



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**DIABETES MATERNO SEVERO E DIABETES *MELLITUS* TIPO 1: UMA
PERSPECTIVA NEUROINFLAMATÓRIA EM MODELOS ANIMAIS**

Francele Valente Piazza

Dezembro 2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**DIABETES MATERNO SEVERO E DIABETES *MELLITUS* TIPO 1: UMA
PERSPECTIVA NEUROINFLAMATÓRIA EM MODELOS ANIMAIS**

Tese de doutorado apresentada como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Neurociências pelo Programa de
Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Francele Valente Piazza

Orientadora: Profa. Dra. Simone Marcuzzo

Dezembro 2018

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e CAPES, pelas bolsas de estudo durante toda a minha vida acadêmica.

À UFRGS e ao PPG Neurociências, pelas oportunidades de aprendizado.

À IBRO, pelo auxílio para a realização do meu estágio de curta duração no Laboratório de Neurobiología, no Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), em Buenos Aires, Argentina.

À minha orientadora, Prof^a Simone Marcuzzo, pela caminhada juntas, pela credibilidade, suporte e, ao mesmo tempo, liberdade na construção deste trabalho.

Ao Prof. Héctor Coirini e sua carinhosa família argentina, e à pesquisadora Maria Sol Kruse, do IBYME, Buenos Aires, Argentina, pela acolhida e colaboração para os resultados desta pesquisa.

A todos os integrantes do grupo PND, pela colaboração na realização dos experimentos, pela troca de conhecimento e amizade. Em especial, à Ethiane Segabinazi, pela parceria constante desde o início da minha caminhada acadêmica.

À Prof^a Lenir Orlandi e a todos do grupo LG, pelas trocas de conhecimento constantes, incentivo mútuo durante todos esses anos e pela amizade.

Aos meus pais, Ângelo e Roseli, pela paciência, credibilidade e incentivo nos estudos, pelo cuidado e amor.

Aos meus irmãos, Simone e Thiago, e primos da família Valente, pelo compartilhamento de expectativas e apoio durante toda a minha formação acadêmica.

À Marília Fernandes, pela partilha semanal da vida, expectativas e engrandecimento humano pelo trabalho voluntário na Pediatria do HCPA como doutoras palhaças durante todo o percurso do doutorado; e aos pacientes, nossos maiores incentivadores.

*“Educação não transforma o mundo.
Educação muda as pessoas.
Pessoas mudam o mundo.”*

Paulo Freire

RESUMO

O diabetes durante a gravidez constitui um ambiente intrauterino desfavorável para o desenvolvimento da prole. Apesar de já descritos na literatura mecanismos candidatos pelos quais o diabetes materno severo predispõe os filhos a alterações cerebrais e distúrbios do neurodesenvolvimento, os seus efeitos a curto e longo prazo sobre o sistema imunológico e as células nervosas, conjuntamente ao comportamento e aos parâmetros físicos da prole ainda não foram estudados. Da mesma forma, o Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1) tem sido associado a complicações a longo prazo no sistema nervoso central induzidas pela hiperglicemia crônica, causando inflamação, disfunções microvasculares, celulares e moleculares, levando a comprometimento da neurogênese no giro denteado (GD) do hipocampo e déficits cognitivos e psicomotores. No entanto, o papel das respostas microgliais e astrocíticas e a modulação específica de proteínas regulatórias imunes sobre os diferentes estágios da neurogênese hipocampal na progressão da encefalopatia diabética ainda não foram satisfatoriamente elucidadas.

No primeiro estudo, investigamos os efeitos a curto e longo prazo dos desfechos desenvolvimentais causados pela hiperglicemia materna severa não controlada sobre a sobrevivência celular no GD, a expressão de proteínas reguladoras de apoptose, o BDNF e a resposta neuroinflamatória no hipocampo de neonatos e ratos jovens nascidos de mães diabéticas. A curto prazo (no dia pós-natal 1), o modelo de diabetes materno severo proposto causou microssomia, atraso no neurodesenvolvimento dos filhotes e diminuição de Bcl-2, procaspase 3 e caspase 3. A longo prazo (no dia pós-natal 40), aumentou os níveis de TNF- α e diminuiu os de procaspase 3, caspase 3, MHC-I, IL-1 β e BDNF, bem como prejudicou a sobrevivência celular no GD do hipocampo da prole.

No segundo estudo, analisamos os efeitos agudo e crônico do DMT1 não controlado sobre a resposta das células e moléculas reguladoras imunes e a modulação das diferentes fases da neurogênese e apoptose no hipocampo de ratos jovens. Agudamente, o grupo diabético apresentou uma diminuição na proliferação de células marcadas com BrdU no GD, na expressão de Bcl-2 e BDNF, além de um aumento nos níveis de IL-6. Por outro lado, cronicamente, o DMT1 causou uma diminuição nos níveis de IL-1 β e IL-10, acompanhado por um aumento na expressão de células microgliais Iba-1+ e uma diminuição não significativa na sobrevivência celular no GD do hipocampo.

Os dados reforçam que a ativação da neuroinflamação, a desregulação dos níveis de apoptose, o prejuízo na sinalização de MHC-I e da sobrevivência celular no GD do hipocampo podem estar implicados nos distúrbios neurodesenvolvimentais e neurocognitivos vistos na prole de mães diabéticas. Ainda, que no modelo experimental proposto de DMT1 há um papel importante da neuroinflamação e um desequilíbrio de interleucinas específicas mediadas principalmente pela resposta de células microgliais, durante a janela temporal analisada, contribuindo para o comprometimento das diferentes fases da neurogênese hipocampal subjacente à encefalopatia diabética com a progressão da doença. Desse modo, a presente tese reforça o envolvimento da neuroinflamação como mecanismo neurobiológico presente em ambos os modelos de diabetes estudados.

Palavras-chave: hiperglicemia, desenvolvimento, neurogênese, apoptose, neuroinflamação, memória, encefalo

ABSTRACT

Maternal diabetes constitutes an unfavorable intrauterine environment for offspring development. Although isolated data reveal candidate mechanisms by which severe maternal hyperglycemia predisposes the offspring to neurodevelopmental disorders, their short- and long-term effects on offspring's immune system, nerve cells, behavior and physical parameters remain poorly understood. Moreover, Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) has been associated with long-term complications in the central nervous system induced by chronic hyperglycemia, causing brain inflammation, microvascular, cellular and molecular dysfunctions, leading to neurogenesis impairment in the dentate gyrus (DG) of hippocampus and cognitive deficits. However, the role of microglial and astrocytic responses and the specific modulation of immune regulatory proteins on the different stages of hippocampal neurogenesis in the progression of diabetic encephalopathy have not yet been satisfactorily elucidated.

In our first study, we investigated the short- and long-term effects of developmental outcomes caused by uncontrolled severe maternal hyperglycemia on cell survival in the DG, expression of apoptosis regulatory proteins, BDNF, and the neuroinflammatory response in the hippocampus of neonates and rats young born to diabetic mothers. Severe maternal diabetes caused microsomnia and neurodevelopmental delay in pups and decrease of Bcl-2, procaspase 3 and caspase 3 in the hippocampus. In a later stage of development it was found an increase of TNF- α and a decrease of procaspase 3, caspase 3, MHC-I, IL-1 β and BDNF in the hippocampus, as well as impairment in cellular survival in the DG.

In our second study, we analyzed the acute and chronic effects of uncontrolled T1DM on the response of immune regulatory cells and molecules and the modulation of the different phases of neurogenesis and apoptosis in the hippocampus of young rats. Acutely, diabetic group presented a decrease in proliferation of BrdU-labeled cells, in Bcl-2 expression and BDNF, as well as an increase in IL-6 levels. On the other hand, chronically, T1DM caused a decrease in IL-1 β and IL-10 levels, accompanied by an increase in microglial Iba-1 expression and a non-significant decrease in cell survival in the DG of hippocampus.

Our data reinforce that activation of neuroinflammation, dysregulation of apoptosis levels, impairment in MHC-I signaling and cell survival in the hippocampus may be implicated in the neurodevelopmental and neurocognitive disorders observed in the offspring of diabetic mothers. In addition, in the proposed experimental model of T1DM there is an important role of neuroinflammation and a specific imbalance of interleukins mediate mainly by the microglia response, until the time-pointed investigated, contributing to the compromise of the different phases of hippocampal neurogenesis underlying the diabetic encephalopathy with disease progression. Thus, this thesis reinforces the involvement of neuroinflammation as a neurobiological mechanism present in both diabetes models studied.

Keywords: hyperglycemia, development, neurogenesis, apoptosis, neuroinflammation, memory, diabetic encephalopathy

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGEs:** *advanced glycation end-products*; produtos finais de glicação avançada
- Bcl-2:** *B-cell lymphoma 2*; linfoma de células B 2
- BHE:** barreira hematoencefálica
- BDNF:** *brain-derived neurotrophic factor*; fator neurotrófico derivado do encéfalo
- BrdU:** *bromodeoxyuridine*; 5-bromo-2'-deoxiuridina
- CA:** corno de Ammon
- DAMPs:** *damage-associated molecular patterns*; padrões moleculares associados ao dano
- DCX:** *doublecortin*; duplacortina
- DMT1:** diabetes *mellitus* tipo 1
- DNA:** *deoxyribonucleic acid*; ácido desoxirribonucleico
- DPN:** dia pós-natal
- GCL:** *granule cell layer*; camada de células granulares;
- GD:** giro denteado
- GFAP:** *glial fibrillary acidic protein*; proteína ácida fibrilar glial
- GLUT2:** *glucose transporter 2*; transportadores de glicose do tipo 2
- HLA:** *human leukocyte antigen*; sistema antígeno leucocitário humano
- HPA:** hipotálamo-pituitária-adrenal
- Iba-1:** *ionized calcium binding adapter molecule 1*; molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1
- IL-1 β :** interleucina 1 beta
- IL-6:** interleucina 6
- IL-10:** interleucina 10
- MHC:** *major histocompatibility complex*; complexo principal de histocompatibilidade
- ML:** *molecular layer*; camada molecular
- NeuN:** *neuronal nuclear antigen*; antígeno nuclear neuronal
- NF- κ B:** *factor nuclear kappa B*; fator nuclear kappa B
- NRL:** *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptors*; receptores de ligação a nucleotídeos ricos em leucina
- PAMPs:** *pathogen associated molecular patterns*; padrões moleculares associados a patógenos

PKC: proteína quinase C

PSA-NCAM: *polysialylated form of the neural cell adhesion molecule*; forma polissialilada da molécula de adesão celular neural

RAGE: *receptor for advanced glycation end-products*; receptores de produtos finais de glicação avançada

SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

Sox2: *sex determining region Y (SRY)-box 2*; região determinante do sexo Y (SRY-região 2)

STZ: *streptozotocin*; estreptozotocina

TGF- β : *transforming growth factor beta*; fator de crescimento transformante β

TNF- α : *tumor necrosis factor- α* ; fator de necrose tumoral alfa

TuJ1: *β -tubulin III*; beta III tubulina

ZSG: zona subgranular

ZSV: zona subventricular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático ilustrando o processo de neurogênese pós-natal no giro denteado do hipocampo, suas diferentes fases e a expressão de marcadores celulares específicos que caracterizam a etapa de maturação e diferenciação dos progenitores neurais sobreviventes. SGZ: zona subgranular; GCL: camada de células granulares; ML: camada molecular; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; Sox2: região determinante do sexo Y (SRY-região 2); DCX: duplacortina; PSA-NCAM: forma polissialilada da molécula de adesão celular neural; TuJ1: Beta III tubulina; NeuN: antígeno nuclear neuronal (adaptado de Lucassen et al., 2010).

Figura 2. Representação esquemática ilustrando os mecanismos envolvidos na patogênese da encefalopatia diabética (adaptado de Sima et al., 2009).

Artigo 1:

Fig 1. Effects of STZ treatment on glycemic levels in the pregnant dams. (A) Blood glucose levels taken from the dams before (on gestational day – GD5) and 48 h after STZ injection (on GD 7), on GD13 and GD19. Repeated measures ANOVA: Treatment effect ($F(1,16) = 438.6, p < 0.001$), Time effect ($F(3,48) = 64.73, p < 0.001$), and Time vs. Treatment interaction effect ($F(3,48) = 79.17, p < 0.001$). (B) Glycemic levels taken from the dams on postnatal day (PND) 1 and 21 (Treatment effect: $F(1,16) = 521.89, p < 0.001$). Control, $n=10$ dams; STZ, $n=8$ dams; *** $p < 0.001$ vs respective control dams. Data were expressed as mean \pm S.E.M.

Fig 2. Offspring oral glucose tolerance test (OGTT) on PND40. Blood glucose levels at different times after oral glucose overload (1g/kg body weight). Repeated measures ANOVA: Time effect ($F(4,172) = 167.85, p < 0.001$), Maternal Treatment effect ($F(1,43) = 5.25, p < 0.05$), Time vs. Maternal Treatment and offspring Sex interaction effects, both n.s., $p > 0.05$). There was no difference in glucose metabolism between groups. Data were collected from males and females. ($n=20-25$ per group) and expressed as mean \pm S.E.M.

Fig 3. Latency to step-down platform in the inhibitory avoidance test on PND40. There were no differences induced by maternal STZ-injection on the short- and long-term memory of the offspring between groups. Friedman's ANOVA followed by Dunn's Multiple Comparison Test and Mann–Whitney U-test. n=18-28 per group. Data from males and females. STZ, streptozotocin. **p<0.01, ***p<0.001. Data were expressed as median latencies and interquartile ranges of each group.

Fig 4. Effects of maternal STZ-injection on the MHC-I (A), MHC-II (B), Iba-1 (C) and GFAP (D) levels in offspring hippocampus by Western blotting. Representative pictures of MHC-I, MHC-II, Iba-1, GFAP and the loading control F-actin are shown in the upper panel. PND, postnatal day; STZ, streptozotocin. Two way ANOVA (offspring Age x Maternal Treatment): Age effect on GFAP ($F(1,16)= 58.55, p<0.001$), MHC-II ($F(1,14)= 31.31, p<0.001$); Maternal Treatment effect on MHC-I ($F(1,16)= 7.40, p<0.05$). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Data were expressed as mean \pm S.E.M from at least two independent experiments (n= 5-6 male offspring per group).

Fig 5. Effects of maternal STZ-injection on the Bcl-2 (A), Procaspase 3 (B) and Caspase 3 (C) levels in offspring hippocampus by Western blotting. Representative pictures of Bcl-2, Procaspase 3 and Caspase 3 and the loading control F-actin are shown in the upper panel. PND, postnatal day; STZ, streptozotocin. Two way ANOVA (offspring Age x Maternal Treatment): Age effect on Procaspase 3 ($F(1,16)= 142.93, p<0.001$), Caspase 3 ($F(1,19)= 83.70, p<0.001$) and Bcl-2 levels ($F(1,15)= 125.71, p<0.001$); Maternal Treatment effect on Procaspase 3 ($F(1,16)= 11.48, p<0.01$), Caspase 3 ($F(1,19)= 17.45, p<0.001$) and Bcl-2 levels ($F(1,15)= 5.07, p<0.05$). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Data were expressed as mean \pm S.E.M from at least two independent experiments (n= 5-6 male offspring per group).

Fig 6. Effects of maternal STZ-injection on survival of BrdU-labeled cells in the DG of the hippocampus on PND 40. A) Digitalized images of the DG stained for BrdU showing cell survival in the SGZ and GCL between groups. B) Quantitative analysis of the immunocytochemistry for BrdU in different groups. DG, dentate gyrus; GCL, granule cell layer; SGZ, subgranular zone; PND, postnatal day; STZ, streptozotocin. *p=0.05

(Unpaired Student's t test: $t(9) = 2.20$). Data were expressed as mean \pm S.E.M (n= 5-6 male offspring per group). Scale bar=50 μ m.

Artigo 2:

Fig 1. T1DM experimental model induces immunomodulation in target organs. A) Effects of T1DM on the relative adrenal weight. Two way ANOVA (STZ Treatment x Time): STZ Treatment effect ($F(1,37) = 21.97, p < 0.001$), Time effect ($F(1,37) = 5.58, p < 0.05$) and STZ Treatment vs. Time interaction effect ($F(1,37) = 10.05, p < 0.01$). B) Effects of T1DM on the relative thymus weight. Two way ANOVA (STZ Treatment x Time): STZ Treatment effect ($F(1,37) = 38.45, p < 0.001$), Time effect ($F(1,37) = 138.98, p < 0.001$). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Student-Newman-Keuls post hoc test. N=9-12 in each group. Data were expressed as mean \pm S.E.M. AD, acute control; AD, acute diabetic; CC, chronic control; CD, chronic diabetic; STZ, streptozotocin.

Fig 2. Effects of T1DM experimental model on the Bcl-2 (A) and Procaspase 3 (B) levels in the hippocampus among the groups by Western blotting. Representative pictures of Bcl-2, Procaspase 3 and the loading control F-actin are shown in the upper panel. Two way ANOVA (STZ Treatment x Time): STZ Treatment effect ($F(1,16) = 11.68, p < 0.01$) and STZ Treatment vs. Time interaction effect on Bcl-2 ($F(1,16) = 20.74, p < 0.001$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Student-Newman-Keuls post hoc test. N=5-6 in each group. Data were expressed as mean \pm S.E.M. AD, acute control; AD, acute diabetic; CC, chronic control; CD, chronic diabetic; STZ, streptozotocin.

Fig 3. Effects of T1DM experimental model on the MHC-I (A), MHC-II (B), Iba-1 (C), and GFAP (D) levels in the hippocampus among the groups by Western blotting. Representative pictures of MHC-I, MHC-II, Iba-1, GFAP and the loading control F-actin are shown in the upper panel. Two way ANOVA (STZ Treatment x Time): STZ Treatment effect on Iba-1 ($F(1,15) = 5.05, p < 0.05$). * $p < 0.05$; Student-Newman-Keuls post hoc test. N=5-6 in each group. Data were expressed as mean \pm S.E.M. AD, acute control; AD, acute diabetic; CC, chronic control; CD, chronic diabetic; STZ, streptozotocin.

Fig 4. Effects of T1DM experimental model on proliferation and survival of BrdU-labeled cells in the DG of the hippocampus. A) Digitalized images of the DG stained for BrdU showing cell proliferation (in AC and AD groups) and survival (in CC and CD groups) in the SGZ and GCL between groups. B) Quantitative analysis of the immunocytochemistry for BrdU in different groups. Two way ANOVA (STZ Treatment x Time) showed STZ Treatment effect ($F(1,14) = 9.54, p < 0.01$) and Time effect ($F(1,14) = 15.41, p < 0.01$). ** $p < 0.01$; Student-Newman-Keuls post hoc test. N= 5-6 per group. Data were expressed as mean \pm S.E.M. AD, acute control; AD, acute diabetic; CC, chronic control; CD, chronic diabetic. DG, dentate gyrus; GCL, granule cell layer; SGZ, subgranular zone; STZ, streptozotocin. Scale bar=50 μ m.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1:

Table 1. Effects of maternal STZ-injection on the offspring body weight (g) during the development and weaning from PND 1 to 21, and on PND 40. The average number of pups/litter/group is indicated in the table.

Table 2. Effects of maternal STZ-injection on the relative organ weights in offspring (in mg).

Table 3. Effects of maternal STZ-injection on the offspring somatic parameters from PND 1 to 21.

Table 4. Effects of maternal STZ-injection on the offspring developmental milestones from PND 1 to 21. The average postnatal day that the group performed positively the task.

Table 5. Effects of maternal STZ-injection on the cytokine and BDNF levels in offspring hippocampus.

Artigo 2:

Table 1. Effects of T1DM on glucose levels and body weight taken from the rats before (PND 40) and 72 h after STZ-injection (PND 43), on PND 47, 60 and 77.

Table 2. Effects of T1DM on the cytokine and BDNF levels in the rat hippocampus (in pg/ml).

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 APOPTOSE	2
1.2 NEUROGÊNESE NO ADULTO, APRENDIZADO E MEMÓRIA	3
1.3 NEUROINFLAMAÇÃO E REGULAÇÃO DA NEUROGÊNESE	5
1.4 DIABETES MATERNO, SISTEMA IMUNE, NEURODESENVOLVIMENTO E COGNIÇÃO	7
1.5 DIABETES MELLITUS TIPO I, ENCEFALOPATIA DIABÉTICA E INFLAMAÇÃO	9
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	13
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4. CAPÍTULO 1	
“Severe uncontrolled maternal hyperglycemia induces microsomia and neurodevelopment delay accompanied by apoptosis, cellular survival and neuroinflammatory deregulation in rat offspring hippocampus”	18
5. CAPÍTULO 2	
“Neuroinflammatory perspectives underlying the neurogenesis impairment in a Type 1 Diabetes experimental model”	59
6. DISCUSSÃO	87
7. CONCLUSÕES	97
8. PERSPECTIVAS	99
9. REFERÊNCIAS	101
ANEXO	110

1.INTRODUÇÃO

1.1 APOPTOSE

O processo de morte celular programada, ou apoptose, é geralmente definido por características morfológicas específicas e por mecanismos bioquímicos dependentes de energia. A apoptose ocorre fisiologicamente durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal, o envelhecimento e como mecanismo homeostático de renovação celular tecidual. Também ocorre nas reações imunes, na atrofia dependente de hormônios (como do timo induzida por corticosteroides), ou quando as células são danificadas por doenças ou agentes nocivos (Elmore, 2007). Uma taxa de apoptose inapropriada (ou muito pouca ou em demasia) é um fator encontrado em muitas doenças neurodegenerativas, no dano isquêmico, em distúrbios autoimunes e muitos tipos de câncer (Hassan et al., 2014).

As principais características morfológicas das células em processo de apoptose incluem retração celular, citoplasma denso, organelas mais compactadas e, principalmente, picnose, identificada como fragmentos de cromatina nuclear condensada. Sequencialmente, fragmentos citoplasmáticos celulares são formados e os corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos e degradados dentro de fagolisossomos. Não há essencialmente nenhuma reação inflamatória associada com o processo de apoptose nem com a remoção de células apoptóticas, uma vez que essas células não liberam seus constituintes celulares no tecido intersticial circundante; são rapidamente fagocitadas pelas células vizinhas, evitando assim a necrose secundária; e, as células englobantes não produzem citocinas anti-inflamatórias (Elmore, 2007).

Os mecanismos bioquímicos da apoptose envolvem cascatas de eventos moleculares dependentes de energia. As duas vias principais de apoptose são a via extrínseca ou do receptor de morte e a via intrínseca ou mitocondrial, bem como a via perforina/granzima. As vias extrínseca, intrínseca e granzima B convergem para o mesmo terminal ou via de execução, que é iniciada pela clivagem da caspase-3, levando às modificações celulares características da apoptose. Diferentemente, a via da granzima A ativa uma cascata celular paralela, independente de caspase, gerando dano ao DNA (ácido desoxirribonucleico) de fita simples (Elmore, 2007).

A via de sinalização intrínseca da apoptose pode ser iniciada por diversos estímulos capazes de causar algum dano mitocondrial que, por sua vez, produz sinais intracelulares que atuam diretamente em alvos específicos dentro da célula, a fim de

ativar a via de execução da caspase 3 clivada. Esses estímulos podem ser a ausência de fatores de crescimento, hormônios ou citocinas que impeçam a morte celular, ou mesmo a radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres (Elmore, 2007). O controle e a regulação desses eventos mitocondriais apoptóticos ocorrem por meio de membros da família de proteínas Bcl-2, a qual rege a permeabilidade da membrana mitocondrial e é composta por, pelo menos, 25 genes tanto de proteínas pró-apoptóticas, quanto antiapoptóticas. Assim, a ocorrência de apoptose pode ser definida pelo balanço entre seus reguladores pró- e antiapoptóticos (Haghir et al., 2017). A Bcl-2 (linfoma de células B 2) é uma das proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 que regula negativamente a ativação da caspase 3, gerada a partir da clivagem da sua precursora procaspase 3 (Haghir et al., 2017; Sadeghi et al., 2016).

1.2 NEUROGÊNESE NO ADULTO, APRENDIZADO E MEMÓRIA

Na década de 1960, estudos pioneiros de Altman & Das (1965 e 1967) forneceram as primeiras evidências de que novos neurônios poderiam ser gerados no encéfalo adulto dos mamíferos, inclusive em humanos (Eriksson et al., 1998). Classicamente, no sistema nervoso central (SNC) intacto, a neurogênese pós-natal persiste continuamente na vida adulta em duas regiões mitoticamente ativas: na zona subgranular (ZSG) do giro denteado (GD) do hipocampo e na zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais. Sabe-se que as novas células geradas na zona ZSV se deslocam pelo fluxo migratório rostral e se diferenciam em interneurônios granulares ou periglomerulares ou em células gliais no bulbo olfatório, enquanto que os da ZSG migram localmente e integram a camada de células granulares do GD do hipocampo, se diferenciando em interneurônios granulares maduros ou em células gliais (Duan et al., 2008; Ming & Song, 2005; von Bohlen, 2007).

O hipocampo é uma das estruturas mais plásticas do SNC e tem papel importante nos processos de aprendizado, memória episódica, espacial e emocional (Deng et al., 2010). Está localizado no lobo temporal de cada hemisfério cerebral e, anatomicamente, é formado pelo Corno de Ammon ou hipocampo propriamente dito (histologicamente dividido de CA1 a CA4) e pelo giro denteado, cuja concavidade se dispõe ao redor de CA4 (Dekeyzer et al., 2017). Assim, a relevância funcional da neurogênese pós-natal constante na ZSG do GD do hipocampo tem sido atribuída à

modulação dos processos de formação e manutenção de memórias ao longo da vida (Deng et al., 2010; Kitabatake et al., 2007).

A neurogênese no GD do hipocampo é constituída de múltiplas fases: proliferação dos progenitores de células tronco neurais, sobrevivência, migração, diferenciação e integração sináptica dos novos neurônios à circuitaria local pré-existente, sendo de 4 semanas o tempo estimado para uma neurogênese completa. Durante esse processo, vários marcadores celulares específicos são expressos pelas células de acordo com sua fase de maturação e diferenciação, desde os progenitores mitoticamente ativos até os novos neurônios pós-mitóticos formados, sendo possível, dessa forma, identificar e estudar as fases específicas da neurogênese (Figura 1) (Kitabatake et al., 2007; Lucassen et al., 2010; von Bohlen, 2007). Tais estudos são baseados na marcação dos progenitores neurais com 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), um análogo sintético da timidina incorporado durante a replicação do DNA na fase S do ciclo celular, ou com BrdU em associação com outros marcadores de maturação celular, e analisados por imunistoquímica ou imunofluorescência (Ming & Song, 2005; Taupin, 2007; von Bohlen, 2007).

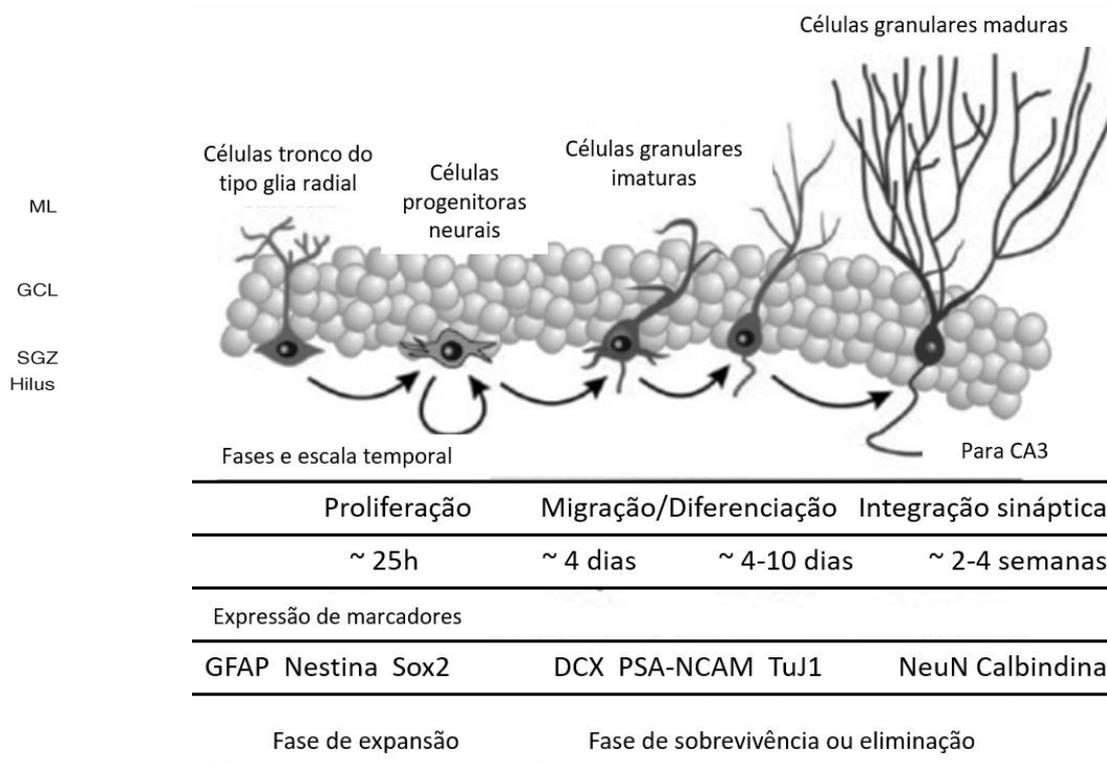


Figura 1. Diagrama esquemático ilustrando o processo de neurogênese pós-natal no giro denteado do hipocampo, suas diferentes fases e a expressão de marcadores celulares específicos que caracterizam a etapa de maturação e diferenciação dos progenitores neurais sobreviventes. SGZ: zona subgranular; GCL: camada de células granulares; ML: camada molecular; GFAP: proteína ácida fibrilar glial; Sox2: região determinante do sexo Y (SRY-região 2); DCX: duplaxortina; PSA-NCAM: forma polissialilada da

molécula de adesão celular neural; TuJ1: Beta III tubulina; NeuN: antígeno nuclear neuronal (adaptado de Lucassen et al., 2010).

Estudos apontam que, de todas as células que proliferam na ZSG, aproximadamente 50% sobrevivem e chegam a etapa final de maturação, ao passo que as demais são eliminadas por apoptose (Larson, 2018). Tanto a taxa de proliferação dos progenitores de células tronco neurais, quanto essa taxa de sobrevivência celular podem ser alteradas por diversos estímulos fisiológicos e/ou patológicos, regulando positivamente ou negativamente os processos cognitivos (Ming & Song, 2005).

1.3 NEUROINFLAMAÇÃO E REGULAÇÃO DA NEUROGÊNESE

A presença da barreira hematoencefálica (BHE) e de um ambiente parenquimatoso anti-inflamatório, com altas concentrações locais de citocinas supressoras de inflamação tais como fator de crescimento transformante β (TGF- β) e interleucina 10 (IL-10), protege o SNC contra eventuais danos e a entrada de agentes patogênicos vindos do sistema nervoso periférico (SNP). No entanto, durante processos inflamatórios e/ou neurodegenerativos encefálicos, as respostas imunes inatas no SNC são mediadas por astrócitos e células microgliais residentes, as quais interagem com células T infiltrantes do SNC por meio da expressão de citocinas e quimiocinas (Czirr & Wyss-Coray 2012; Ransohoff & Brown 2012). Microglia, astrócitos e neurônios podem expressar receptores/sensores padrão de reconhecimento de membrana do tipo Toll, ou citoplasmáticos do tipo de ligação a nucleotídeos ricos em leucina (NRLs), pelos quais reconhecem os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) ou a patógenos (PAMPs), ativando principalmente a via de sinalização intracelular do NF- κ B (fator nuclear kappa B) e induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Ransohoff & Brown 2012).

As células microgliais, macrófagos do SNC, agem apresentando o antígeno para células T helper (CD4+) por meio da expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, quando nas suas formas ativadas (hipertrófica e ameboide). A Iba-1 (molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1), outra proteína expressa na superfície das células microgliais, é amplamente utilizada para acompanhar e estudar seus estados reativos, uma vez que sua expressão aumenta progressivamente com a ativação microglial durante a inflamação,

lesão e degeneração neuronal (Kettenmann et al., 2011). Por outro lado, proteínas do MHC classe I são expressas por quase todas as células nucleadas do corpo, incluindo neurônios e células gliais, e seu reconhecimento por células T citotóxicas (CD8+) estimulam diretamente a lise celular. Ademais, evidências têm mostrado que proteínas do MHC-I desempenham também funções não-imunes, como no neurodesenvolvimento, no refinamento das conexões neuronais e na plasticidade sináptica (Bilbo & Schwarz, 2012; Dixon-Salazar et al., 2014; Elmer & McAllister, 2012)

Os astrócitos compreendem um tipo de células gliais com funções de suporte neuronal, tamponamento do potássio, síntese de glicogênio e glutatona, recaptação de glutamato da fenda sináptica e ajuste hídrico, modulando a atividade sináptica e o fluxo sanguíneo, como elemento integrante da sinapse tripartite e da BHE (Ransohoff & Brown 2012; de Senna et al., 2017). A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é um filamento intermediário intracelular presente nos astrócitos, essencial para a formação dos processos astrocíticos estáveis em resposta a danos neuronais ou demandas fisiológicas, sendo usado como marcador astrocítico (de Senna et al. 2017).

A neuroplasticidade e as diferentes fases da neurogênese no GD do hipocampo podem ser moduladas por estímulos ambientais e endógenos tais como neurotransmissores, fatores de crescimento e neurotrofinas (dentre as quais está o BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo), hormônios sexuais, glicocorticoides e canabinoides, entre outros (Grote & Hannan, 2007; Larson, 2018). Além disso, estudos têm mostrado que as células imunes contribuem para a manutenção da neurogênese hipocampal ao longo da vida (Ziv & Schwartz, 2008). Citocinas pró-inflamatórias (principalmente TNF- α - fator de necrose tumoral alfa; IL-1 β e IL-6), anti-inflamatórias (IL-10) e quimiocinas secretadas pelos neurônios, astrócitos e microglia, sob condições saudáveis, patológicas ou de estresse crônico, podem regular a neurogênese hipocampal, beneficiando ou prejudicando a cognição, o aprendizado e a memória, de acordo com o seu balanço e o grau de ativação celular (Donzis & Tronson, 2014; Kohman & Rhodes, 2013; Yirmiya & Goshen, 2011).

Chesnokova et al. (2016) propõem também que algumas doenças periféricas e distúrbios metabólicos de longo prazo, bem como o envelhecimento normal, criam um estado de inflamação periférica crônica. Essas condições estão associadas a distúrbios comportamentais ligados à diminuição da neurogênese

hipocampal adulta, como comprometimento cognitivo, déficits de aprendizado e memória, depressão e ansiedade (Chesnokova et al., 2016). As citocinas pró-inflamatórias liberadas e as células T ativadas no SNP entram no SNC pelo aumento da permeabilidade da BHE, por alteração das concentrações de proteínas das *tight junctions*, como claudina-5, causando, assim, neuroinflamação pela ativação de astrócitos e células microgliais no encéfalo. A microglia ativada reduz a neurogênese hipocampal por suprimir a proliferação das células tronco neurais, aumentar a apoptose das células progenitoras neuronais e diminuir a taxa de sobrevivência dos neurônios imaturos, além de sua integração na circuitaria neuronal existente. Ademais, como um mecanismo indireto, as citocinas pró-inflamatórias liberadas no SNP ativam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), e altos níveis de glicocorticóides suprimem fortemente a proliferação de células progenitoras neurais.

DIABETES MATERNO, SISTEMA IMUNE, NEURODESENVOLVIMENTO E COGNIÇÃO

A Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), em suas Diretrizes 2017-2018, define o Diabetes *mellitus* gestacional como uma intolerância à glicose ou a carboidratos de gravidade variável que se inicia durante a gestação. É o problema metabólico mais comum na gravidez, tem prevalência em 3 a 25% das gestações, variando de acordo com a população estudada e com os critérios diagnósticos utilizados. No Brasil, estima-se que 2,4% a 7,2% de todas as gestantes desenvolvem diabetes, o que significa mais de 200.000 casos novos por ano (Rudge et al., 2013).

O diabetes materno durante a gestação pode ter diversos efeitos no desenvolvimento fetal e no neurodesenvolvimento pós-natal da prole dependendo de sua gravidade e tempo de início, sendo eles inversamente proporcionais à qualidade do controle glicêmico materno (Chandna et al., 2015; Hami et al., 2015; Salazar García et al., 2015). Crianças nascidas de mães diabéticas apresentam maior pré-disposição para distúrbios como esquizofrenia e autismo (Van Lieshout & Voruganti, 2008; Xiang et al., 2015), além de prejuízos cognitivos em aprendizado e memória explícita, função motora e atenção (Deboer et al., 2005; Ornoy et al., 2001; Perna et al., 2015).

De acordo com a literatura, dois modelos animais experimentais têm sido propostos para estudar o diabetes durante a gestação e suas implicações na prole: o modelo de diabetes moderado, que causa hiperglicemia moderada na mãe

(<200mg/dL) e macrosomia na prole, sendo similar às repercussões do diabetes *mellitus* tipo 2 e gestacional em humanos; e o modelo de diabetes severo, que causa altos níveis glicêmicos na mãe (>200mg/dL) e microsomia na prole, como resultado de uma restrição de crescimento intrauterino, sendo similar às repercussões do diabetes clínico não controlado em humanos (Rudge et al., 2013; Van Assche et al., 2001). Tanto a macrosomia quanto a microsomia podem ter efeitos a longo prazo na infância, adolescência e idade adulta da prole. Paradoxalmente, muitas das consequências a longo prazo são semelhantes, especialmente no metabolismo (Ornoy, 2011). Apesar do diabetes gestacional moderado ser mais frequente, a prevalência de hiperglicemia gestacional severa contribui para os 7% a 8% de todos os recém-nascidos vivos com peso abaixo do normal em países desenvolvidos, e é responsável por 5-10% das malformações congênitas induzidas por diabetes (Ornoy, 2011; Ornoy et al., 2015).

A interação entre o sistema imunológico e o SNC tem sido amplamente estudada nos contextos fisiológicos e patológicos (Thion et al., 2018). Desta forma, estudos revelaram a existência de uma importante comunicação entre os neurônios e as células gliais durante a emergência de circuitos funcionais pré- e pós-natais, na manutenção da neurogênese hipocampal ao longo da vida, no desenvolvimento cerebral e comportamento, por meio de sinais moleculares incluindo citocinas, quimiocinas, neurotransmissores, moléculas do MHC e outros fatores (Bilbo & Schwarz, 2012; Thion et al., 2018; Ziv & Schwartz, 2008).

De fato, pesquisas experimentais mostraram que a exposição fetal ao ambiente intrauterino adverso hiperglicêmico durante períodos críticos do desenvolvimento induz inflamação pelo aumento de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e seus receptores (RAGEs) no hipocampo dos neonatos (Chandna et al., 2015). Ainda, o diabetes materno é capaz de desregular os níveis de apoptose, afetar a formação de novos neurônios hipocampais e causar déficits cognitivos na prole (Chandna et al., 2015; Haghiri et al., 2017; Kim et al., 2014; Kruse et al., 2012; Lotfi et al., 2016; Ramos-Rodriguez et al., 2017; Sadeghi et al., 2018). Entretanto, o papel das células e moléculas regulatórias imunes subjacente às alterações neurodesenvolvimentais fetais e às consequências neurobiológicas e comportamentais pós-natais a curto e longo prazo induzidas pelo diabetes materno na prole precisa ser melhor investigado.

1.4 DIABETES MELLITUS TIPO I, ENCEFALOPATIA DIABÉTICA E INFLAMAÇÃO

O diabetes *mellitus* é o distúrbio metabólico mais comum em humanos, com prevalência crescente e alta taxa de morbidade e mortalidade. O diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1) corresponde a 5-10% de todos os casos de diabetes. É uma doença autoimune, poligênica, decorrente da destruição das células β pancreáticas, com consequente deficiência de insulina e hiperglicemia (Sadeghi et al., 2016). A SBD, em suas Diretrizes 2017-2018, estima que mais de 30 mil brasileiros sejam portadores de DMT1 e que o Brasil ocupe o terceiro lugar em prevalência no mundo. O DMT1 se subdivide em 1A, a forma mais frequente, confirmada pela positividade de um ou mais autoanticorpos circulantes contra autoantígenos das células β ; ou em 1B, de natureza idiopática.

Segundo as Diretrizes 2017-2018 da SBD, o diagnóstico clínico do DMT1 baseia-se na apresentação de polidipsia, polifagia, poliúria e perda de massa corporal. A sua confirmação ocorre laboratorialmente pela realização da dosagem de hemoglobina glicada (valores $\geq 6,5\%$), ou pela combinação dos exames de glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose, cujos níveis glicêmicos maiores que 126 mg/dL e 200 mg/dL, respectivamente, indicam a presença da doença.

Múltiplos genes estão envolvidos na etiopatogênese do DMT1 em humanos, sendo os do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II, no braço curto do cromossomo 6, os principais determinantes da suscetibilidade à doença. Os loci DR e DQ são responsáveis por 40% a 50% do risco genético de desenvolver o DMT1, sendo os alelos DR3 e DR4 os mais frequentes nos pacientes diabéticos. Além da predisposição genética, dentre os principais fatores ambientais desencadeadores da resposta autoimune associadas ao DMT1 estão infecções virais, componentes dietéticos e certas composições da microbiota intestinal (Concannon et al., 2009).

O DMT1 é comumente diagnosticado durante a infância, adolescência ou em adultos jovens, período de desenvolvimento e maturação do SNC, tornando-o mais suscetível a níveis extremos de glicemia (Arbelaez et al. 2013). De fato, cronicamente, o DMT1 tem sido associado à encefalopatia diabética: um conjunto de complicações lentas e progressivas, clinicamente relevantes, caracterizada por

alterações na integridade estrutural e funcional do cérebro, levando principalmente a déficits cognitivos de inteligência, velocidade de processamento de informações, eficiência psicomotora e atenção, flexibilidade cognitiva, habilidades visoespaciais, função executiva e de aprendizagem e memória (Arbelaez et al., 2013; Gaspar et al., 2015; Moheet et al., 2015; Sima et al., 2009). Além disso, a encefalopatia diabética está relacionada ao aumento do risco para o desenvolvimento de doença de Alzheimer e de demência vascular em pacientes diabéticos (Chen et al., 2018). A gravidade dessas complicações depende da duração do diabetes e da qualidade do controle metabólico (Wessels et al., 2008).

Embora os mecanismos celulares e moleculares subjacentes à encefalopatia diabética não estejam totalmente compreendidos, parecem ser o resultado do aumento da permeabilidade da BHE e da apoptose neuronal. Ademais, a desregulação de proteínas reguladoras da apoptose, o prejuízo do fluxo sanguíneo cerebral e da plasticidade sináptica hipocampal, bem como a disfunção de células gliais induzida pela hiperglicemia crônica e pelo comprometimento da sinalização da insulina têm sido extensivamente relatados (Beauquis et al., 2010; Chen et al., 2018; Dorsemans et al., 2017; Nagayach et al., 2014; Rom et al., 2018; Sadeghi et al., 2016; de Senna et al., 2015). O aumento do fluxo da via do poliol, com acúmulo intracelular de sorbitol, parece impulsionar o estresse oxidativo, os níveis da proteína quinase C (PKC) e a formação de AGEs. Tais processos que ativam a neuroinflamação têm um papel importante na patogênese das complicações cerebrais celulares e microvasculares, levando à redução nos volumes de substância cinzenta e branca e, especialmente, ao comprometimento do hipocampo, região encefálica envolvida na formação de memória e aprendizado (Figura 2) (Moheet et al., 2015; Sima et al., 2009). A presença de concentrações aumentadas de glicocorticóides circulantes, pela hiperestimulação do eixo HPA, também parece contribuir para os déficits cognitivos na encefalopatia diabética (Marissal-Arvy et al. 2018; Piazza et al. 2014; Revsin et al. 2009).

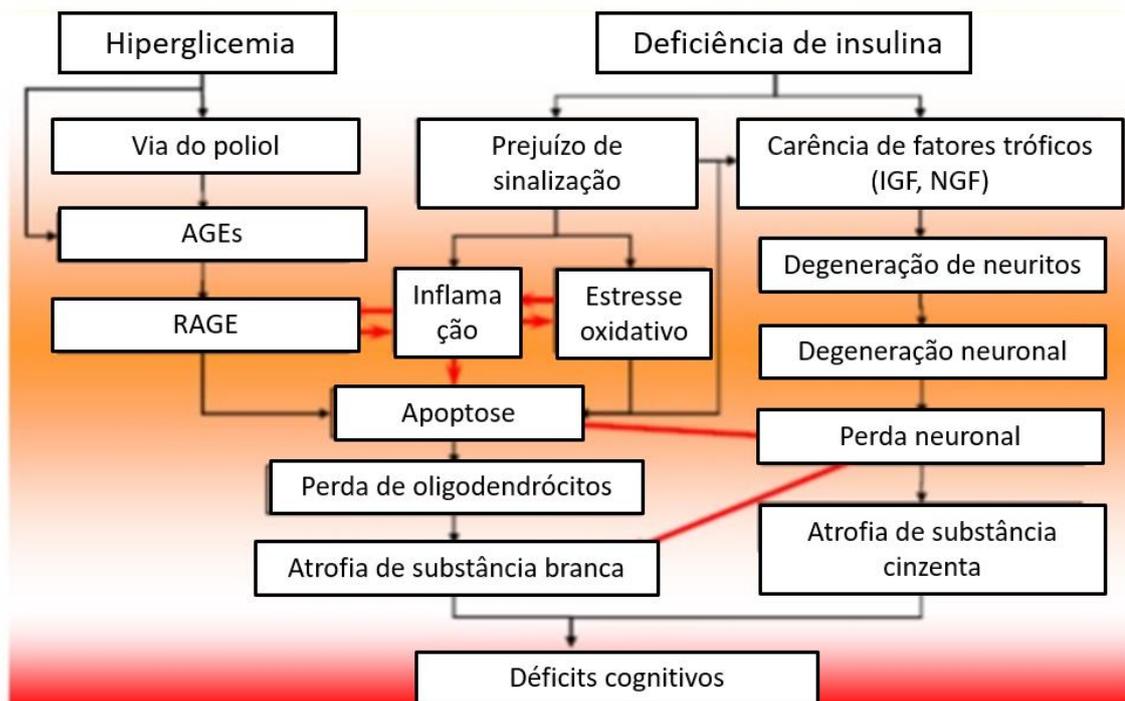


Figura 2. Representação esquemática ilustrando os mecanismos envolvidos na patogênese da encefalopatia diabética (adaptado de Sima et al., 2009).

Estudos têm mostrado que reações microgliais e astrocíticas, bem como a produção de sinais moleculares imunes, estão envolvidas na neuroinflamação subjacente à encefalopatia diabética, agravada pelo aumento da permeabilidade da BHE induzida pela hiperglicemia prolongada, e associadas ao comprometimento da neurogênese hipocampal e da função cognitiva em animais diabéticos (Liu et al., 2018; Nagayach et al., 2014; Rom et al., 2018; de Senna et al., 2015; Song et al., 2017; Chesnokova et al., 2016; Fang et al., 2017; Piazza et al., 2014; Revsin et al., 2009; Tanokashira et al., 2018). Porém, o papel das respostas microgliais e astrocíticas e a modulação específica de proteínas regulatórias imunes sobre os diferentes estágios da neurogênese hipocampal na progressão da encefalopatia diabética ainda não foram estudados conjuntamente.

O modelo animal de DMT1 induzido pela estreptozotocina (STZ) tem sido amplamente utilizado. A STZ é um antibiótico derivado da *Streptomyces achromogene* que tem ação seletiva e citotóxica sobre as células β pancreáticas via transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT2) presentes na membrana plasmática, causando sua destruição por metilação de DNA e pela formação de espécies reativas de oxigênio (Murata et al., 1999). A administração de doses únicas de STZ entre 40 a

65 mg/kg intravenosa, via veia caudal, ou intraperitoneal são as formas mais utilizadas para a indução da hiperglicemia, hipoinsulinemia, polifagia, polidipsia, poliúria e perda de peso corporal que caracterizam o estado diabético (Serino et al., 1998).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O diabetes *mellitus* é tido como a principal doença metabólica em humanos, sendo um importante e crescente problema de saúde pública. Estima-se que essa doença atinja 415 milhões de portadores no mundo, ocupando o Brasil o 4º lugar, com 14,3 milhões de diabéticos. A hiperglicemia persistente está associada a complicações crônicas celulares, micro e macrovasculares, ao aumento da taxa de morbi-mortalidade relacionada à doença e à redução da qualidade de vida dos pacientes. Ademais, o aumento da incidência de diabetes durante a gestação e a carência de estudos sobre suas repercussões a curto e longo prazo na descendência merecem atenção.

Embora se saiba que o DMT1 não controlado é capaz de induzir neuroinflamação, apoptose neuronal, prejuízo na plasticidade sináptica no hipocampo e ativação das células gliais pela hiperglicemia crônica e pelo comprometimento na sinalização da insulina subjacentes aos déficits cognitivos vistos na encefalopatia diabética, a questão temporal do papel das respostas das células astrocíticas e microgliais e a modulação específica de proteínas regulatórias imunes sobre os diferentes estágios da neurogênese hipocampal na progressão da encefalopatia diabética ainda não foram elucidadas. Além disso, apesar de já descritos na literatura alguns mecanismos candidatos pelos quais a hiperglicemia materna severa predispõe os filhos a alterações cerebrais e distúrbios do neurodesenvolvimento, os seus efeitos a curto e longo prazo sobre o sistema imunológico, as células nervosas, o comportamento e os parâmetros físicos da prole permanecem pouco compreendidos.

Assim, a hipótese da presente tese é que, no modelo experimental de diabetes materno severo, o ambiente intrauterino hiperglicêmico materno induzirá alterações neuroimunes e no desenvolvimento dos neonatos, e que essas alterações permanecerão a longo prazo durante a maturação pós-natal da SNC, causando prejuízos cognitivos na prole. Quanto ao modelo experimental proposto de diabetes *mellitus* tipo 1, a hipótese é que existirá uma resposta específica temporal astrocítica e microglial, de citocinas e da expressão das proteínas regulatórias imunes do MHC-I e II modulando as diferentes fases da neurogênese hipocampal e a apoptose, subjacentes à patogênese progressiva da encefalopatia diabética.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos a curto e longo prazo do diabetes experimental materno severo não controlado sobre parâmetros de desenvolvimento e modificações neuroimunológicas hipocampais na prole, bem como analisar os efeitos agudo e crônico do diabetes *mellitus* tipo 1 não controlado sobre a resposta das células e moléculas reguladoras imunes e a modulação das diferentes fases da neurogênese e apoptose no hipocampo de ratos jovens.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos pré-natais do diabetes materno severo não controlado em ratos neonatos no dia pós-natal (DPN) 1 sobre:

- os níveis das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), anti-inflamatória (IL-10) e de BDNF no hipocampo;
- a expressão de proteínas reguladoras da apoptose (procaspase 3, caspase 3 e Bcl-2) no hipocampo;
- a expressão das proteínas GFAP, Iba-1, MHC-I e MHC-II no hipocampo.

Avaliar os efeitos do diabetes materno severo não controlado na prole no dia pós-natal (DPN) 40 sobre:

- os parâmetros descritos acima;
- o desenvolvimento somático;
- o aparecimento dos principais reflexos neurológicos durante o desenvolvimento;
- o metabolismo da glicose;
- a sobrevivência celular no GD do hipocampo;
- a memória aversiva.

Avaliar os efeitos agudos e crônicos do diabetes *mellitus* tipo 1 não controlado em ratos jovens sobre:

- os níveis das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), anti-inflamatória (IL-10) e de BDNF no hipocampo;

- a expressão de proteínas reguladoras da apoptose (procaspase 3 e Bcl-2) no hipocampo;
- a expressão das proteínas GFAP, Iba-1, MHC-I e MHC-II no hipocampo;
- a proliferação dos progenitores de células tronco neurais, bem como a sobrevivência celular no GD do hipocampo.

4. CAPÍTULO 1

“Severe uncontrolled maternal hyperglycemia induces microsomia and neurodevelopment delay accompanied by apoptosis, cellular survival and neuroinflammatory deregulation in rat offspring hippocampus“

(Aceito na revista Cellular and Molecular Neurobiology)

5.CAPÍTULO 2

“Neuroinflammatory perspectives underlying the neurogenesis impairment in a Type
1 Diabetes experimental model”

(A ser submetido à Metabolic Brain Disease)

6.DISSCUSSÃO

Esta tese teve como objetivo avaliar os efeitos a curto e longo prazo do diabetes experimental materno severo não controlado sobre parâmetros de desenvolvimento e modificações neuroimunológicas hipocampais na prole, bem como analisar os efeitos agudo e crônico do diabetes *mellitus* tipo 1 não controlado sobre a resposta das células microgliais e astrocíticas e de moléculas reguladoras imunes na modulação das diferentes fases da neurogênese e apoptose no hipocampo de ratos jovens. Os resultados obtidos foram parcialmente ao encontro da hipótese levantada, uma vez que no modelo experimental de diabetes materno severo foram observados comprometimentos a curto e longo prazo no desenvolvimento, na apoptose, na sobrevivência celular e na neuroinflamação no hipocampo da prole, porém sem prejuízos na memória aversiva. Já o modelo experimental proposto de diabetes *mellitus* tipo 1 revelou um papel importante da neuroinflamação e um desequilíbrio de interleucinas específicas mediadas principalmente pela resposta de células microgliais, durante a janela temporal analisada, contribuindo para o comprometimento das diferentes fases da neurogênese hipocampal subjacente à encefalopatia diabética com a progressão da doença, mas sem alterar a expressão das proteínas do MHC no hipocampo.

O diabetes materno severo não controlado causa comprometimento no desenvolvimento somático e atraso no aparecimento de alguns marcos neurológicos durante o desenvolvimento da prole

O modelo animal estudado mimetizou as características das consequências do diabetes materno observadas em estudos experimentais anteriores, sendo um modelo reprodutível. Evidências têm mostrado que esse modelo de diabetes tipo 1 materno pode induzir microssomia na prole, possivelmente como resultado da restrição de crescimento intrauterino com comprometimento placentário (Gabbay-Benziv & Baschat, 2015; Rudge et al., 2013; Van Assche et al., 2001; Volpato et al., 2015), levando a efeitos a longo prazo, especialmente em parâmetros metabólicos e neurológicos nos bebês (Hami et al., 2015; Ornoy, 2005; Perna et al., 2015; Reece et al., 2009). De fato, em nosso estudo, 60% dos filhotes nascidos de mães diabéticas eram microssômicos, como relatado anteriormente por Salazar García et al. (2015). Do DPN 7 ao 21, o comprometimento do desenvolvimento somático foi mais evidente, mostrando os efeitos pré-natais e pós-natais da injeção

materna de STZ na prole. A continuação do estado hiperglicêmico nas ratas prenhes tratadas com STZ após o parto pareceu contribuir para o crescimento reduzido durante a amamentação, e os filhotes permaneceram pequenos até a juventude (DPN 40), como descrito anteriormente por Chandna et al. (2015). Assim, os efeitos observados no DPN 40 podem não ser apenas devido ao diabetes gestacional / pré-natal, mas também à desnutrição nos estágios iniciais do desenvolvimento da prole, uma vez que o diabetes materno tipo 1 pode induzir atraso no início da lactogênese, por afetar a secreção de prolactina e as concentrações de lactose, citrato e nitrogênio totais no leite (Hartmann & Cregan, 2001; Neubauer et al., 1993; Ostrom & Ferris, 1993). Por outro lado, na clínica, a amamentação por parte de mães diabéticas é recomendada e deve ser altamente incentivada devido aos benefícios maternos, incluindo o aumento da sensibilidade à insulina, e a possibilidade da diminuição da secreção de prolactina pode ser revertida pelo aumento da frequência entre as mamadas e pela administração de insulina (Feldman & Brown, 2016).

Os marcos do desenvolvimento possuem um papel importante na avaliação da maturação dos reflexos neonatais e servem como preditores de alterações do comportamento em adultos (Heyser, 2004). Como consequências neurológicas de curto prazo induzidas pela hiperglicemia materna severa não controlada, as avaliações dos principais marcos do desenvolvimento revelaram atraso no aparecimento do reflexo de aversão à queda, sobressalto auditivo, atividade locomotora e abertura dos olhos na prole, corroborando e complementando os achados sobre os prejuízos cognitivos já relatados na clínica (Deboer et al., 2005; Ornoy et al., 2001; Ornoy, 2005; Perna et al., 2015; Rizzo et al., 1995; Sells et al., 1994). Além disso, os filhotes machos foram mais afetados do que as fêmeas pelo diabetes materno severo em algumas tarefas, como anteriormente relatado por Kruse et al. (2014).

O diabetes materno severo não controlado não afeta a memória aversiva de curta e longa duração da prole

Como efeitos a longo prazo induzidos pela hiperglicemia materna severa não controlada sobre a cognição da prole, no presente estudo, o grupo de animais nascidos de mães tratadas com STZ não mostrou prejuízo na retenção de memória aversiva 1,5 h e 24 h após o treino no teste da esQUIVA inibitória no DPN 40.

Diferentemente, Kim et al. (2014) demonstraram, com o mesmo modelo experimental de diabetes, comprometimento na memória dos filhotes no mesmo teste no DPN 42. Não obstante, os animais foram avaliados mais tardiamente que os do presente estudo, 48 h após a sessão de treinamento. Na verdade, não podemos afirmar se o déficit de memória aversiva se manifestaria mais tardiamente na vida da prole de mães diabéticas no nosso estudo. Ademais, outros comprometimentos cognitivos induzidos pela hiperglicemia materna nos filhotes já foram demonstrados utilizando diferentes testes comportamentais, como descrito anteriormente por Chandna et al. (2015), Ramos-Rodriguez et al. (2017) e Vuong et al. (2017).

O diabetes materno pré-natal severo não controlado e a amamentação materna pós-natal não teve consequências sobre o metabolismo da glicose a longo prazo na prole

Como esperado, os neonatos nascidos de mães diabéticas apresentaram níveis mais elevados de glicose no sangue no DPN 1, semelhante ao observado em recém-nascidos de mães diabéticas gestacionais (Rudge et al., 2013). No entanto, o grupo de animais nascido de mães tratadas com STZ não demonstrou alteração no metabolismo da glicose no teste oral de tolerância à glicose no DPN 40; pelo contrário, mostrou níveis mais baixos de glicose no sangue antes e durante todos os tempos detectados durante o teste, comparado ao grupo controle. De acordo com nosso resultado, Zhao & Weiler (2010) também não detectaram comprometimento do metabolismo da glicose na prole de mães diabéticas com glicose controlada ou malcontrolada com 8 e 12 semanas de idade. No entanto, essa situação parece mudar mais tarde ao longo da vida da prole, com o aparecimento de intolerância à glicose aos 5 meses de idade, tanto em machos quanto em fêmeas (Kruse et al., 2014).

Além disso, o peso relativo do fígado na prole em DPN 1 não foi afetado pela hiperglicemia pré-natal materna, embora tenha diminuído no grupo de animais nascido de mães diabéticas no DPN 40. Não foi foco do nosso estudo analisar o metabolismo; porém, esse achado pode estar relacionado a alterações a longo prazo no acúmulo de lipídios hepáticos ou no metabolismo da glicose/insulina na prole, e tais mecanismos devem ser investigados em estudos futuros. Ainda, em nosso estudo, o peso relativo do timo estava aumentado nos neonatos nascidos de mães tratadas com STZ e persistiu até o DPN 40, mas sem alteração no peso relativo das adrenais. O timo é um órgão linfóide primário de maturação linfocítica (Zdrojewicz et

al., 2016). Assim, o aumento do peso relativo do timo observado na prole de mães diabéticas pode estar relacionado à imunomodulação induzida pela hiperglicemia materna severa pré-natal e pós-natal no sistema imune dos filhotes.

O diabetes materno severo não controlado causa desregulação a curto e longo prazo na expressão das proteínas reguladoras da apoptose no hipocampo da prole

Os comprometimentos neurodesenvolvimentais causados pelo diabetes materno severo relatados em nosso estudo foram acompanhados por alterações a curto e longo prazo na expressão de genes reguladores da apoptose (procaspase 3, caspase 3 e Bcl-2). No DPN 1, os efeitos a curto prazo foram evidenciados por uma diminuição significativa na expressão de procaspase 3, caspase 3 e Bcl-2 nos neonatos nascidos de mães tratadas com STZ, enquanto que as consequências a longo prazo foram reveladas pela persistência da diminuição na expressão de procaspase 3 e caspase 3 até a juventude da prole (DPN 40). A ocorrência de apoptose pode ser definida pelo equilíbrio entre reguladores pró e anti-apoptóticos, e o processo de refinamento das conexões sinápticas é fisiológico e especialmente importante para a formação das redes neuronais durante o desenvolvimento (Elmore, 2007; Haghiri et al., 2017). Nossos resultados são apoiados por Haghiri et al. (2017) que também mostraram níveis reduzidos da proteína Bcl-2 no hipocampo de neonatos nascidos de mães diabéticas, mas em contraste com outros estudos anteriores que relataram alterações não significativas nos níveis protéicos de procaspase 3 e caspase 3 (Kruse et al., 2012) ou mostraram um aumento na expressão de caspase 3 no hipocampo de embriões e filhotes expostos à hiperglicemia materna (Kim et al., 2014; Reece et al., 2006).

O diabetes materno severo não controlado causa prejuízo na sobrevivência das novas células geradas no GD do hipocampo da prole

O desequilíbrio na expressão de proteínas da via apoptótica foi acompanhado por um comprometimento na fase de sobrevivência celular da neurogênese pós-natal no hipocampo da prole de mães diabéticas avaliado no DPN 40, possivelmente justificando a redução no número de células granulares no GD relatadas anteriormente por Kafshgiri et al. (2014). A diminuição da taxa de proliferação de progenitores de células tronco neurais no hipocampo nos filhotes de

mães diabéticas severas no DPN 42 já havia sido descrita por Kim et al. (2014), enquanto Sadeghi et al. (2018) demonstraram uma regulação negativa significativa da neurogênese pela expressão diminuída da proteína nuclear neuronal específica (NeuN) no hipocampo em desenvolvimento de filhotes de mães diabéticas no DPN 14.

O diabetes materno severo não controlado causa desequilíbrio a longo prazo de citocinas inflamatórias, da expressão de MHC-I e dos níveis de BDNF no hipocampo da prole

A longo prazo, o diabetes materno severo não controlado causou diminuição da expressão de MHC-I e dos níveis de BDNF e IL-1 β , bem como aumento nos níveis de TNF- α no hipocampo da prole no DPN 40. Este estudo complementa os resultados encontrados por Chandna et al. (2015), no qual o diabetes materno criou um estado pró-inflamatório mediado pelo aumento da sinalização via receptores de produtos finais de glicação avançada (RAGE) e um aumento não significativo na expressão relativa de NF- κ B no encéfalo de neonatos nascidos de mães tratadas com STZ no DPN 1, afetando a excitabilidade hipocampal e o comportamento cognitivo tardio na vida da prole. Além disso, a reposição de insulina nas ratas prenhes reverteu tais efeitos induzidos pela hiperglicemia materna (Chandna et al., 2015).

O BDNF e moléculas do sistema imunológico podem influenciar a plasticidade neural, a neurogênese pós-natal no hipocampo e a memória (Kohman e Rhodes, 2013; Yirmiya e Goshen, 2011). Embora a IL-1 β seja considerada uma interleucina pró-inflamatória, níveis normais/fisiológicos dela são necessários para a manutenção da neurogênese adulta hipocampal e desempenham um papel importante nos processos de aprendizagem e memória. Entretanto, altos níveis de BDNF promovem/aumentam a neurogênese, enquanto altos níveis de TNF- α parecem ser prejudiciais (Kohman & Rhodes, 2013; Yirmiya & Goshen, 2011). Ainda, outras moléculas imunes que também foram consideradas importantes para o neurodesenvolvimento normal e o funcionamento sináptico incluem o MHC-I (Bilbo & Schwarz, 2012; Yirmiya & Goshen, 2011). De fato, no presente estudo, a expressão da proteína do MHC-I estava diminuída no hipocampo da prole de mães tratadas com STZ em PND 40.

Em conjunto, nossos dados reforçam que a ativação da neuroinflamação, a desregulação dos níveis de apoptose, bem como o prejuízo na sinalização de MHC-I e da sobrevivência celular no hipocampo podem estar implicados nos distúrbios neurodesenvolvimentais e neurocognitivos vistos na prole de mães diabéticas.

O diabetes mellitus tipo 1 não controlado causa acentuada atrofia do timo e hiperativação do eixo HPA em ratos jovens

O DMT1 é um distúrbio metabólico comumente acompanhado por aumento na secreção do glicocorticoide corticosterona e déficits cognitivos em ratos (Beauquis et al., 2008; Piazza et al., 2014). Dessa forma, o peso relativo das glândulas supra-renais e do timo foi usado nesse estudo como uma medida indireta de possível imunomodulação induzida pelos níveis de corticosterona nos animais (Piazza et al., 2011; Revsin et al., 2009). Sete dias após a indução do DMT1, a hiperglicemia aguda causou uma diminuição significativa no peso relativo do timo nos animais diabéticos, ao passo que cronicamente induziu uma diminuição ainda mais pronunciada no peso relativo do timo concomitante com um aumento no peso relativo das adrenais, 37 dias após o início do diabetes. Nossos achados estão de acordo com estudos anteriores que também mostraram redução do peso relativo do timo, níveis elevados de corticosterona circulante e maior peso relativo das adrenais associado à hiperatividade do eixo HPA em ratos diabéticos após 6 dias (Revsin et al., 2009), 20 dias (Piazza et al., 2011), 45 dias (Piazza et al., 2014), 3 semanas (Marissal-Arvy et al., 2018) e 7 semanas (Lenart et al., 2016) do início da doença, semelhante ao reportado em pacientes diabéticos (Gaspar et al., 2016; Moulton et al., 2015). Além disso, estudos sugerem que altos níveis de glicocorticóides podem aumentar a inflamação cerebral e contribuir para o comprometimento cognitivo e da neurogênese hipocampal observado na encefalopatia diabética através de receptores de glicocorticóides e mineralocorticóides presentes na microglia e neurônios, diminuindo o limiar para secreção de fatores pró-inflamatórios (Beauquis et al., 2008; Kettenmann et al., 2011; Liu et al., 2018). Portanto, esses dados sugerem que o aumento do peso relativo das glândulas supra-renais e a diminuição do peso relativo do timo observado nos grupos diabéticos podem estar relacionado a distúrbios no sistema imune induzidos pela hiperglicemia não tratada e/ou estresse crônico, provavelmente

causando hiperativação do eixo HPA, reforçando a potencial ligação entre neuroinflamação e déficits cognitivos.

Agudamente, o diabetes mellitus tipo 1 não controlado causa comprometimento da proliferação de células tronco neurais, diminuição da expressão de Bcl-2 e dos níveis de BDNF, concomitante com aumento nos níveis de IL-6 no hipocampo de ratos jovens

Evidências têm proposto que alguns dos déficits cognitivos associados à encefalopatia diabética podem estar relacionados, em parte, à diminuição dos níveis de BDNF, ativação de astrócitos e microglia e redução da neurogênese pós-natal no GD do hipocampo induzida pela inflamação (Chen et al., 2018; Etemad et al., 2015; Nagayach et al., 2014; Piazza et al., 2011, 2014; Revsin et al., 2009; Tanokashira et al., 2018). De fato, observamos um comprometimento da proliferação de progenitores de células tronco neurais no GD associado com um aumento na IL-6, uma das principais interleucinas pró-inflamatórias, e com uma diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo 7 dias após a indução do diabetes. Esses resultados são apoiados por Fang et al. (2017) que anteriormente mostraram níveis aumentados de IL-6 no hipocampo de camundongos diabéticos, e por Vallières et al. (2002) que demonstraram redução da proliferação celular no hipocampo em camundongos transgênicos adultos por superprodução de IL-6. Níveis diminuídos de BDNF no hipocampo de ratos diabéticos também foram relatados por Lenart et al. (2016), no entanto, 7 semanas após o início da doença. O efeito agudo do DMT1 na redução da proliferação celular também foi acompanhado pela diminuição da expressão de Bcl-2, semelhante ao apresentado anteriormente por Fang et al. (2017). Bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica da família Bcl-2, que regula negativamente a ativação de caspases efetoras (Sadeghi et al., 2016). No nosso estudo, houve uma tendência de diminuição de procaspase-3. No entanto, níveis aumentados de apoptose por meio da maior ativação da caspase-3 e fragmentação do DNA no hipocampo de animais diabéticos já foram amplamente relatados em diferentes modelos animais (Chen et al., 2011; Fang et al., 2017; Jafari Anarkooli et al., 2014; Nagayach et al., 2014; Sadeghi et al., 2016; Yonguc et al., 2015).

Cronicamente, o diabetes mellitus tipo 1 não controlado causa desequilíbrio dos níveis de interleucinas mediado por ativação da resposta microglial

Por outro lado, no presente estudo, o DMT1 causou uma diminuição nos níveis de IL-1 β e IL-10, concomitante com um aumento na expressão de células microgliais por Iba-1 e uma redução não estatisticamente significativa na sobrevivência das novas células que proliferaram no GD do hipocampo 37 dias (ou cerca de 5 semanas) após a indução do diabetes no grupo crônico. No entanto, um comprometimento significativo na fase de sobrevivência celular da neurogênese hipocampal em ratos diabéticos já havia sido demonstrado 45 dias após o início da doença, acompanhado novamente pela ativação microglial e déficits de memória espacial, que foram amenizados pelo enriquecimento ambiental (Piazza et al., 2014). Os presentes resultados estão de acordo com Fang et al. (2017) e Nagayach et al. (2014), que também mostraram aumento da proliferação e transformação morfológica de células microgliais do estado de repouso para o fenótipo ativado nas regiões CA1, CA2, CA3 e GD do hipocampo em ratos diabéticos pela imunomarcagem com Iba-1 na 2^a, 4^a e 6^a semana seguintes à indução do diabetes. Ainda, como dito anteriormente, embora a IL-1 β seja considerada uma interleucina pró-inflamatória, seus níveis normais/fisiológicos são necessários para a manutenção da neurogênese hipocampal em adultos e desempenham um papel importante nos processos de aprendizagem e memória (Yirmiya & Goshen, 2011), enquanto Cacci et al. (2008) relataram que a produção de IL-10 em cultura de microglia, uma interleucina anti-inflamatória, estimulou positivamente a diferenciação neuronal e a sobrevivência de novas células.

O diabetes mellitus tipo 1 não controlado não induz resposta astrocítica pela expressão de GFAP, durante a janela temporal analisada, no hipocampo de ratos jovens

A participação da resposta astrocítica na inflamação e nos déficits cognitivos induzidos por DMT1 no hipocampo de ratos tem sido extensivamente investigada (Nagayach et al., 2014; Revsin et al., 2009; de Senna et al., 2011, 2017). Em nosso estudo, o DMT1 não alterou a expressão da GFAP no hipocampo de ratos diabéticos até o 37^o dia da doença. Diferentemente, de Senna et al. (2011) mostraram uma diminuição no conteúdo de GFAP no hipocampo após cerca de 5 semanas da indução do diabetes, enquanto que Nagayach et al. (2014) demonstraram expressão

aumentada da imunomarcaco com GFAP, juntamente com alteraco na morfologia dos astrocitos, revelando um fenótipo progressivamente ativado das células astrocíticas no hipocampo dos animais já após a 2^a, 4^a e 6^a semana de diabetes. No entanto, não podemos descartar a hipótese de alteraces astrocíticas mais tardias, com a progressão da patogênese do DMT1, contribuindo para a neuroinflamaco e o comprometimento ainda mais acentuado da neurogênese hipocampal subjacente  encefalopatia diabética.

O diabetes mellitus tipo 1 não controlado não altera a expressão de proteínas do MHC no hipocampo de ratos jovens

Nagayach et al. (2014) também relataram uma profunda e progressiva imunomarcaco microglial por MHC-II, concomitante com Iba-1, no hipocampo dos animais diabéticos a partir da 2^a semana da doença. Aqui, a expressão de MHC-II pela microglia não foi modificada até o 37^o dia (ou cerca de 5^a semana) após a induco do DMT1, quando analisada por Western blotting. Apesar da diferença nas técnicas analíticas empregadas, podemos inferir que, até o momento analisado em nosso estudo, o DMT1 não foi capaz de induzir o perfil amebóide/estado macrofágico das células microgliais. Outra molécula imune que também foi considerada importante para o funcionamento normal neuronal e sinptico inclui o MHC-I (Bilbo & Schwarz, 2012; Yirmiya & Goshen, 2011). Entretanto, no presente estudo, o DMT1 não alterou a expressão de MHC-I nem aguda, nem cronicamente no hipocampo dos animais diabéticos e, portanto, parece não ter influenciado no processo de neurogênese, semelhante ao demonstrado anteriormente por Laguna Goya et al. (2010).

7.CONCLUSÕES

Com base nos achados da presente tese, podemos concluir que o diabetes materno severo afeta tanto o desenvolvimento somático quanto o neurodesenvolvimento nos neonatos, associados à desregulação na expressão de proteínas reguladoras da apoptose, a alterações neuroimunes e ao comprometimento da sobrevivência celular no hipocampo da prole na vida adulta. Os nossos resultados reforçam a necessidade de tratamento do estado hiperglicêmico materno durante a gestação e o período de amamentação, a fim de prevenir as consequências a curto e longo prazo do diabetes materno na prole. Quanto ao diabetes *mellitus* tipo 1, podemos concluir que induz um processo neuroinflamatório mediado por resposta das células microgliais e por interleucinas específicas, as quais parecem modular seletivamente as diferentes fases da neurogênese hipocampal com a progressão da encefalopatia diabética. Os nossos achados ratificam a importância do controle do estado hiperglicêmico nos pacientes diabéticos, para retardar o aparecimento das complicações cerebrais induzidas pela hiperglicemia persistente malcontrolada a longo prazo. Assim, a presente tese reforça o envolvimento da neuroinflamação como mecanismo neurobiológico presente em ambos os modelos de diabetes estudados.

8.PERSPECTIVAS

Considerando os achados da presente tese, surgem algumas perspectivas para serem respondidas em estudos futuros. Sobre o modelo de diabetes materno severo não controlado, poderia ser adotado um outro grupo experimental com reposição de insulina nas ratas prenhes diabéticas durante a gestação e no período de amamentação, para comparar os efeitos do controle glicêmico materno sobre os parâmetros analisados na prole. Ou, ainda, após o parto, usar mães substitutas para amamentar e criar os filhotes de mães diabéticas severas para, assim, isolar os efeitos pré- e pós-natais da hiperglicemia materna não controlada a curto e longo prazo sobre os parâmetros neurodesenvolvimentais da prole. Ainda, explorar as possíveis diferenças existentes nos efeitos do diabetes materno sobre machos e fêmeas.

No modelo de diabetes *mellitus* tipo 1 não controlado, o acréscimo de um grupo experimental com reposição de insulina e administração concomitante de algum fármaco anti-inflamatório, como estratégia terapêutica, poderia mostrar se as complicações causadas pela hiperglicemia crônica malcontrolada e seus efeitos a longo prazo seriam minimizados.

9.REFERÊNCIAS

Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.

Altman J, Das GD (1967) Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 214:1098–1101.

Arbelaez AM, Semenkovich K, Hershey T (2013) Glycemic extremes in youth with T1DM: Effects on the developing brain's structural and functional integrity. *Pediatr Diabetes*. 14(8):541-53.

Beauquis J, Homo-Delarche F, Revsin Y, De Nicola AF, Saravia F (2008) Brain Alterations in Autoimmune and Pharmacological Models of Diabetes Mellitus: Focus on Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis Disturbances. *Neuroimmunomodulation* 15 (1): 61-67.

Beauquis J, Roig P, Nicola AF, Saravia F (2010) Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS One* 5:1–12.

Bilbo SD, Schwarz JM (2012) The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Front Neuroendocrinol*. 33(3):267-86.

Cacci E, Ajmone-Cat MA, Anelli T, Biagioni S, Minghetti L (2008) In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. *Glia* 56:412-425.

Chandna AR, Kuhlmann N, Bryce CA, Greba Q, Campanucci VA, Howland JG (2015) Chronic maternal hyperglycemia induced during mid-pregnancy in rats increases rage expression, augments hippocampal excitability, and alters behavior of the offspring. *Neuroscience* 303: 241–260.

Chen R, Shi J, Yin Q, Li X, Sheng Y, Han J, Zhuang P, Zhang Y (2018) Morphological and Pathological Characteristics of Brain in Diabetic Encephalopathy. *J Alzheimers Dis*. 65(1):15-28.

Chesnokova V, Pechnick RN, Wawrowsky K (2016) Chronic peripheral inflammation, hippocampal neurogenesis, and behavior. *Brain Behav Immun*. 58:1-8.

Concannon P, Rich SS, Nepom GT (2009) Genetics of Type 1A Diabetes. *The New England Journal of Medicine* 360: 1646–1654.

Czirr E, Wyss-Coray T (2012) The immunology of neurodegeneration. *J Clin Invest*. 122(4):1156-63.

de Senna PN, Ilha J, Baptista PP, do Nascimento PS, Leite MC, Paim MF, Gonçalves CA, Achaval M, Xavier LL (2011) Effects of physical exercise on spatial memory and

astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab Brain Dis.* 26(4):269-79.

de Senna PN, Xavier LL, Bagatini PB, Saur L, Galland F, Zanotto C, Bernardi C, Nardin P, Gonçalves CA, Achaval M (2015) Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the blood brain barrier in diabetic rats. *Brain Res.* 1618:75-82.

de Senna PN, Bagatini PB, Galland F, Bobermin L, do Nascimento PS, Nardin P, Tramontina AC, Gonçalves CA, Achaval M, Xavier LL (2017) Physical exercise reverses spatial memory deficit and induces hippocampal astrocyte plasticity in diabetic rats. *Brain Res.* 1655:242-251.

DeBoer T, Wewerka S, Bauer PJ, Georgieff MK, Nelson CA (2005) Explicit memory performance in infants of diabetic mothers at 1 year of age. *Dev Med Child Neurol* 47: 525–531.

Dekeyzer S, De Kock I, Nikoubashman O, Vanden Bossche S, Van Eetvelde R, De Groote J, Acou M, Wiesmann M, Deblaere K, Achten E (2017) "Unforgettable" - a pictorial essay on anatomy and pathology of the hippocampus. *Insights Imaging.* 8(2):199-212.

Deng W, Aimone JB, Gage FH. (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.* 11(5):339-50.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018 / Organização José Egídio Paulo de Oliveira, Renan Magalhães Montenegro Junior, Sérgio Vencio. -- São Paulo: Editora Clannad, 2017.

Dixon-Salazar TJ, Fourgeaud L, Tyler CM, Poole JR, Park JJ, Boulanger LM (2014) MHC class I limits hippocampal synapse density by inhibiting neuronal insulin receptor signaling. *J Neurosci.* 34(35):11844-56.

Donzis EJ, Tronson NC (2014) Modulation of learning and memory by cytokines: signaling mechanisms and long term consequences. *Neurobiol Learn Mem.* 115:68-77.

Dorsemans AC, Couret D, Hoarau A1, Meilhac O, Lefebvre d'Hellencourt C, Diotel N (2017) Diabetes, adult neurogenesis and brain remodeling: New insights from rodent and zebrafish models. *Neurogenesis (Austin).* 4(1):e1281862.

Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H (2008) Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol.* 18(1):108-15.

Elmer BM, McAllister AK (2012) Major histocompatibility complex class I proteins in brain development and plasticity *Trends Neurosci.* 35(11):660-70.

Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313–1317.

Etemad A, Sheikhzadeh F, Asl NA (2015) Evaluation of brain-derived neurotrophic. *Neurol Res.* 37(3):217-222.

Fang SC, Xie H, Chen F, Hu M, Long Y, Sun HB, Kong LY, Hong H, Tang SS (2017) Simvastatin ameliorates memory impairment and neurotoxicity in streptozotocin induced diabetic mice. *Neuroscience.* 355:200-211.

Feldman AZ, Brown FM (2016) Management of Type 1 Diabetes in Pregnancy. *Curr Diab Rep.* 16:76.

Gabbay-Benziv R, Baschat AA (2015) Gestational diabetes as one of the “great obstetrical syndromes” e the maternal, placental, and fetal dialog. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 29:150-155.

Gaspar JM, Baptista FI, Macedo MP, Ambrósio AF (2016) Inside the Diabetic Brain: Role of Different Players Involved in Cognitive Decline. *ACS Chem Neurosci.* 7(2):131-42.

Grote HE, Hannan AJ (2007) Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34(5-6):533-45.

Haghir H, Hami J, Lotfi N, Peyvandi M, Ghasemi S, Hosseini M (2017) Expression of apoptosis-regulatory genes in the hippocampus of rat neonates born to mothers with diabetes. *Metab Brain Dis* 32:617-628.

Hami J, Shojae F, Vafae-Nezhad S, Lotfi N, Kheradmand H, Haghir H (2015) Some of the experimental and clinical aspects of the effects of the maternal diabetes on developing hippocampus. *World J Diabetes.* 6:412-422.

Hartmann P, Cregan M (2001). Lactogenesis and the effects of insulin-dependent diabetes mellitus and prematurity. *J Nutr.*131:3016S-3020S.

Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N (2014) Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014:150845.

Heyser CJ (2004) Assessment of developmental milestones in rodents. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 8:Unit 8.18.

Jafari Anarkooli I, Barzegar Ganji H, Pourheidar M (2014) The protective effects of insulin and natural honey against hippocampal cell death in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Res.* 2014:491571.

Kafshgiri SK, Ghafari S, Golalipour MJ (2014) Gestational diabetes induces neuronal loss in dentate gyrus in rat offspring. *J Neurol Sci* 31: 316–324.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 91(2):461-553.

Kim YH, Sung YH, Lee HH, Ko IG, Kim SE, Shin MS, Kim BK (2014) Postnatal treadmill exercise alleviates short-term memory impairment by enhancing cell proliferation and suppressing apoptosis in the hippocampus of rat pups born to diabetic rats. *J Exerc Rehabil* 10:209-217.

Kitabatake Y, Sailor KA, Ming GL, Song H (2007) Adult neurogenesis and hippocampal memory function: new cells, more plasticity, new memories? *Neurosurg Clin N Am.* 18(1):105-13, x.

Kohman RA, Rhodes JS (2013) Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun.* 27(1):22-32.

Kruse MS, Barutta J, Vega MC, Coirini H (2012) Down regulation of the proliferation and apoptotic pathways in the embryonic brain of diabetic rats. *Cell Mol Neurobiol* 32:1031-1037.

Kruse MS, Vega MC, Rey M, Coirini H (2014) Sex differences in LXR expression in normal offspring and in rats born to diabetic dams. *J Endocrinol* 222:53-60.

Laguna Goya R, Tyers P, Barker RA (2010) Adult neurogenesis is unaffected by a functional knock-out of MHC class I in mice. *Neuroreport.* 21(5):349-53.

Larson TA (2018) Sex Steroids, Adult Neurogenesis, and inflammation in CNS Homeostasis, Degeneration, and Repair. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:205.

Lenart L, Hodrea J, Hosszu A, Koszegi S, Zelena D, Balogh D, Szkibinszkij E, Veres-Szekely A, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A (2016) The role of sigma-1 receptor and brain-derived neurotrophic factor in the development of diabetes and comorbid depression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Psychopharmacology* 233(7):1269-1278.

Liu Y, Li M, Zhang Z, Ye Y, Zhou J (2018) Role of microglia-neuron interactions in diabetic encephalopathy. *Ageing Res Rev.* 42:28-39.

Lotfi N, Hami J, Hosseini M, Haghiri D, Haghiri H (2016) Diabetes during pregnancy enhanced neuronal death in the hippocampus of rat offspring. *Int J Dev Neurosci* 51:28-35.

Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, van Dam AM, Dayer AG, Fuchs E, Oomen CA, Czéh B (2010) Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol.* 20(1):1-17.

Marissal-Arvy N, Campas MN, Semont A, Ducroix-Crepy C, Beauvieux MC, Brossaud J, Corcuff JB, Helbling JC, Vancassel S, Bouzier-Sore AK, Touyarot K, Ferreira G, Barat P, Moisan MP (2018) Insulin treatment partially prevents cognitive and hippocampal alterations as well as glucocorticoid dysregulation in early-onset insulin-deficient diabetic rats. *Psychoneuroendocrinology*. 93:72-81.

Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 28:223-50.

Moheet A, Mangia S, Seaquist ER (2015) Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Ann N Y Acad Sci*. 1353:60-71.

Moulton CD, Pickup JC, Ismail K (2015) The link between depression and diabetes: the search for shared mechanisms. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 3(6):461–471.

Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S (1999) Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochemical Pharmacology* 57:881-887.

Nagayach A, Patro N, Patro I (2014) Astrocytic and microglial response in experimentally induced diabetic rat brain. *Metab. Brain Dis*. 29:747–761.

Neubauer SH, Ferris AM, Chase CG, Fanelli J, Thompson CA, Lammi-Keefe CJ, Clark RM, Jensen RG, Bendel RB, Green KW (1993) Delayed lactogenesis in women with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 58:54-60.

Ornoy A, Ratzon N, Greenbaum C, Wolf A, Dulitzky M (2001) School-age children born to mothers with pregestational or gestational diabetes exhibit a high rate of inattention and fine and gross motor impairment. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14:681–689.

Ornoy A (2005) Growth and neurodevelopmental outcome of children born to mothers with pregestational and gestational diabetes. *Pediatr Endocrinol Rev* 3:104-113.

Ornoy A (2011) Prenatal origin of obesity and their complications: gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. *Reprod Toxicol* 32:205–212.

Ornoy A, Reece EA, Pavlinkova G, Kappen C, Miller RK (2015) Effect of Maternal Diabetes on the Embryo, Fetus, and Children: Congenital Anomalies, Genetic and Epigenetic Changes and Developmental Outcomes. *Birth Defects Res C Embryo Today* 105:53-72.

Ostrom KM, Ferris AM (1993) Prolactin concentrations in serum and milk of mothers with and without insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 58:49-53.

Perna R, Loughan AR, Le J, Tyson K (2015) Gestational Diabetes: Long-Term Central Nervous System Developmental and Cognitive Sequelae. *Appl Neuropsychol Child* 4:217-220.

Piazza FV, Pinto GV, Trott G, Marcuzzo S, Gomez R, Fernandes MC (2011) Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behav Brain Res* 217:16–20.

Piazza FV, Segabinazi E, Centenaro LA, do Nascimento PS, Achaval M, Marcuzzo S (2014) Enriched environment induces beneficial effects on memory deficits and microglial activation in the hippocampus of type 1 diabetic rats. *Metab Brain Dis.* 29(1):93-104.

Ramos-Rodriguez JJ, Sanchez-Sotano D, Doblaz-Marquez A, Infante-Garcia C, Lubian-Lopez S, Garcia-Alloza M (2017) Intranasal insulin reverts central pathology and cognitive impairment in diabetic mother offspring. *Mol Neurodegener.* 12(1):57.

Ransohoff RM, Brown MA (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest.* 122(4):1164-71.

Reece EA, Leguizamón G, Wiznitzer A (2009) Gestational diabetes: the need for a common ground. *Lancet* 373:1789-1797.

Reece EA, Wu YK, Zhao Z, Dhanasekaran D (2006) Dietary vitamin and lipid therapy rescues aberrant signaling and apoptosis and prevents hyperglycemia induced diabetic embryopathy in rats. *Am J Obstet Gynecol* 194:580-585.

Revsin Y, Rekers NV, Louwe MC, Saravia FE, Nicola AF, Kloet ER, Oitz MS (2009) Glucocorticoid receptor blockade normalizes Hippocampal alterations and cognitive impairment in Streptozotocininduced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology* 34: 747–758.

Rizzo TA, Dooley SL, Metzger BE, Cho NH, Ogata ES, Silverman BL (1995) Prenatal and perinatal influences on long-term psychomotor development in offspring of diabetic mothers. *Am J Obstet Gynecol* 173: 1754–1758.

Rom S, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, Seliga A, Winfield M, Heldt NA, Kolpakov MA, Bashkirova YV, Sabri AK, Persidsky Y (2018) Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading To Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models. *Mol Neurobiol.* Jul 5. doi: 10.1007/s12035-018-1195-5.

Rudge MV, Piculo F, Marini G, Damasceno DC, Calderon IM, Barbosa AP (2013) Translational research in gestational diabetes mellitus and mild gestational hyperglycemia: current knowledge and our experience. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 57:497-508.

Sadeghi A, Esfandiary E, Hami J, Khanahmad H, Hejazi Z, Mardani M, Razavi S (2018) The effects of maternal diabetes and insulin treatment on neurogenesis in the developing hippocampus of male rats. *J Chem Neuroanat.* 91:27-34.

Sadeghi A, Hami J, Razavi S, Esfandiary E, Hejazi Z (2016) The effect of diabetes mellitus on apoptosis in hippocampus: Cellular and molecular aspects. *Int J Prev Med*; 7:57.

Salazar García M, Reyes Maldonado E, Revilla Monsalve MC, Villavicencio Guzmán L, Reyes López A, Sánchez-Gómez C (2015) Importance of Maternal Diabetes on the Chronological Deregulation of the Intrauterine Development: An Experimental Study in Rat. *J Diabetes Res* 2015:354265.

Sells CJ, Robinson NM, Brown Z, Knopp RH (1994) Long-term developmental follow-up of infants of diabetic mothers. *J Pediatr* 125:S9-S17.

Serino R, Ueta Y, Tokunaga M, Hara Y, Nomura M, Kabashima N, Shibuya I, Hattori Y, Yamashita H (1998) Up regulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, 41: 640–648.

Sima AA, Zhang W, Muzik O, Kreipke CW, Rafols JA, Hoffman WH (2009) Sequential abnormalities in type 1 diabetic encephalopathy and the effects of C-Peptide. *Rev Diabet Stud*. 6(3):211-22.

Song Y, Zhang F, Ying C, Kumar KA, Zhou X (2017) Inhibition of NF- κ B activity by aminoguanidine alleviates neuroinflammation induced by hyperglycemia. *Metab Brain Dis*. 32(5):1627-1637.

Tanokashira D, Kurata E, Fukuokaya W, Kawabe K, Kashiwada M, Takeuchi H, Nakazato M, Taguchi A (2018) Metformin treatment ameliorates diabetes-associated decline in hippocampal neurogenesis and memory via phosphorylation of insulin receptor substrate 1. *FEBS Open Bio*. 8(7):1104-1118.

Taupin P (2007) Brdu immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 53:198–214.

Thion MS, Ginhoux F, Garel S (2018) Microglia and early brain development: an intimate journey. *Science*. 362(6411):185-189.

Vallières L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE (2002) Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci*. 22(2):486-492.

Van Assche FA, Holemans K, Aerts L (2001) Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *Br Med Bull* 60:173-182.

Van Lieshout RJ, Voruganti LP (2008) Diabetes mellitus during pregnancy and increased risk of schizophrenia in offspring: a review of the evidence and putative mechanisms. *J Psychiatry Neurosci* 33:395–404.

Volpato GT, Damasceno DC, Sinzato YK, Ribeiro VM, Rudge MV, Calderon IM (2015) Oxidative stress status and placental implications in diabetic rats undergoing swimming exercise after embryonic implantation. *Reprod Sci* 22:602-608.

von Bohlen Und Halbach O (2007) Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 329(3):409-20.

Vuong B, Odero G, Rozbacher S, Stevenson M, Kereliuk SM, Pereira TJ, Dolinsky VW, Kauppinen TM (2017) Exposure to gestational diabetes mellitus induces neuroinflammation, derangement of hippocampal neurons, and cognitive changes in rat offspring. *J Neuroinflammation* 14:80.

Wessels AM, Scheltens P, Barkhof F, Heine RJ (2008) Hyperglycaemia as a determinant of cognitive decline in patients with type 1 diabetes. *Eur J Pharmacol* 585:88–96.

Xiang AH, Wang X, Martinez MP, Walthall JC, Curry ES, Page K, Buchanan TA, Coleman KJ, Getahun D (2015) Association of maternal diabetes with autism in offspring. *JAMA* 313: 1425–1434.

Yirmiya R, Goshen I (2011) Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 25(2):181-213.

Yonguc GN, Dodurga Y, Adiguzel E, Gundogdu G, Kucukatay V, Ozbal S, Yilmaz I, Cankurt U, Yilmaz Y, Akdogan I. (2015) Grape seed extract has superior beneficial effects than Vitamin E on oxidative stress and apoptosis in the hippocampus of streptozotocin induced diabetic rats. *Gene* 555(2):119-26.

Zdrojewicz Z, Pachura E, Pachura P (2016) The Thymus: A Forgotten, But Very Important Organ. *Adv Clin Exp Med* 25:369-375.

Zhao J, Weiler HA (2010) Long-term effects of gestational diabetes on offspring health are more pronounced in skeletal growth than body composition and glucose tolerance. *Br J Nutr* 104:1641-1649.

Ziv Y, Schwartz M (2008) Immune-based regulation of adult neurogenesis: Implications for learning and memory. *Brain Behav Immun* 22:167-176.

ANEXO



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 28221

Título: EFEITOS DO DIABETES NOS PERÍODOS GESTACIONAL E ADOLESCÊNCIA SOBRE A MEMÓRIA, A NEUROGÊNESE E A INFLAMAÇÃO EM RATOS

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

SIMONE MARCUZZO - coordenador desde 01/01/2015
OTAVIO AMERICO AUGUSTIN - Aluno de Especialização desde 01/01/2015
ETHIANE SEGABINAZI - Aluno de Mestrado desde 01/01/2015
Francele Valente Piazza - Aluno de Doutorado desde 01/01/2015
André Luís Ferreira de Meireles - Aluno de Mestrado desde 01/01/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 06/04/2015- Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 100 ratos Wistar machos adolescentes (40 dias), e 64 fêmeas e 30 machos com 75 dias, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 22 de Abril de 2015

Cristiane Matte

CRISTIANE MATTE
Vice Coordenador da comissão de ética