronal (Petersen, Andersen et al. 2001). A produção de ROS também foi alterada nas culturas neuronais tratadas com metformina. Utilizamos três doses 1mM, 4mM e 10mM, e todas as doses aumentaram a produção de ROS neuronal, corroborando com os dados realizados em amostras de hipocampo e hipotálamo sobre a produção de H_2O_2 .

Em resumo nossos dados apontam um efeito neurotóxico da metformina quando utilizada em altas doses diretamente no SNC, causando hipotermia,

hipoglicemia afetando a função e a viabilidade mitocondrial tendo como resultado um aumento na mortalidade dos camundongos.

Perspectivas:

- Avaliar os efeitos da metformina sobre a atividade das enzimas envolvidas na cascata de sinalização da insulina: IR, PI3K, AKT, GSK;
- Avaliar os efeitos da metformina sobre a atividade das enzimas associadas ao metabolismo: AMPK, pAMPK, STAT3, pSTAT3, FoxO1, SIRT1, POMC;
- Avaliar os efeitos da administração i.c.v de metformina sobre metabolismo energético cerebral;
- Avaliar a funcionalidade e integridade mitocondrial;
- Investigar o efeito deste protocolo de administração i.c.v. de metformina em animais tratados com uma dieta hiperlipídica;

Referências

- Adler, A. I., E. J. Shaw, et al. (2009). "[New drugs for control of blood glucose in type 2 diabetes: summary of the NICE guidelines]." Praxis (Bern 1994) **98**(20): 1161-1163.
- Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000). "Adipose tissue as an endocrine organ." Trends Endocrinol Metab **11**(8): 327-332.
- Andersen, D., K. Haugan, et al. (1997). "Cardiovascular actions of chronic intracerebroventricular administration of metformin in normotensive rats." Pharmacol Toxicol **81**(1): 7-12.
- Antunes, L. C., R. Levandovski, et al. (2010). "Obesity and shift work: chronobiological aspects." Nutr Res Rev **23**(1): 155-168.
- Arner, P. (2003). "The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones." Trends Endocrinol Metab **14**(3): 137-145.
- Arruda, A. P., M. Milanski, et al. (2011). "Hypothalamic inflammation and thermogenesis: the brown adipose tissue connection." J Bioenerg Biomembr **43**(1): 53-58.
- Ashwell, C. M. and J. P. McMurtry (2003). "Hypoglycemia and reduced feed intake in broiler chickens treated with metformin." Poult Sci **82**(1): 106-110.
- Babri, S., H. G. Badie, et al. (2007). "Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male wistar rats." Brain Cogn **64**(1): 86-91.
- Bailey, C. J. and C. Day (1989). "Traditional plant medicines as treatments for diabetes." Diabetes Care **12**(8): 553-564.
- Bailey, C. J. and R. C. Turner (1996). "Metformin." N Engl J Med **334**(9): 574-579.
- Bains, R. K., S. E. Wells, et al. (2004). "Visceral obesity without insulin resistance in late-onset obesity rats." Endocrinology **145**(6): 2666-2679.
- Batandier, C., B. Guigas, et al. (2006). "The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin." J Bioenerg Biomembr **38**(1): 33-42.
- Berleze, K. J., A. P. Muller, et al. (2009). "Gestational and postnatal low protein diet alters insulin sensitivity in female rats." Exp Biol Med (Maywood) **234**(12): 1437-1444.
- Boveris, A. (1984). "Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria." Methods Enzymol **105**: 429-435.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, et al. (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." J Neurosci Res **35**(5): 567-576.
- Broman, M., O. Kallskog, et al. (1998). "Influence of the sympathetic nervous system on renal function during hypothermia." Acta Physiol Scand **163**(3): 241-249.
- Brunmair, B., K. Staniek, et al. (2004). "Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?" Diabetes **53**(4): 1052-1059.
- Calle, E. E. and R. Kaaks (2004). "Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms." Nat Rev Cancer **4**(8): 579-591.
- Cameron, N. E. and M. A. Cotter (1994). "The relationship of vascular changes to metabolic factors in diabetes mellitus and their role in the development of peripheral nerve complications." Diabetes Metab Rev **10**(3): 189-224.
- Chau-Van, C., M. Gamba, et al. (2007). "Metformin inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated kinase activation and prevents increases in neuropeptide Y expression in cultured hypothalamic neurons." Endocrinology **148**(2): 507-511.

- Craft, S. and G. S. Watson (2004). "Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms." Lancet Neurol **3**(3): 169-178.
- Cusi, K., A. Consoli, et al. (1996). "Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Endocrinol Metab **81**(11): 4059-4067.
- da-Silva, W. S., A. Gomez-Puyou, et al. (2004). "Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria." J Biol Chem **279**(38): 39846-39855.
- De Felice, F. G. (2013). "Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications." J Clin Invest **123**(2): 531-539.
- Draper, H. H. and M. Hadley (1990). "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation." Methods Enzymol **186**: 421-431.
- Dulloo, A. G. and J. B. Young (1991). "Effects of monosodium glutamate and gold thioglucose on dietary regulation of sympathetic nervous system activity in rodents." Metabolism **40**(2): 113-121.
- El-Mir, M. Y., V. Nogueira, et al. (2000). "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I." J Biol Chem **275**(1): 223-228.
- Esteghamati, A., S. Noshad, et al. (2013). "Comparative effects of metformin and pioglitazone on omentin and leptin concentrations in patients with newly diagnosed diabetes: A randomized clinical trial." Regul Pept.
- Florant, G. L. and J. E. Healy (2012). "The regulation of food intake in mammalian hibernators: a review." J Comp Physiol B **182**(4): 451-467.
- Fonseca, V., J. Rosenstock, et al. (2000). "Effect of metformin and rosiglitazone combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial." JAMA **283**(13): 1695-1702.
- Fonseca, V. A. and K. D. Kulkarni (2008). "Management of type 2 diabetes: oral agents, insulin, and injectables." J Am Diet Assoc **108**(4 Suppl 1): S29-33.
- Frolich, L., D. Blum-Degen, et al. (1998). "Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease." J Neural Transm **105**(4-5): 423-438.
- Fryer, L. G., F. Fougelle, et al. (2002). "Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells." Biochem J **363**(Pt 1): 167-174.
- Gispén, W. H. and G. J. Biessels (2000). "Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus." Trends Neurosci **23**(11): 542-549.
- Gropp, E., M. Shanabrough, et al. (2005). "Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding." Nat Neurosci **8**(10): 1289-1291.
- Grunblatt, E., M. Salkovic-Petrisic, et al. (2007). "Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein." J Neurochem **101**(3): 757-770.
- Guenther, M. A., E. D. Bruder, et al. (2012). "Effects of body temperature maintenance on glucose, insulin, and corticosterone responses to acute hypoxia in the neonatal rat." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **302**(5): R627-633.
- Gunton, J. E., P. J. Delhanty, et al. (2003). "Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2." J Clin Endocrinol Metab **88**(3): 1323-1332.
- Gupta, A., B. Bisht, et al. (2011). "Peripheral insulin-sensitizer drug metformin ameliorates neuronal insulin resistance and Alzheimer's-like changes." Neuropharmacology **60**(6): 910-920.
- Hoyer, S. and H. Lannert (2007). "Long-term abnormalities in brain glucose/energy metabolism after inhibition of the neuronal insulin receptor: implication of tau-protein." J Neural Transm Suppl(72): 195-202.
- Hundal, R. S., M. Krssak, et al. (2000). "Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes." Diabetes **49**(12): 2063-2069.

- Huupponen, R., P. Ojala-Karlsson, et al. (1992). "Determination of metformin in plasma by high-performance liquid chromatography." J Chromatogr **583**(2): 270-273.
- Kane, D. A., E. J. Anderson, et al. (2010). "Metformin selectively attenuates mitochondrial H₂O₂ emission without affecting respiratory capacity in skeletal muscle of obese rats." Free Radic Biol Med **49**(6): 1082-1087.
- Komori, T., F. Yoshida, et al. (2004). "Metformin ameliorates treatment of obese type 2 diabetic patients with mental retardation; its effects on eating behavior and serum leptin levels." Exp Clin Endocrinol Diabetes **112**(8): 422-428.
- Kreier, F., E. Fliers, et al. (2002). "Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications." J Clin Invest **110**(9): 1243-1250.
- Labuzek, K., D. Suchy, et al. (2010). "Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide." Pharmacol Rep **62**(5): 956-965.
- Lannert, H. and S. Hoyer (1998). "Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats." Behav Neurosci **112**(5): 1199-1208.
- Larsen, S., R. Rabøl, et al. (2012). "Metformin-treated patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial complex I respiration." Diabetologia **55**(2): 443-449.
- Laurin, D., R. Verreault, et al. (2001). "Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons." Arch Neurol **58**(3): 498-504.
- Lee, C. K., Y. J. Choi, et al. (2012). "Intracerebroventricular injection of metformin induces anorexia in rats." Diabetes Metab J **36**(4): 293-299.
- Liu, H., A. Xing, et al. (2012). "Regulation of beta-amyloid level in the brain of rats with cerebrovascular hypoperfusion." Neurobiol Aging **33**(4): 826 e831-842.
- Luna, B. and M. N. Feinglos (2001). "Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus." Am Fam Physician **63**(9): 1747-1756.
- Luna, B., A. T. Hughes, et al. (1999). "The use of insulin secretagogues in the treatment of type 2 diabetes." Prim Care **26**(4): 895-915.
- Lv, W. S., J. P. Wen, et al. (2012). "The effect of metformin on food intake and its potential role in hypothalamic regulation in obese diabetic rats." Brain Res **1444**: 11-19.
- Maida, A., B. J. Lamont, et al. (2011). "Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice." Diabetologia **54**(2): 339-349.
- Marsin, A. S., L. Bertrand, et al. (2000). "Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia." Curr Biol **10**(20): 1247-1255.
- Mattson, M. P. (2010). "The impact of dietary energy intake on cognitive aging." Front Aging Neurosci **2**: 5.
- Moreira, J. D., L. Knorr, et al. (2010). "Dietary omega-3 fatty acids attenuate cellular damage after a hippocampal ischemic insult in adult rats." J Nutr Biochem **21**(4): 351-356.
- Moreira, P. I., M. S. Santos, et al. (2007). "Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes." J Neurol Sci **257**(1-2): 206-214.
- Muller, A. P., J. Gnoatto, et al. (2011). "Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice." Hippocampus **21**(10): 1082-1092.
- Muller, A. P., A. H. Tort, et al. (2010). "Metabolic and behavioral effects of chronic olanzapine treatment and cafeteria diet in rats." Behav Pharmacol **21**(7): 668-675.
- Muller, A. P., E. R. Zimmer, et al. (2012). "Physical exercise exacerbates memory deficits induced by intracerebroventricular STZ but improves insulin regulation

- of H₂O₂ production in mice synaptosomes." J Alzheimers Dis **30**(4): 889-898.
- Natali, A. and E. Ferrannini (2006). "Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review." Diabetologia **49**(3): 434-441.
- Nathan, D. M., J. B. Buse, et al. (2009). "Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetes Care **32**(1): 193-203.
- Neumann, K. F., L. Rojo, et al. (2008). "Insulin resistance and Alzheimer's disease: molecular links & clinical implications." Curr Alzheimer Res **5**(5): 438-447.
- Neuwelt, E. A., B. Bauer, et al. (2011). "Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology." Nat Rev Neurosci **12**(3): 169-182.
- Nicholson, G. and G. M. Hall (2011). "Diabetes mellitus: new drugs for a new epidemic." Br J Anaesth **107**(1): 65-73.
- Nightingale, S. L. (1994). "From the Food and Drug Administration." JAMA **272**(23): 1814.
- Onyango, I. G., J. Lu, et al. (2010). "Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health." Biochim Biophys Acta **1802**(1): 228-234.
- Oses, J. P., R. Leke, et al. (2004). "Biochemical brain markers and purinergic parameters in rat CSF after seizure induced by pentylentetrazol." Brain Res Bull **64**(3): 237-242.
- Owen, M. R., E. Doran, et al. (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." Biochem J **348 Pt 3**: 607-614.
- Paolisso, G., L. Amato, et al. (1998). "Effect of metformin on food intake in obese subjects." Eur J Clin Invest **28**(6): 441-446.
- Parekh, P. I., A. E. Petro, et al. (1998). "Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice." Metabolism **47**(9): 1089-1096.
- Park, C. R. (2001). "Cognitive effects of insulin in the central nervous system." Neurosci Biobehav Rev **25**(4): 311-323.
- Park, S., J. S. Jang, et al. (2005). "Exercise enhances insulin and leptin signaling in the cerebral cortex and hypothalamus during dexamethasone-induced stress in diabetic rats." Neuroendocrinology **82**(5-6): 282-293.
- Penicaud, L., B. Cousin, et al. (2000). "The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance." Nutrition **16**(10): 903-908.
- Petersen, J. S., D. Andersen, et al. (2001). "Intracerebroventricular metformin attenuates salt-induced hypertension in spontaneously hypertensive rats." Am J Hypertens **14**(11 Pt 1): 1116-1122.
- Petersen, J. S. and G. F. DiBona (1996). "Acute sympathoinhibitory actions of metformin in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **27**(3 Pt 2): 619-625.
- Petrie, J. R., A. Adler, et al. (2011). "What to add in with metformin in type 2 diabetes?" QJM **104**(3): 185-192.
- Poolsup, N., N. Suksomboon, et al. (2012). "Efficacy of various antidiabetic agents as add-on treatments to metformin in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis." ISRN Endocrinol **2012**: 798146.
- Rajala, M. W. and P. E. Scherer (2003). "Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis." Endocrinology **144**(9): 3765-3773.
- Reagan, L. P. (2007). "Insulin signaling effects on memory and mood." Curr Opin Pharmacol **7**(6): 633-637.

- Rewers, M., D. Zaccaro, et al. (2004). "Insulin sensitivity, insulinemia, and coronary artery disease: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study." Diabetes Care **27**(3): 781-787.
- Richard, D., B. Monge-Roffarello, et al. (2012). "Control and physiological determinants of sympathetically mediated brown adipose tissue thermogenesis." Front Endocrinol (Lausanne) **3**: 36.
- Ricquier, D. and F. Bouillaud (2000). "Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance." J Physiol **529 Pt 1**: 3-10.
- Rouru, J., R. Huupponen, et al. (1992). "Subchronic treatment with metformin produces anorectic effect and reduces hyperinsulinemia in genetically obese Zucker rats." Life Sci **50**(23): 1813-1820.
- Scherer, P. E. (2006). "Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ." Diabetes **55**(6): 1537-1545.
- Schmidt, A. P., T. T. Avila, et al. (2005). "Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice." Neurochem Res **30**(1): 69-73.
- Simon, E., F. K. Pierau, et al. (1986). "Central and peripheral thermal control of effectors in homeothermic temperature regulation." Physiol Rev **66**(2): 235-300.
- Singh, R. B., S. Gupta, et al. (2012). "Metabolic syndrome: a brain disease." Can J Physiol Pharmacol **90**(9): 1171-1183.
- Steen, E., B. M. Terry, et al. (2005). "Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes?" J Alzheimers Dis **7**(1): 63-80.
- Stranahan, A. M., E. D. Norman, et al. (2008). "Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats." Hippocampus **18**(11): 1085-1088.
- Stumvoll, M., H. U. Haring, et al. (2007). "Metformin." Endocr Res **32**(1-2): 39-57.
- Szekely, M. (2000). "The vagus nerve in thermoregulation and energy metabolism." Auton Neurosci **85**(1-3): 26-38.
- Trammell, R. A. and L. A. Toth (2011). "Markers for predicting death as an outcome for mice used in infectious disease research." Comp Med **61**(6): 492-498.
- Ungar, G., L. Freedman, et al. (1957). "Pharmacological studies of a new oral hypoglycemic drug." Proc Soc Exp Biol Med **95**(1): 190-192.
- Vella, S., L. Buetow, et al. (2010). "The use of metformin in type 1 diabetes: a systematic review of efficacy." Diabetologia **53**(5): 809-820.
- Vella, S., L. Buetow, et al. (2011). "Metformin in type 1 diabetes reduces insulin requirements without significantly improving glycaemic control. Reply to Schatz H [letter]." Diabetologia **54**(1): 203-204.
- Viollet, B., B. Guigas, et al. (2012). "Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview." Clin Sci (Lond) **122**(6): 253-270.
- Wang, C. H., C. C. Wang, et al. (2010). "Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes." Ann N Y Acad Sci **1201**: 157-165.
- Wendel, A. (1981). "Glutathione peroxidase." Methods Enzymol **77**: 325-333.
- Whitaker, A. M., J. Sulzer, et al. (2010). "Sympathetic modulation of the host defense response to infectious challenge during recovery from hemorrhage." Neuroimmunomodulation **17**(6): 349-358.
- Wilcock, C., N. D. Wyre, et al. (1991). "Subcellular distribution of metformin in rat liver." J Pharm Pharmacol **43**(6): 442-444.
- Winder, W. W., H. A. Wilson, et al. (1997). "Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A." J Appl Physiol **82**(1): 219-225.
- Wysowski, D. K., G. Armstrong, et al. (2003). "Rapid increase in the use of oral antidiabetic drugs in the United States, 1990-2001." Diabetes Care **26**(6): 1852-1855.

- Yasuda, N., T. Inoue, et al. (2004). "Metformin causes reduction of food intake and body weight gain and improvement of glucose intolerance in combination with dipeptidyl peptidase IV inhibitor in Zucker fa/fa rats." J Pharmacol Exp Ther **310**(2): 614-619.
- Zhou, G., R. Myers, et al. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." J Clin Invest **108**(8): 1167-1174.