

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 INDUZIDO POR  
INJEÇÃO DE ESTREPTOZOTOCINA INTRAPERITONEAL NA MEMÓRIA,  
APRENDIZAGEM E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS WISTAR JOVENS**

Miriara Borges Leal

Orientador: Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Co-orientadora: Dra. Adriana Fernanda K. Vizuite

Porto Alegre, RS, Brasil

2023

Miriara Borges Leal

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 INDUZIDO POR  
INJEÇÃO DE ESTREPTOZOTOCINA INTRAPERITONEAL NA MEMÓRIA,  
APRENDIZAGEM E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS WISTAR JOVENS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves

Coorientadora: Dra. Adriana Fernanda K. Vizuite

Porto Alegre

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Leal, Miriara Borges

Avaliação do efeito do Diabetes Mellitus tipo 1 induzido por injeção de estreptozotocina intraperitoneal na memória, aprendizagem e parâmetros bioquímicos de ratos Wistar jovens / Miriara Borges Leal. -- 2023.

58 f.

Orientador: Carlos Alberto Gonçalves.

Coorientadora: Adriana Fernanda K. Vizquete.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Diabetes Mellitus. 2. Dano cognitivo. 3. Comportamento. I. Gonçalves, Carlos Alberto, orient. II. Fernanda K. Vizquete, Adriana, coorient. III. Título.

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

Miriara Borges Leal

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 INDUZIDO POR  
INJEÇÃO DE ESTREPTOZOTOCINA INTRAPERITONEAL NA MEMÓRIA,  
APRENDIZAGEM E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS WISTAR JOVENS**

Trabalho de conclusão de curso de pós graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Bioquímica.

Aprovado em: 27 de Janeiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

*André Quincozes dos Santos*

---

Prof. Dr. André Quincozes dos Santos - Departamento de Bioquímica UFRGS

*Patrícia Sesterheim*

---

Dra. Patrícia Sesterheim - Centro Estadual de Vigilância Sanitária

*Caroline Zanotto de Boeckel*

---

Dra. Caroline Zanotto de Boeckel - Grupo Hospitalar Conceição

*Carlos Alberto Gonçalves*

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves - Departamento de Bioquímica UFRGS  
(orientador)

## RESUMO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é definido como uma desordem do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, caracterizado principalmente por hiperglicemia crônica. A hiperglicemia está relacionada com diversas alterações, tanto periféricas, quanto no sistema nervoso central (SNC). Dentre as complicações do DM, podemos destacar o declínio da função cerebral, podendo estar relacionado com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A maioria da população acometida por DM tipo 1 (DM1) apresenta os primeiros sintomas complexantes na infância e adolescência. O DM1 causa, entre outras complicações, neuroinflamação seguida de dano ao SNC e perda cognitiva. Este projeto visa padronizar o modelo de DM1 em ratos Wistar jovens e gerar conhecimento sobre essa patologia no desempenho cognitivo e alterações neuroquímicas. Foi padronizado dose de injeção de estreptozotocina (STZ) intraperitoneal (IP) de 70 mg/Kg, que foi capaz de mimetizar as alterações relacionadas ao DM1, observadas dois dias pós injeção através da mensuração da glicemia. Animais diabéticos apresentaram declínio cognitivo por alterações comportamentais, nos testes de Reconhecimento de Objetos (RO) e *Morris Water Maze* (MWM) e bioquímicas. Também observamos alterações em marcadores de estresse oxidativo, detoxificação do metilglioxal, astrocitários e neurotróficos hipocampais. Além disso, foram encontradas alterações nas atividades e níveis sanguíneos de transaminases, lipídeos e metabólitos nitrogenados. Com este estudo, observamos alterações neuroquímicas sobre a fisiopatologia do DM1 em ratos Wistar jovens, mas muito ainda precisa ser elucidado. São necessários mais estudos para que possamos melhorar nossa compreensão a respeito dessa doença no público jovem e, enfim, buscar melhores e mais eficientes formas de tratamento.

## ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is defined as a disorder of carbohydrate, lipid and protein metabolism, mainly characterized by chronic hyperglycemia. Hyperglycemia is related to several alterations, both peripheral and in the central nervous system (CNS). Among the complications of DM, we can highlight the decline in brain function, which may be related to the development of neurodegenerative diseases. The majority of the population affected by type 1 DM (DM1) presents the first complexing symptoms in childhood and adolescence. DM1 causes, among other complications, neuroinflammation followed by CNS damage and cognitive loss. This project aims to standardize the DM1 model in young Wistar rats and generate knowledge about this pathology in cognitive performance and neurochemical changes. An intraperitoneal (IP) streptozotocin (STZ) injection dose of 70 mg/Kg was standardized, which was able to mimic the changes related to DM1, observed two days after the injection through the measurement of blood glucose. Diabetic animals showed cognitive decline due to behavioral alterations, in the Object Recognition (OR) and Morris Water Maze (MWM) and biochemical tests. We also observed alterations in markers of oxidative stress, methylglyoxal detoxification, astrocytes and hippocampal neurotrophs. In addition, changes were found in the activities and blood levels of transaminases, lipids and nitrogenous catabolites. With this study, we observed neurochemical alterations on the pathophysiology of DM1 in young Wistar rats, but much remains to be elucidated. More studies are needed so that we can improve our understanding of this disease in young people and, finally, seek better and more efficient forms of treatment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação de alterações bioquímicas e comportamentais relacionadas ao dano cognitivo em ratos Wistar jovens com DM1 induzida por injeção de STZ IP ao longo do tempo.....	20
Figura 2: Variação da glicemia em ratos Wistar jovens com DM1.....	27
Figura 3: Perda ponderal ao longo das semanas de ratos Wistar jovens com DM1.....	28
Figura 4: Hiperglicemia em ratos Wistar jovens com DM1.....	28
Figura 5: Tendência à hiperlactemia de ratos Wistar jovens com DM1.....	29
Figura 6: Transaminasemia sanguínea de ratos Wistar jovens com DM1.....	29
Figura 7: Alterações de metabólitos nitrogenados no soro de ratos Wistar jovens com DM1.....	30
Figura 8: Dislipidemia sanguínea em ratos jovens diabéticos.....	30
Figura 9: Processo inflamatório ativo no hipocampo e soro de ratos Wistar jovens com DM1.....	31
Figura 10: Neuroinflamação hipocampal mediada por TLR4 em ratos Wistar jovens com DM1.....	32
Figura 11: Prejuízo psicomotor e exploratório de ratos Wistar jovens com DM1.....	33
Figura 12: Prejuízo na memória de curto e longo prazo de ratos Wistar jovens com DM1.....	34
Figura 13: Prejuízo na aprendizagem e na memória espacial de ratos Wistar jovens com DM1.....	35
Figura 14: Morte neuronal em ratos Wistar jovens com DM1.....	36
Figura 15: Prejuízo na plasticidade sináptica de ratos Wistar jovens com DM1.....	36
Figura 16: Tendência à formação de placas $\beta$ -amiloides no hipocampo de ratos Wistar jovens com DM1.....	37
Figura 17: Reatividade astrocitária hipocampal em ratos Wistar jovens com DM1.....	38

Figura 18: Prejuízo no metabolismo glutamatérgico astrocitário hipocampal em ratos Wistar jovens com DM1.....	38
Figura 19: Estresse oxidativo e intoxicação por metilglioxal hipocampal em ratos Wistar jovens com DM1.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs - Produtos finais de glicação avançada  
BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo  
BHE - Barreira hemato encefálica  
ChAT - Acetilcolintransferase  
DA - Doença de Alzheimer  
DCF - Diclorodihidrofluoresceína  
DM1 - Diabetes *Mellitus* tipo 1  
DM - Diabetes *Mellitus*  
EROS - Espécies reativas de oxigênio  
GFAP - Proteína glial fibrilar ácida  
GLO-1 - Glioxalase 1  
Gln - Glutamina  
GLUT-1 - Transportador de glicose do tipo 1  
GLUT-4 - Transportador de glicose do tipo 4  
GS - Glutamina sintetase  
GSH - Glutathiona  
HbA1c - Hemoglobina glicada  
IL-1 $\beta$ , IL-6 - Interleucinas 1 $\beta$  e 6  
IP - Intraperitoneal  
MG - Metilglioxal  
MWM - Morris Water Maze  
NeuN - Proteína nuclear neuronal  
NF- $\kappa$ B - Fator nuclear kappa B  
NGF - Fatores de crescimento neuronal  
PGE-2 - Prostaglandinas E-2  
RAGEs - Receptores de produtos finais de glicação avançada  
RO - Reconhecimento de Objetos  
SNC - Sistema Nervoso Central  
STZ - Estreptozotocina  
TGF $\beta$  - Fator de crescimento transformador beta  
TGO - Transaminase glutâmico-oxalacética

TGP - Transaminase glutâmico-pirúvica

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

TLR-4 - Receptor do tipo toll 4

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1.	Diabetes <i>Mellitus</i> .....	12
1.2.	Dano cognitivo em jovens diabéticos.....	15
1.3.	Modelo <i>in vivo</i> de Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1.....	16
1.4.	Neuroinflamação.....	17
1.5.	Astrócitos.....	18
1.6.	Objetivos.....	19
1.6.1.	Objetivo Geral.....	19
1.6.2.	Objetivos Específicos.....	19
2.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
3.	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
4.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
5.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>50</b>

## **Introdução**

### **Diabetes Mellitus**

O Diabetes *Mellitus* (DM) é definido como uma desordem do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, caracterizado principalmente por hiperglicemia crônica (Zanotto et al., 2016). Esta é uma das mais importantes desordens metabólicas que causam mortes no mundo (Shehata et al., 2017), tendo sido estimado que em média 7 milhões de pessoas morreram por conta das complicações relacionadas ao DM em 2021 (Boulton et al., 2021). Além disso, atualmente 537 milhões de pessoas são portadoras de DM (Boulton et al., 2021). De acordo com o “Internacional Diabetes Federation Atlas” (2019), nos últimos 20 anos houve um aumento expressivo do número de pessoas que foram diagnosticadas com DM, chegando a um aumento de 51% desde a primeira edição da revista no ano de 2000. O gasto estimado com essa doença é de aproximadamente 588 bilhões de dólares por ano mundialmente (Boulton et al., 2021).

Existem três tipos principais de DM diagnosticados: tipo 1, tipo 2 e gestacional. O tipo 2 é o de maior prevalência (90% dos casos) e pode ser encontrado em indivíduos de todas as idades. É caracterizado por resistência à insulina, a qual se resume a uma incapacidade do organismo responder totalmente à insulina e/ou a uma produção inadequada desse hormônio. Além deste, há o diabetes gestacional, que é diagnosticado a partir da constatação de hiperglicemia durante a gestação e a cada ano é observado um aumento dos casos dessa desordem. Se estima que ocorra diabetes gestacional em 1 a cada 6 gestações (Cho et al., 2017).

Alguns autores têm sugerido o termo “DM tipo 3” em situações nas quais uma pessoa com diabetes tipo 2 desenvolve declínio cognitivo e, por consequência, o desenvolvimento de doença neurodegenerativa, como a de maior prevalência no mundo, a Doença de Alzheimer (DA). Sabe-se que a maior prevalência da DA é em pacientes com histórico de diabetes (Saedi et al., 2016). Por isso, ao utilizar o termo “DM tipo 3”, se tenta chamar a atenção da população e da comunidade médica para realizar o diagnóstico e tratamento preventivo do DM o mais cedo possível. Dessa forma, evita-se a progressão do DM2 ao ponto do desenvolvimento de declínio cognitivo e consequentemente Alzheimer pelo paciente diabético (Kandimalla et al., 2018). Percebe-se também uma forte semelhança da DA com DM1 e DM2. Como o

DM1, a deficiência de insulina faz parte de alguns mecanismos na DA e, como o DM2, a DA está associada à resistência à insulina no estágio inicial de desenvolvimento. Como consequência, a DA pode ser considerada como a forma cerebral do diabetes (Saedi et al., 2016). Essa relação também é bioquimicamente estabelecida, já que em estudos anteriores foi constatado que anormalidades na sinalização da insulina e na sensibilidade do receptor de insulina em neurônios na DA estão relacionados a disfunções metabólicas como o DM (Zilliox et al., 2016). Inclusive, o aumento do estresse oxidativo tem tido um papel fundamental para o desenvolvimento de DA por pacientes com DM que favorece o dano oxidativo, hiperfosforilação da proteína tau, disfunção mitocondrial e acúmulo de placas  $\beta$ -amiloides no espaço extracelular (Saedi et al., 2016).

Entretanto, apesar de não ocorrer na maioria nos casos de Diabetes, o DM tipo 1 (DM1) é o mais comum em crianças e adolescentes. Cerca de 1,2 milhões de crianças no mundo são portadoras de DM1 atualmente (Boulton et al., 2021) e, geralmente, é causado por uma reação autoimune na qual as células beta produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas são atacadas pelo sistema imunológico (Cabrera et al., 2016). Como resultado, ocorre a produção de pouca ou nenhuma insulina, então, é observada a deficiência relativa ou absoluta deste hormônio (Khemakhem et al., 2020). Por conta desse déficit de insulina, a glicose absorvida a partir da alimentação não é metabolizada, continuando na circulação sanguínea e ocasionando, dessa maneira, a hiperglicemia. Os sintomas mais comuns nesse público, é a poliúria, polidipsia e perda de peso, sendo que aproximadamente 1/3 destes, apresenta cetoacidose diabética (DiMeglio et al., 2018). Também se deve considerar as particularidades dessa faixa etária, como alterações na sensibilidade à insulina relacionadas à maturidade sexual e crescimento físico, capacidade de autocuidado e vulnerabilidade neurológica à hipoglicemia e, principalmente, à hiperglicemia (Bigaran et al., 2022). Recentemente, além de ser considerada uma doença autoimune, o DM1 tem sido reconhecido como um resultado de uma interação complexa entre fatores ambientais e de microbioma, genoma, metabolismo e sistema imune (DiMeglio et al., 2018). A hiperglicemia no DM1 está relacionada com diversas alterações, tanto periféricas, como no SNC, como por exemplo, a auto-oxidação da glicose, a geração de produtos finais de glicação avançada (AGEs), o desequilíbrio entre a

geração de radicais livres e defesas antioxidantes, e inflamação (Parvizi et al., 2014).

Geralmente, o diagnóstico do DM é realizado quando os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) aparecem acima de 6,5%. Os níveis de glicemia maiores que 126 mg/dL em jejum, ou maiores que 200 mg/dL a qualquer momento do dia (glicemia casual) ou duas horas após a ingestão de 75 g de glicose dissolvida em água (teste de tolerância à glicose) também podem ser utilizados como indicativo de DM (DiMeglio et al., 2018; CONITEC-SUS, 2019).

Recentemente têm sido reveladas melhores formas de diagnóstico do DM1, ao se investigar em cada paciente a relação da quantidade de anticorpos pancreáticos autoimunes encontrados e a probabilidade de se contrair a doença. Nestas formas de diagnóstico dividimos em 3 ou 4 estágios, o primeiro sem sintomas, no segundo estágio percebemos a quantidade anormal de açúcar no sangue, nomeada disglicemia, na terceira se estabelece o diagnóstico clínico do DM1 quando se percebe a hiperglicemia (Powers, 2021) e no quarto estágio a doença já está estabelecida de longa data (DiMeglio et al., 2018). Em estudo realizado por Ziegler et al. (2013) com crianças de idades variadas (de recém-nascidos até 20 anos de idade) evidenciou que aproximadamente aos 10 anos de idade, em crianças predispostas geneticamente a contrair o DM1 (com parentes próximos com a doença) apresentam a ativação de pelo menos 2 anticorpos autoimunes. A presença sérica de 2 anticorpos autoimunes ou mais ativados, relaciona-se com os sintomas corriqueiros do DM1, principalmente a hiperglicemia, e assim se determina o segundo estágio diagnóstico. Quando se encontram mais de 3 anticorpos ativados, pode-se observar desordens metabólicas e outras disfunções.

Já foi comprovado que o DM, tanto o tipo 1 como o tipo 2, aumenta em pelo menos duas vezes o risco de demência e disfunções cognitivas (Umegaki et al., 2014). Pelo menos 3 alterações bioquímicas têm sido estudadas e associadas com os déficits cognitivos no DM: alterações vasculares, resistência à insulina e falha na regulação da glicose (Nardin et al., 2014). A duração do DM é um fator de risco para o aumento do declínio cognitivo (Zanotto et al., 2016). Outro fato é que a fisiopatologia do declínio cognitivo no DM está envolvida com o prejuízo na sinalização de insulina cerebral, aumento de processos inflamatórios e aumento do estresse oxidativo, além de defeitos no metabolismo e regulação mitocondriais

(Zilliox et al., 2016). O hipocampo é uma área chave do encéfalo responsável pelo aprendizado, memória e cognição. Essa região é uma das poucas em que os receptores de insulina cerebrais se encontram expressos. A autofosforilação desses receptores desencadeia uma cascata de eventos como a translocação do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4) e cumprem um papel essencial na manutenção da função neuronal em termos metabólicos, de crescimento sinápticos e como moduladores de sobrevivência (Hussain et al., 2019).

Além disso, sabe-se que o DM causa muitas complicações, como distúrbios gastrointestinais, cardiomiopatia, retinopatia, nefropatia e neuropatia. Assim como, declínio da função cerebral, podendo estar relacionado com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Delkhosh-Kasmaie et al., 2018).

### **Dano cognitivo em jovens diabéticos**

Tendo em vista que a cognição é definida como “a ação ou processo mental de aquisição de conhecimento e compreensão por meio do pensamento, da experiência e dos sentidos”. A memória, por outro lado, é a retenção, registro e processo de recuperação do conhecimento. Dessa forma, determinamos que todo o conhecimento adquirido com a experiência, como fatos conhecidos, eventos lembrados, habilidades adquiridas e aplicadas, é considerado como memória (Saedi et al., 2016).

Apesar de se ter conhecimento das complicações relacionadas ao DM1, pouco se tem estudado a respeito do seu efeito no SNC em ratos jovens com a doença. Em estudos realizados com humanos jovens diabéticos, foram encontradas evidências de prejuízo cognitivo de diversas maneiras (Li et al., 2017). Sendo encontradas alterações como prejuízo em tarefas motoras, sensoriais, verbais e neurocognitivas incluindo declínio na função cognitiva de forma crônica ou aguda com efeitos prejudiciais na velocidade psicomotora, flexibilidade cognitiva, atenção e percepção visual (Li et al., 2017; DiMeglio et al., 2018). Essa disfunção cognitiva foi caracterizada por Shalimova et al. (2019) como uma diminuição da velocidade e flexibilidade mental, mas o aprendizado e a memória não foram afetados em alguns pacientes. Crianças em que o DM1 é diagnosticado com menos de 7 anos de idade correm maior risco de disfunção cognitiva mais grave (Saedi et al., 2016). Comparando estudos com crianças e adultos com DM1, Shalimova et al. (2019) ressalta que, em tarefas cognitivas que exigem concentração e resposta rápida

psicomotora, ambas faixas etárias de pacientes diabéticos apresentam menor desempenho, demonstrando “*mental slowing*” (lentidão mental em tradução livre) comparados aos controles não-diabéticos. DiMeglio et al. (2018) destaca que a maioria dos autores relacionam essas alterações fisiopatológicas com alterações micro e macrovasculares e alterações na estrutura cerebral, perda neuronal e atrofia encefálica. Uma das alterações macrovasculares causadas pelo DM é a doença cerebrovascular, cuja principal causa é a aterosclerose (Luna et al., 2021). Shalimova et al. (2019) revela que duas principais complicações clínicas microvasculares (retinopatia diabética proliferativa e complicações renais) e fatores sociais foram associados a um estimado declínio cognitivo. Essas complicações microvasculares diabéticas são causadas pela exposição prolongada a altos níveis de glicose (Giacco & Brownlee, 2010). Além disso, em modelo animal usando ratos jovens de 17 dias de idade, percebeu-se prejuízo na plasticidade sináptica e na transmissão sináptica excitatória que estão correlacionados com a consolidação da memória (Sasaki-Hamada et al., 2012). Esses estudos nos proporcionam a investigação mais aprofundada no efeito do DM1 em ratos jovens nessa e em outras áreas do SNC. Sendo importante considerarmos as alterações na estrutura e função cerebral já que é uma grande preocupação porque tem impacto na qualidade de vida geral do paciente diabético (Luna et al., 2021).

### **Modelo *in vivo* de Diabetes *Mellitus* Tipo 1**

O DM1 pode ser induzido em animais pela administração intraperitoneal (IP) de estreptozotocina (STZ), composto alquilante sintetizado por bactérias gram-positivas *Streptomyces sachromogenes*. A STZ mimetiza os efeitos periféricos relacionados ao DM1 e também promove a ativação da inflamação (Zanotto et al., 2016; Shehata et al., 2017), pois essa substância é capaz de matar as células beta pancreáticas, por conta de sua alta toxicidade e, com isso, causar um prejuízo no metabolismo da glicose e diminuir ou extinguir a secreção de insulina no animal (Rodrigues et al., 2019). Além disso, quando a STZ é administrada por via IP, atingindo assim o pâncreas, ela promove a fragmentação do DNA, formação de radicais livres e consequente morte celular (Tese de doutorado de Rodrigues et al., 2010).

Este modelo de indução de DM1 *in vivo* em roedores é bem caracterizado em animais adultos ou idosos, principalmente em ratos e camundongos. Não é muito usado o modelo em animais jovens, pois há um nível significativo de mortalidade dos animais (<20%) e é necessária uma concentração superior de STZ para indução quando comparados a animais mais velhos (Furman, 2015; Masiello et al., 1975). De acordo com a literatura, as concentrações de STZ para indução de DM1 em ratos variam de 50 mg/Kg - 100 mg/Kg (Simas, 2020). No entanto, essas concentrações não são padronizadas e variam de acordo com o peso e idade do animal (Masiello et al., 1975).

### **Neuroinflamação**

A neuroinflamação é o processo inflamatório no tecido nervoso e permite a comunicação entre o sistema imune e o SNC. É uma resposta celular e molecular a diferentes tipos de lesões causadas por patógenos ou danos celulares (Glass et al., 2010; Tese de doutorado de Vizuetete, 2017).

A princípio, a neuroinflamação auxilia na prevenção do dano ao SNC e na recuperação do tecido lesionado. No entanto, quando a resposta inflamatória ocorre de forma crônica, é relacionada com desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e disfunções neurológicas (Gonçalves et al., 2013).

Uma das patogêneses que podem induzir um processo de neuroinflamação é o DM tipo 3, observado em pacientes com Doença de Alzheimer (DA). Com as alterações provocadas pelo DM, o indivíduo torna-se suscetível à neurodegeneração, por isso, o DM é considerado um fator de risco para DA. A neurodegeneração é intimamente relacionada com a neuroinflamação, assim é considerada uma consequência da outra (Kandimalla et al., 2018).

Essa reação inflamatória no SNC ocorre inicialmente através da ativação das células gliais, essenciais para proteção e manutenção dos neurônios. Essas células estimulam a sinalização que atinge receptores como o receptor do tipo toll 4 (TLR-4) no encéfalo e os receptores de produtos finais de glicação avançada (RAGEs). Estes, por sua vez, enviam sinais aos fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF-κB) no núcleo de células gliais, que induzem a ativação das ciclooxigenase 2 (COX-2) e, assim, liberam prostaglandinas, como prostaglandinas E-2 (PGE-2), além da produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células gliais, como por exemplo, as interleucinas 1β e 6 (IL-1β, IL-6) e fator de

necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Outra consequência da neuroinflamação é o aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) através da estimulação da NADPH-oxidase e por consequência da apoptose e necrose ocasionada pela inflamação no SNC (Glass et al., 2010). Todas estas alterações resultam em neurodegeneração e, conseqüentemente, em demência, o que se resume à perda cognitiva e de memória, parcial ou completamente.

## **Astrócitos**

As principais células gliais que interagem com os neurônios são os astrócitos. Eles realizam essa interação por meio de um processo denominado sinapse tripartite (Perea et al., 2009). Essas células são capazes de regular a homeostase metabólica de íons e a concentração de neurotransmissores no SNC, além disso, são capazes de secretar citocinas pró-inflamatórias e fatores tróficos, que auxiliam no combate a inflamação (Hansen et al., 2017).

As células em questão desempenham importantes funções no metabolismo energético cerebral, como na modulação dos níveis de glicose, captando glicose do espaço extracelular, através do transportador de glicose do tipo 1 (GLUT-1) e distribuindo lactato para os neurônios (Pellerin et al., 2007).

Os astrócitos podem proteger os neurônios de diferentes insultos, como da produção de EROs, graças a sua alta capacidade antioxidante, e podem liberar fatores neurotróficos que aumentam a sobrevivência neuronal, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e fatores de crescimento neuronal (NGF) (Pirttimaki & Parri, 2013; Finsterwald et al., 2015). O BDNF tem emergido como uma molécula chave envolvida no controle da diferenciação e sobrevivência neuronal e formação sináptica. Esta molécula é bastante encontrada no hipocampo e em outras regiões encefálicas (Hussain et al., 2019).

Os astrócitos podem ser ativados e mudar a sua aparência em resposta a condições fisiopatológicas, fenômeno este chamado de gliose ou astrogliose, onde ocorrem alterações morfológicas, proliferação celular, expressão de marcadores específicos de ativação e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (Anderson et al., 2014). A ativação de células gliais altera a expressão de marcadores bastante utilizados em diversas situações envolvendo doenças encefálicas: a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a proteína ligante de cálcio,

S100B (Gonçalves, 2008). Além disso, a astrogliose provoca alterações no metabolismo do neurotransmissor glutamato e em defesas antioxidantes (Donato, 2009).

## **Justificativa**

Sabe-se que a maioria da população acometida por DM1 apresenta os primeiros sintomas complexantes na infância e adolescência. O DM1 causa, entre outras complicações, neuroinflamação seguida de dano e perda cognitiva, principalmente a longo prazo. Por isso, este projeto visa gerar conhecimento sobre o efeito do DM1 em modelo animal induzido por injeção de STZ IP em ratos *Wistar* jovens, tendo em vista que este modelo já é bem conhecido dentro da comunidade científica, culminando em diversos resultados prévios significativos.

## **Objetivos Gerais**

Avaliar o efeito do *Diabetes Mellitus* tipo 1 sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em modelo induzido por STZ em ratos *Wistar* jovens.

## **Objetivos específicos**

- Investigar glicemia e peso corporal após administração de STZ, em ratos de 30 dias, durante 4 semanas;
- Avaliar alterações bioquímicas e inflamatórias no soro desses animais após 4 semanas de indução do modelo;
- Investigar o comportamento cognitivo desses animais após 4 semanas de indução do modelo;
- Avaliar alterações neuroquímicas e inflamatórias no hipocampo após 4 semanas de indução do modelo.

## **Materiais e métodos**

### **Desenho experimental**

Com o objetivo de verificar se as alterações neuroquímicas do DM1 em animais jovens contribuem para um prejuízo cognitivo de memória e aprendizado, obtivemos dois grupos experimentais: animais controle e DM que passaram pela

avaliação de dano cognitivo após 4 semanas de confirmação da doença. A fim de se realizar esta avaliação foram realizados testes comportamentais entre os dias 30-39, conforme figura 1. Então, foram eutanasiados e as amostras obtidas foram armazenadas em freezer -80°C para análise bioquímica.

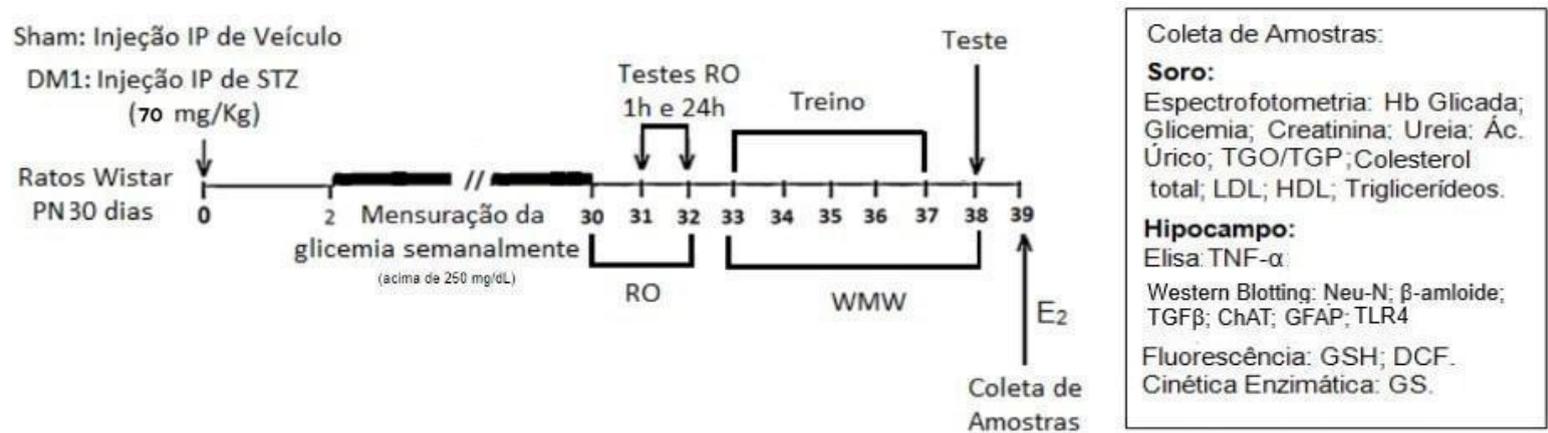


Figura 1: Avaliação de alterações bioquímicas e comportamentais relacionadas ao dano cognitivo em ratos Wistar jovens com DM1 induzida por injeção de STZ IP ao longo do tempo.

## Considerações éticas

Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008, as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), as diretrizes da Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS) com a aprovação nº 38870.

Os ratos provindos do Biotério do Departamento de Bioquímica (PPG-Bioquímica) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foram mantidos em grupos de 4 (quatro) animais em caixas limpas de polipropileno nas medidas de 41x34x17,8cm, com tampas de arame de aço inox, eletropolido e malha para ratos, comedouro embutido em “V”, laterais triangulares fixas, divisória basculante para formar o comedouro, duas arruelas paralelas fixas, para introdução do bico do bebedouro recobertas com maravalha sob condições de ciclo 12h luz/escuro, temperatura ambiente controlada de 22°C (±2°C) e constante ventilação, recebendo ração padrão (50% carboidrato, 22% proteína e 4% lipídio) e água “*ad libitum*”. As caixas em que os animais DM1 estavam situados foram trocadas diariamente, pois este modelo faz com que a micção e defecação dos animais

umentem consideravelmente. As trocas foram realizadas pela pesquisadora responsável por este projeto e equipe devidamente treinada e apta para tal. A fim de realizar a habituação dos animais à pesquisadora responsável, foi realizado *handling* nos ratos 7 dias antes da data de início de experimentação, cumprindo o item 3.1.4 da resolução normativa nº 25 do CONCEA.

### **Indução de modelo de DM1**

Ratos Wistar machos de 30 dias de idade foram submetidos a uma injeção de STZ (70 mg/Kg de peso corporal) ou de veículo (tampão citrato 0,1 M pH 4,5) ambas com volume aproximado de 400 µL administrados por via intraperitoneal (IP) após 12 horas em jejum. Dois dias após a injeção, foi confirmado o DM1 através da mensuração da glicemia por meio de punção caudal usando um glicosímetro digital (AccuChek Active, Roche Diagnostics, USA), este procedimento se repetiu uma vez por semana ao longo do experimento. Os ratos foram considerados diabéticos quando sua glicemia estava acima de 250 mg/dL ou 13,88 mmol/L no estado alimentado (Shehata et al., 2017). Os animais que não desenvolveram DM1 foram submetidos a uma segunda dose de mesma concentração de STZ. Neste experimento também se verificou que 15% dos ratos jovens submetidos a esse modelo de DM1 não ficaram diabéticos.

### **Teste de memória, aprendizado e atividade locomotora**

Esses ratos passaram por uma avaliação de declínio cognitivo 4 semanas após confirmação do DM1, conforme figura 1, através das tarefas comportamentais de Campo Aberto seguido de Teste de Reconhecimento de Objetos (RO) e Morris Water Maze (MWM). Estes testes foram realizados para avaliar atividade locomotora, memória espacial e de aprendizado dos animais.

### **Teste de Reconhecimento de Objetos**

A atividade neural constante que surge de sinais nervosos causados por uma memória temporária pode criar uma “memória de curto prazo”. Já a “memória de longo prazo” é criada por alterações estruturais nas sinapses neuronais. Nesse contexto, o hipocampo e, em menor grau, o tálamo são responsáveis por resguardar as memórias adquiridas (Saedi et al., 2016). Por isso, escolhemos o teste de

reconhecimento de objetos para avaliar as memórias de curto e longo prazo dos animais em nosso estudo.

Esse teste ocorre em três dias. No primeiro deles realizou-se o treino do animal e adequação ao ambiente em que foi testado, também conhecido como teste do campo aberto (*open field*). Nesse treino o animal foi colocado cuidadosamente no quadrante do canto posterior esquerdo do aparato, no qual foi deixado para explorar o ambiente por 10 minutos. O primeiro dia é utilizado como habituação do animal.

No segundo dia o animal foi recolocado no aparato, em que se colocaram dois objetos iguais: Objeto A e objeto B (com formas, tamanhos e cores iguais). Contou-se o tempo que o animal explorou cada objeto (A e B) no período de 5 minutos. No mesmo dia, 1 hora após, avaliou-se a memória de curta duração, onde o animal explorou novamente o ambiente na presença do primeiro objeto familiar (objeto A) e o novo objeto (objeto C), contou-se novamente o tempo total que o animal explorou cada objeto (De Lima et al., 2005).

No dia seguinte (24 horas após), avaliou-se a memória de longa duração em que fizemos o mesmo procedimento trocando o objeto C pelo objeto D (diferente do objeto A e B), então, contou-se o tempo de exploração de cada objeto por cada animal dentro do período de 5 minutos. Esta tarefa cognitiva foi capaz de avaliar as memórias de curta e longa duração. Além disso, com esse teste podemos inferir a capacidade de memória espacial dos animais. A função cognitiva dos ratos foi medida pelo índice de discriminação [= (tempo de exploração do objeto novo - tempo de exploração do objeto velho) / tempo total de exploração × 100%] (Zou et al., 2017).

### ***Morris Water Maze***

O aparato necessário para realizar o teste de MWM consiste em uma piscina circular (180 cm de diâmetro, 60 cm de altura) cheia de água (profundidade de 30 cm; 25 ± 1°C), alocada em uma sala com sugestões espaciais localizadas de forma consistente. Uma plataforma de escape (10 cm de diâmetro) foi colocada no meio de um dos quadrantes 2 cm abaixo da superfície da água, equidistante da parede lateral e do meio da piscina. A plataforma fornecerá a única saída da água e ficará no mesmo quadrante a cada tentativa.

Quatro posições iniciais diferentes foram igualmente espaçadas ao redor do perímetro da piscina. Colocamos os ratos por quatro tentativas (uma vez de cada posição inicial) por sessão, durante 5 dias, onde cada tentativa teve um tempo limite de 120 segundos e tempo de permanência na plataforma de 15 segundos. Quando o animal não encontrou a plataforma ele foi delicadamente conduzido até ela ao término do período. O intervalo entre os treinos foi de 10 minutos. Após cada treino, secamos os ratos e retornamos eles às suas caixas-moradia ao final da sessão.

Após a última sessão de treinamento, submetemos os ratos a uma sessão de teste. Antes desta sessão, a plataforma submersa foi removida. O teste de retenção é um dos testes que é aplicado neste dia e consiste em colocar os animais na água por 60 segundos analisando, assim, quanto tempo eles ficaram no quadrante em que se situava a plataforma. Da mesma maneira, também mediu-se o tempo de latência que os animais demoraram para encontrar a plataforma, sendo condicionante que pelo menos o focinho e parte do corpo do animal passe por cima da sombra da mesma (dos Santos et al., 2017). Essa tarefa comportamental nos permitiu avaliar a memória espacial, de trabalho e memória de aprendizado dos animais.

## **Eutanásia**

Para coleta de amostras, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), somando aproximadamente 200  $\mu$ L de volume injetado conforme o peso de cada animal. Retirou-se cerca de 30  $\mu$ L de líquido cefalorraquidiano dos animais com agulhas de insulina de 1 mL através de punção da área de Bregma. Também se extraiu sangue dos animais através de punção cardíaca do ventrículo esquerdo com agulhas de 3 mL. Em seguida, os animais foram eutanasiados por decapitação com lâminas afiadas em uma guilhotina apropriada por um operador com habilidade e experiência para realizar este procedimento. O cérebro dos animais foi dissecado e o hipocampo retirado e inserido em aparelho fatiador tecidual (McIlwain Tissue Chopper <sup>®</sup>) para obtenção de fatias de 300  $\mu$ m. Obteve-se o soro através de centrifugação do sangue coletado. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C para a realização das análises bioquímicas.

### **Análise de marcadores astrocitários e função astrocitária**

Mediu-se a enzima glutamina sintetase (GS) através da técnica de cinética enzimática. Para esta técnica, fatias de hipocampo foram homogeneizadas em 50 mM de tampão de imidazol. Os homogenatos, então, incubados com (mM): 50 imidazol, 50 de hidroxilamina, 100 de L-glutamina, 25 arsenato de sódio dibásico hepta-hidratado, 0,2 ADP, 2 cloreto de manganês, pH 6,2 durante 15 min a 37°C. As reações se encerraram com a adição de 0,2 mL de 0,37 M de FeCl<sub>3</sub>, 200 mM ácido tricloroacético e 670 mM HCl. Após centrifugação, a partir do sobrenadante mediu-se a absorvância a 530 nm. Os valores foram calculados a partir de curva padrão (0,1 a 10 mmol/mL) de ácido  $\gamma$ -glutamil hidroxamato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. EUA) (Minet et al., 1997). Essas técnicas foram acompanhadas de dosagem de proteínas totais de acordo com o método padronizado por Lowry et al. (1951) utilizando albumina bovina como padrão.

No hipocampo, medimos também os níveis de proteína fibrilar astrogliar (GFAP) através da técnica de *Western blotting*.

### **Análise de marcadores de neuroinflamação**

No hipocampo, medimos os níveis de TNF- $\alpha$  através de kit de detecção pela técnica de ELISA sanduíche. Esta técnica imunoenzimática permite a detecção específica de epítopos das proteínas de interesse, o que possibilita a imunoquantificação das citocinas. Para sua realização, selecionamos fatias hipocampais que foram homogeneizadas e preparadas em PBS (mM) (50 NaCl, 18 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 83 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, pH 7,4), contendo 1 mM de EGTA e 1 mM de PMSF, seguido de centrifugação a 10000  $\times$  g por 5 minutos a 4°C. Este ensaio foi realizado em 100  $\mu$ L de sobrenadante, usando kit de ELISA TNF- $\alpha$  de acordo com as especificações do protocolo do fabricante (eBioscience San Diego, EUA).

O receptor do tipo Toll 4 (TLR4) e fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ) foram avaliados através da técnica de *Western blotting*.

### **Análise de marcadores de estresse oxidativo e detoxificação do metilglioal**

No hipocampo, dosou-se o conteúdo de glutathiona (GSH), um antioxidante não enzimático. Para isso, as fatias de hipocampo foram homogeneizadas em tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) e a proteína precipitada com 1,7% de

ácido metafosfórico. Adicionou-se O-ftaldialdeído (1 mg/mL de metanol) ao sobrenadante à temperatura ambiente durante 15 min. Mediu-se a fluorescência em comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. Os valores foram calculados a partir de curva padrão de glutathione (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. EUA). O conteúdo de GSH foi expresso em pmol/mg (Allen et al., 2001). Avaliou-se as espécies reativas totais de oxigênio Diclorodihidrofluoresceína (DCF) por meio de fluorescência (Wang & Roper, 2014). A atividade da Glioxalase 1 (GLO-1) foi determinada conforme descrito em Mannervik et al. (1981) com algumas modificações. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços usando um espectrofotômetro de microplacas (UV Star, Greiner). A mistura de reação (200 µL/poço) continha 50 mM de tampão de fosfato de sódio (pH 7,2), 2 mM de MG e 1 mM de GSH. A proteína da amostra (10–20 µg por poço) foi adicionada ao tampão. A formação de S-(D)-lactoilglutathione foi linear e monitorada a 240 nm por 15 min a 25 °C. Uma unidade de atividade da GLO-1 é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de S-(D)-lactoilglutathione por minuto. A atividade específica foi calculada e expressa como mU/mg de proteína.

### **Análise de marcadores neuronais**

No hipocampo, medimos os níveis de expressão de proteína β-amiloide, proteína nuclear neuronal (NeuN) e acetilcolintransferase (ChAT) através da técnica de *Western Blotting*.

### **Descrição da técnica de *Western Blotting***

A técnica de *Western Blotting* utiliza um método de separação de proteínas por peso molecular através de eletroforese em gel de poliacrilamida, seguida de imunodeteção e revelação por quimioluminescência da proteína a ser estudada.

As fatias cerebrais foram homogeneizadas em tampão desnaturante (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 5% mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,002% azul de bromofenol). Após, aplicou-se no gel SDS-poliacrilamida (20 µg de proteína de cada amostras) com concentração de 12% para separação através de eletroforese, seguida da transferência das amostras do gel para membrana de nitrocelulose. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com solução 1% BSA-TBS. Após incubação por 1h em temperatura ambiente com o anticorpos primários (anti-TGFβ,

anti-Neu-N, anti- $\beta$ -amiloide, anti-ChAT, anti-GFAP, anti-TLR4 e anti- $\beta$ -actina em diluição de 1:1000), as membranas foram lavadas e incubadas com hospedeiros anti-camundongo, anti-cabra ou anti-coelho imunoglobulina (IgG) conjugada a peroxidase (Santa Cruz Biotecnologia, Inc ®; Diluição 1:10000). O sinal de quimioluminescência foi detectado usando um kit de detecção ECL *Western Blotting* e capturado usando equipamento ImageQuant LAS400 (GE) (Zanotto et al., 2018).

### **Análise de marcadores de Diabetes Mellitus, hipercolesterolemia e função hepática e renal**

No soro dos animais, por espectrofotometria óptica, avaliou-se o nível de glicose. E também mensuração da glicemia por meio de punção caudal usando um glicosímetro digital (AccuChek Active, Roche Diagnostics, USA), foram considerados diabéticos os animais com glicemia superior a 250 mg/dL.

Também se avaliou os níveis de colesterol total e triglicerídeos, as enzimas transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), assim como, creatinina, ureia e ácido úrico por meio de kit comercial (Bioclin).

### **Análises estatísticas**

Os dados de dosagens bioquímicas séricas e por kit ELISA foram calculados com a média  $\pm$  erro padrão, seguidos pelo teste “t Student” não pareado para comparar as duas amostras (Sham e DM).

A glicemia e massa corporal dos animais foram calculadas a partir do teste de ANOVA de medidas repetidas, tendo sido coletadas semanalmente por 4 semanas.

Os dados resultantes do teste de MWM foram calculados com a média  $\pm$  erro padrão utilizando o teste de ANOVA de medidas repetidas para os dias de treino e teste “t Student” não pareado para o cálculo estatístico do teste final.

Os dados do teste de RO foram calculados com a fórmula padrão do índice de discriminação [= (tempo de exploração do objeto novo - tempo de exploração do objeto velho) / tempo total de exploração  $\times$  100%] e após, teste “t Student” não pareado. Além disso, o teste de ANOVA de duas vias foi utilizado para calcular os dados obtidos do cruzamento entre quadrantes do teste de campo aberto.

Os dados de densidade da técnica de Western Blotting foram mensurados através do programa ImageJ 1.53k e calculados com a média  $\pm$  erro padrão, seguidos pelo teste “t Student” não pareado para comparar as duas amostras.

As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas usando Prism 9.4 (GraphPad).

## Resultados

### Caracterização do modelo de DM1

Constatamos que os animais tratados com STZ evidenciaram um aumento da glicemia (figura 2.  $P < 0,0001$ ) e perda de peso (figura 3.  $P < 0,0004$ ) em relação aos animais controle ao longo das 4 semanas de experimentação. Esses dados caracterizam o *Diabetes Mellitus* tipo 1 dos animais jovens induzidos por injeção de 70 mg/Kg de STZ IP.

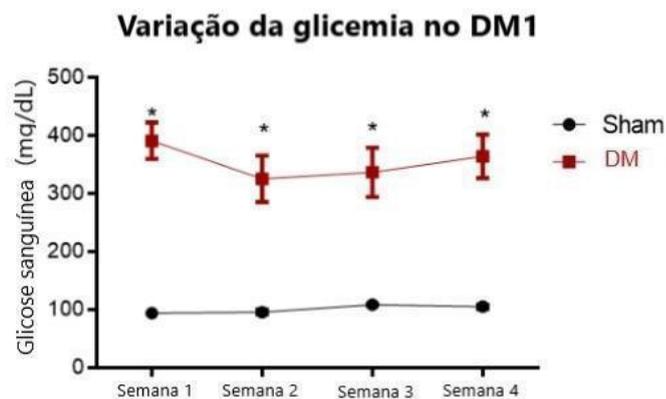


Figura 2: Variação da glicemia em ratos Wistar jovens com DM1. Aumento da glicemia ao longo das semanas nos ratos diabéticos. (Glicemia  $P < 0,0001$ )

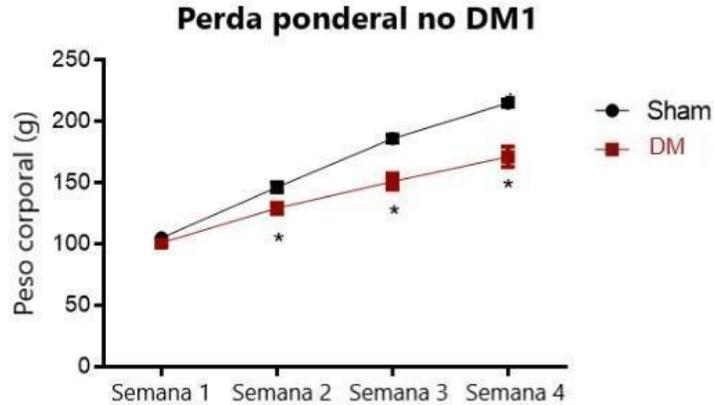


Figura 3: Perda ponderal ao longo das semanas de ratos Wistar jovens com DM1. Diminuição do peso dos ratos diabéticos. (Peso  $P < 0,0004$ )

### Glicemia e lactemia

A fim de mensurar a glicemia (figura 4,  $P = 0,0001$ ) e a lactemia (figura 5,  $P = 0,0550$ ) dos animais e corroborar com os resultados indicados pelas medidas de glicemia ao longo das semanas de experimentação, realizamos os testes bioquímicos de glicemia e lactemia por meio de kit comercial. Com isso, verificamos na figura 4 o aumento dos níveis de glicose dos animais diabéticos em relação aos controle, assim como foi verificado ao longo das semanas com glicosímetro digital. No entanto, a lactemia dos animais não foi significativamente alterada, porém, há uma tendência ao aumento da concentração de lactato ( $P = 0,0550$ ) nos animais diabéticos em relação aos controle.

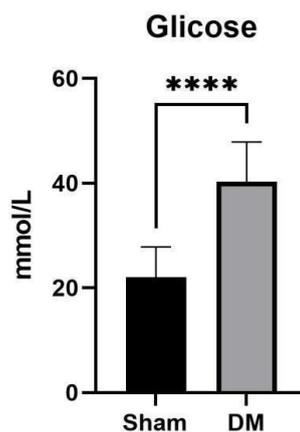


Figura 4: Hiperglicemia em ratos Wistar jovens com DM1. Aumento da glicemia dos ratos diabéticos. (Glicemia  $P = 0,0001$ )

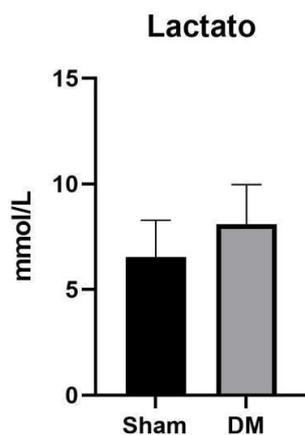


Figura 5: Tendência à hiperlactemia de ratos Wistar jovens com DM1. Tendência ao aumento do lactato sanguíneo de ratos diabéticos. (Lactemia  $P=0,0550$ )

### Transaminasemia e catabólitos nitrogenados

Em nosso trabalho observamos aumento da concentração das enzimas TGO (figura 6A,  $P= 0,0481$ ) e TGP (figura 6B,  $P= 0,0112$ ) no soro dos animais diabéticos quando comparados aos controles.

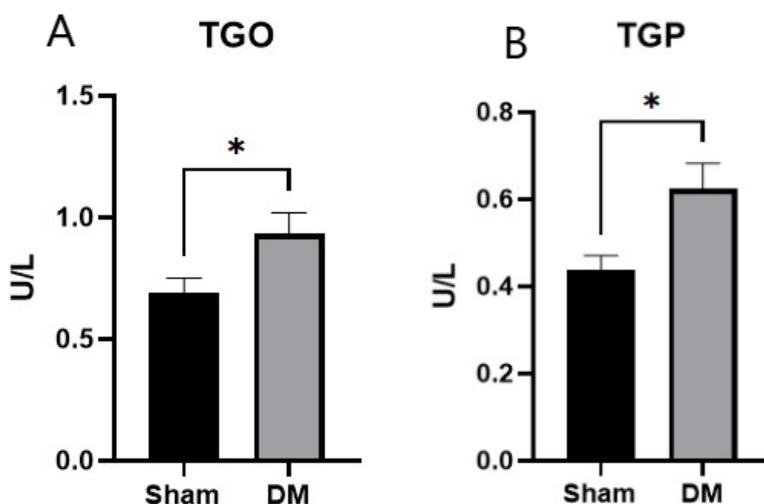


Figura 6: Transaminasemia sanguínea de ratos Wistar jovens com DM1. (a) Aumento de TGO; (b) Aumento de TGP nos ratos diabéticos. (TGO  $P=0,0481$ ; TGP  $P=0,0112$ )

Observamos o aumento dos níveis séricos de ácido úrico e ureia (figura 7B e C,  $P=0,0499$ ;  $P= 0,0400$ , respectivamente) nos animais diabéticos em relação aos controles, o que pode ser inferido como uma sobrecarga renal nos animais diabéticos. Além disso, foi observada a redução dos níveis de creatinina (figura 7A,

P= 0,0033) nos animais diabéticos em relação aos controles, sugerindo que os animais diabéticos possam estar em processo de desnutrição comparado aos animais controle.

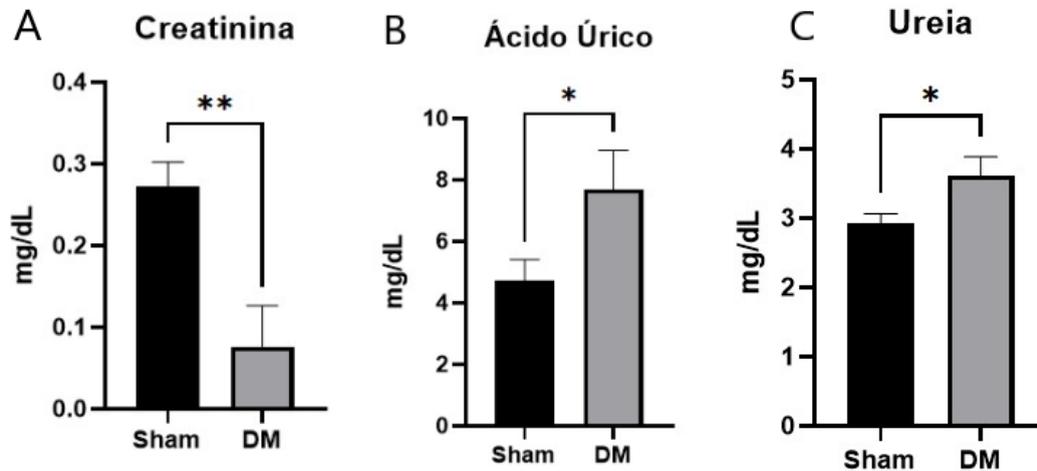


Figura 7: Alterações de metabólitos nitrogenados no soro de ratos Wistar jovens com DM1. (a) Diminuição da Creatinina; (b) Aumento do Ácido úrico; (c) Aumento de Ureia nos ratos diabéticos. (Creatinina P= 0,0033; Ácido Úrico P= 0,0499; Ureia P= 0,0400)

## Lipidemia

As concentrações de triglicerídeos e colesterol (figura 8 A e B, P=0,0388 e P=0,0370, respectivamente) foram encontradas elevadas nos ratos diabéticos em relação aos animais controle, indicando hipercolesterolemia nos animais com DM1.

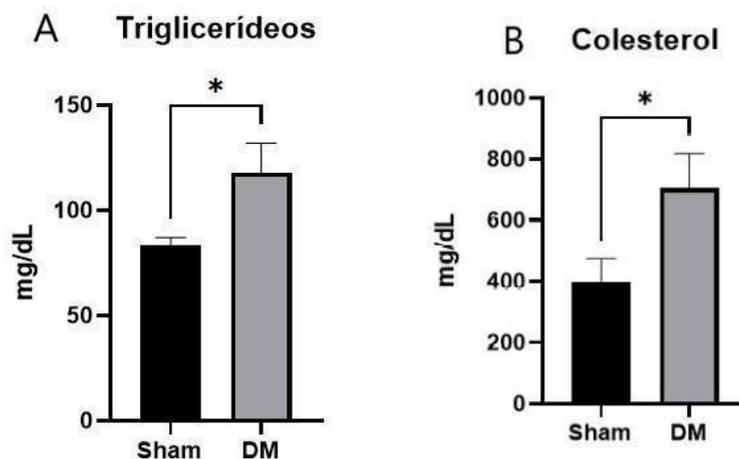


Figura 8: Dislipidemia sanguínea em ratos jovens diabéticos. (a) Aumento de triglicerídeos; (b) Aumento de colesterol nos ratos diabéticos. (Triglicerídeos P= 0,0388; Colesterol P=0,0370)

## Processo inflamatório periférico e central

Os níveis elevados de TNF- $\alpha$  são indicadores de inflamação, pois esta é uma citocina pró-inflamatória encontrada tanto no SNC como em órgãos periféricos (Glaser et al., 2022). Em nossos dados observamos uma quantidade aumentada de TNF- $\alpha$  no hipocampo (figura 9A,  $P= 0,0264$ ), assim como no soro (figura 9B,  $P= 0,0196$ ) de ratos diabéticos em relação aos controle.

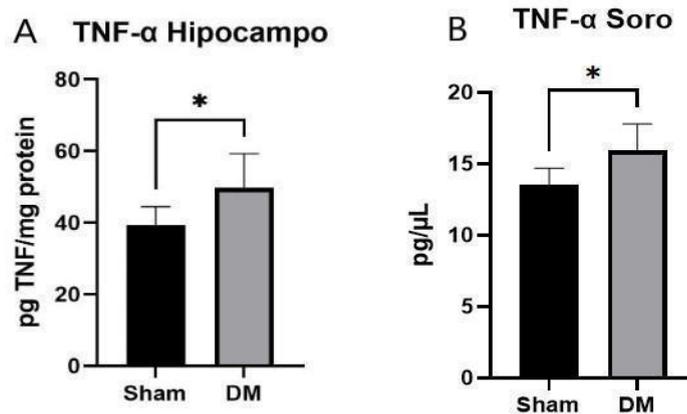


Figura 9: Processo inflamatório ativo no hipocampo e soro de ratos Wistar jovens com DM1. (a) Aumento de TNF- $\alpha$  no hipocampo e (b) no soro dos ratos diabéticos nos ratos diabéticos. (TNF- $\alpha$  Hipocampo  $P= 0,0264$ ; TNF- $\alpha$  Soro  $P= 0,0196$ )

Encontramos em nossos dados o aumento da expressão de TLR4 (figura 10,  $P=0,0395$ ) no hipocampo dos ratos diabéticos quando comparados aos animais controle.

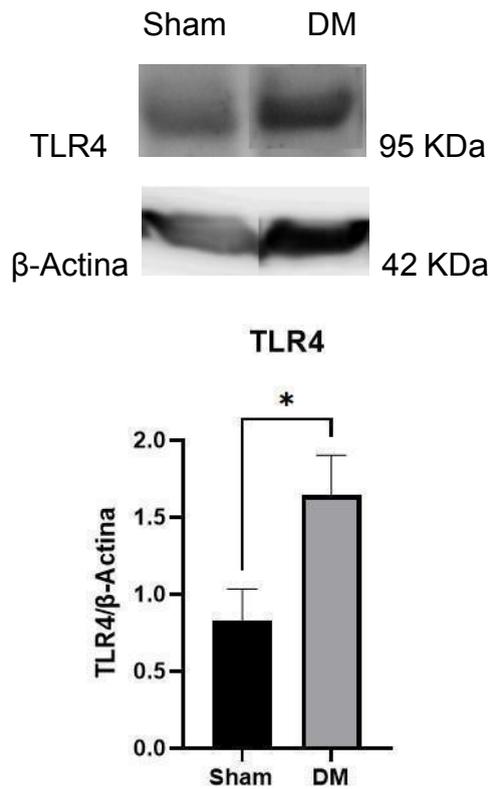


Figura 10: Neuroinflamação hipocampal mediada por TLR4 em ratos Wistar jovens com DM1. Aumento da expressão de TLR4 nos ratos diabéticos. (TLR4 P= 0,0395)

### Alterações comportamentais no modelo de DM1

O teste de Campo Aberto avalia a atividade locomotora dos animais em experimentação, sendo eles colocados em um aparato para locomover-se livremente. Como resultado desse teste de campo aberto (figura 11), constatamos que a atividade locomotora dos animais diabéticos foi prejudicada ao verificarmos o menor tempo de exploração desses animais em relação ao controle (Fig 11A, P=0,0389).

Além de menor atividade exploratória, os animais diabéticos ficaram mais expostos ao centro do aparato que os Sham (Figura 11C, Sham P=0,001, DM P=0,01), visto na diferença de cruzamentos entre quadrantes, em que os os animais controle fizeram menos cruzamentos (Figura 11D, P=0,0475).

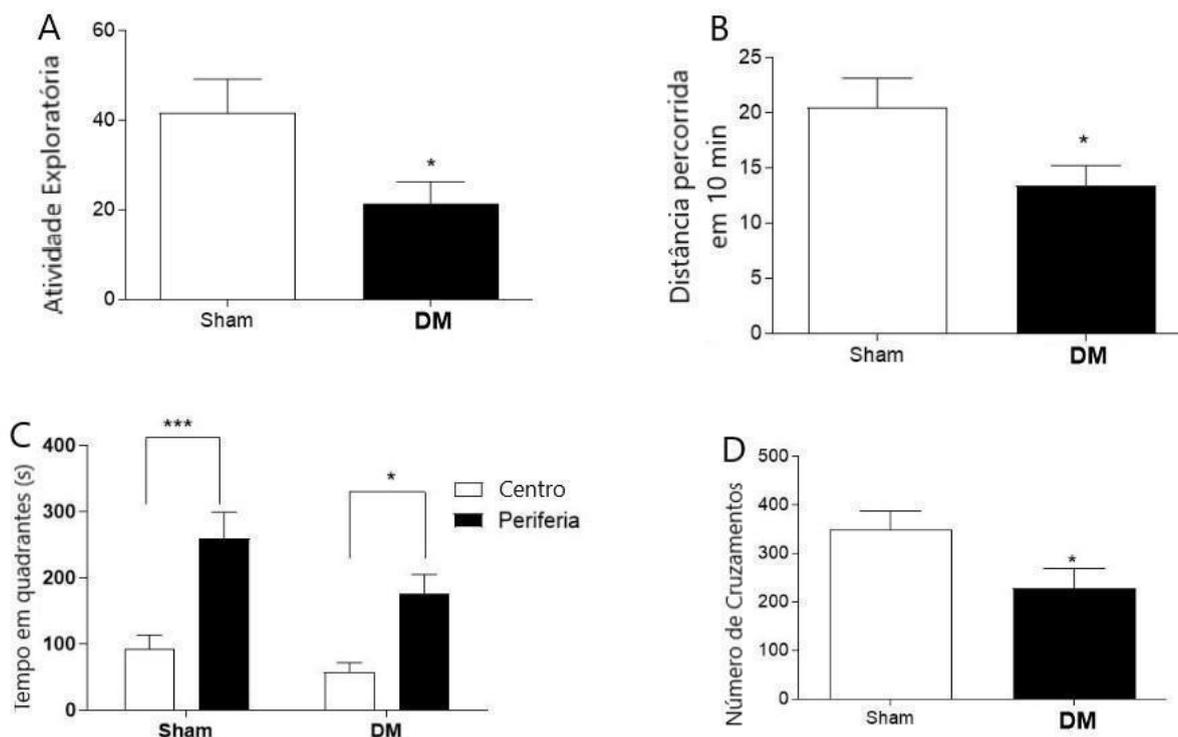


Figura 11: Prejuízo da atividade exploratória de ratos Wistar jovens com DM1. (a) Diminuição da atividade exploratória; (b) Diminuição da distância percorrida; (c) Maior tempo no centro e menor tempo na periferia do aparato; (d) Diminuição dos cruzamentos entre quadrantes dos ratos diabéticos. (Atividade exploratória  $P=0,0389$ ; Distância percorrida  $P=0,0389$ ; Tempo em quadrantes Centro x Periferia Sham  $P<0,001$ , DM  $P<0,01$ ; Número de cruzamentos  $P=0,0475$ )

No teste de reconhecimento de objetos é possível ver que tanto no teste de 1 hora (Figura 12A,  $P=0,0210$ ) quanto no teste de 24 horas (Figura 12B,  $P=0,0250$ ) os animais diabéticos exploraram menos os novos objetos que os animais controles. Isso indica que houve um prejuízo na memória de curto e longo prazo, pois os ratos diabéticos exploraram menos tempo o objeto novo no teste de 1 hora e, da mesma maneira, exploraram menos tempo o objeto novo no teste de 24 horas.

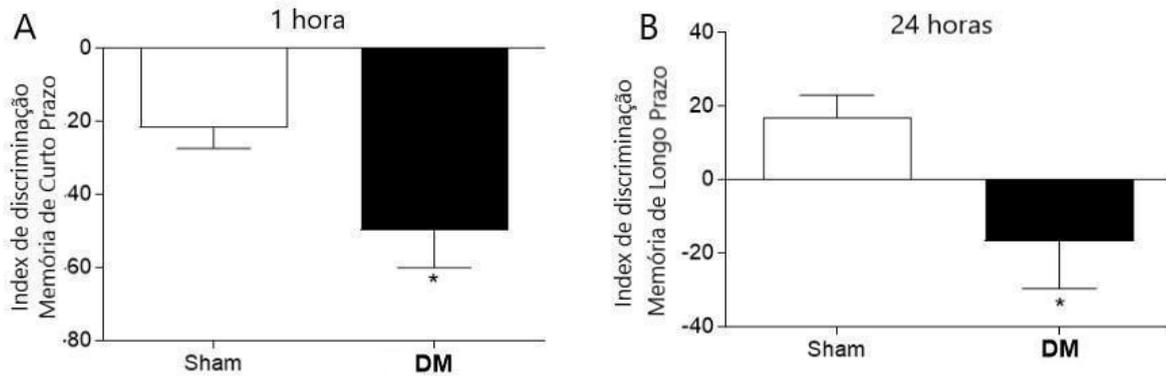


Figura 12: Prejuízo na memória de curto e longo prazo de ratos Wistar jovens com DM1. (a) Menor tempo de exploração em 1h; (b) Menor tempo de exploração em 24h dos ratos diabéticos. (RO 1h P=0,0210; RO 24h P=0,0250)

No teste de *Morris Water Maze*, o período de treino avalia a aprendizagem dos animais ao longo dos dias e o teste final avalia a memória de trabalho e memória espacial dos animais. Como resultado deste experimento, percebemos que os animais diabéticos demoraram mais para encontrar a plataforma ao longo dos dias do treino, principalmente no quinto dia (figura 13B,  $P < 0,0001$ ). Dessa forma, é constatado uma dificuldade de aprendizagem dos animais diabéticos em relação aos controles durante o treino, assim como no teste final (figura 13 A,  $P = 0,0010$ ), que nos permite verificar um declínio na memória de trabalho e espacial dos animais diabéticos em relação aos animais controles.

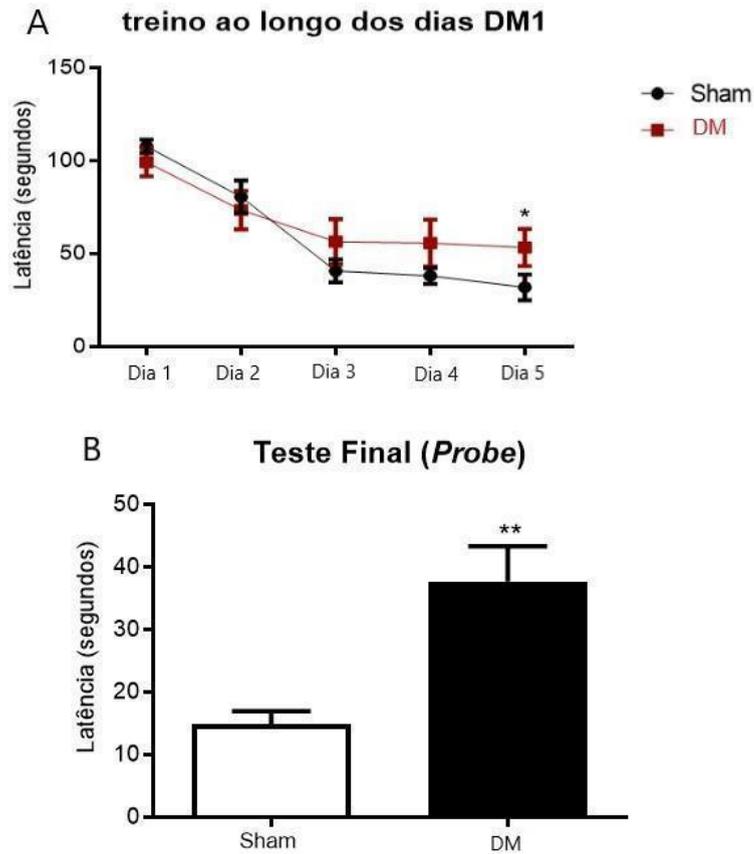


Figura 13: Prejuízo na aprendizagem e na memória espacial de ratos Wistar jovens com DM1. (a) Maior tempo de latência no 5º dia de treino; (b) Maior tempo de latência no teste final dos ratos diabéticos. (Treino  $P < 0,0001$ . Probe  $P = 0,0010$ )

### Dano neuronal hipocampal

Em nossa pesquisa encontramos uma redução dos índices dos marcadores neuronais ChAT e NeuN (figura 14 A e B,  $P = 0,0350$  e  $P = 0,0261$ , respectivamente) no hipocampo de ratos diabéticos em relação aos controles.

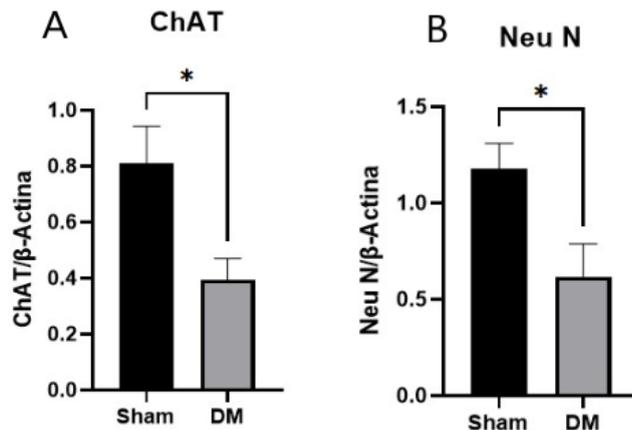
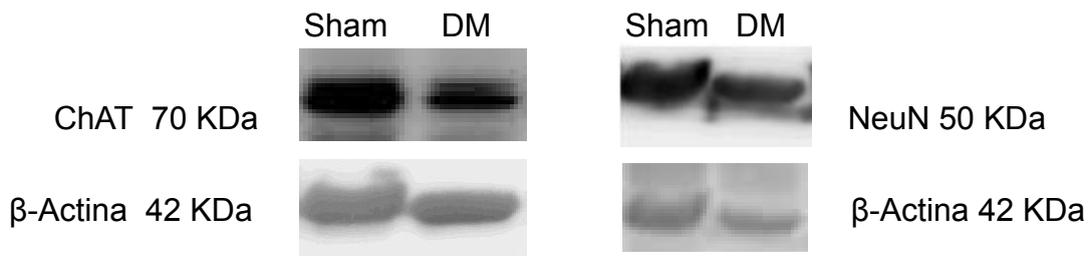


Figura 14: Morte neuronal em ratos Wistar jovens com DM1. (a) Diminuição de ChAT; (b) Diminuição de NeuN nos ratos diabéticos. (ChAT  $P=0,0350$ ; NeuN  $P=0,0261$ )

Foi observado o aumento do nível de expressão da proteína TGF $\beta$  (figura 15,  $P= 0,0066$ ) no hipocampo de ratos diabéticos comparado aos ratos controle.

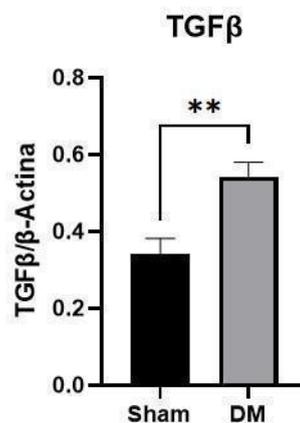
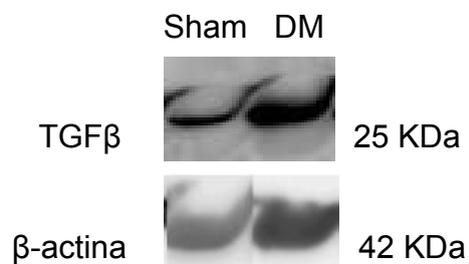


Figura 15: Prejuízo na plasticidade sináptica de ratos Wistar jovens com DM1. Aumento da expressão de TGF $\beta$  nos ratos diabéticos. ( $P=0,0066$ )

Presenciamos a tendência ao aumento da expressão de  $\beta$ -amiloide (figura 16,  $P=0,3703$ ) no hipocampo dos ratos diabéticos em comparação aos animais controle.

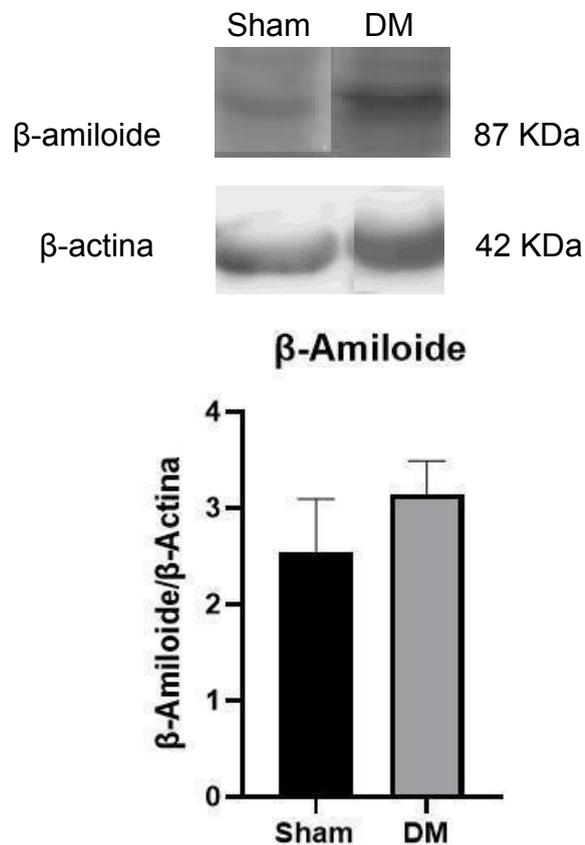


Figura 16: Tendência à formação de placas  $\beta$ -amiloides no hipocampo de ratos Wistar jovens com DM1. Tendência ao aumento da expressão de  $\beta$ -amiloide nos ratos diabéticos. ( $\beta$ -amiloide  $P=0,3703$ )

### Reatividade e Prejuízo no Metabolismo glutamatérgico astrocitário hipocampal

Observamos o aumento da expressão de GFAP (figura 17,  $P=0,0112$ ) no tecido hipocampal dos ratos jovens com DM1 comparado aos ratos controle. Esse aumento indica a presença de reatividade astrocitária como resposta ao dano infringido pelo DM1.

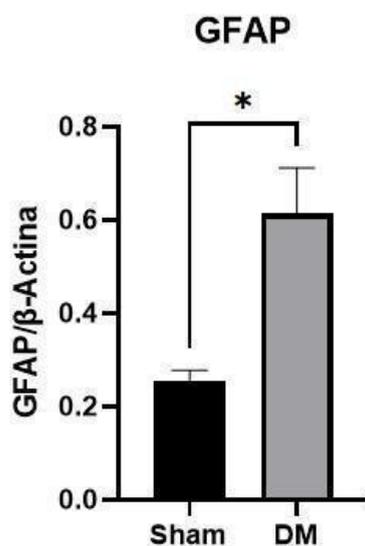
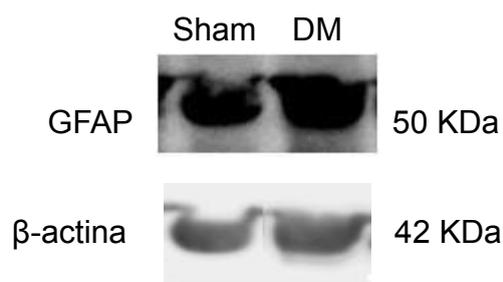


Figura 17: Reatividade astrocítaria hipocampal em ratos Wistar jovens com DM1. Aumento da expressão de GFAP nos ratos diabéticos. (GFAP P=0,0112)

Avaliamos a Glutamina Sintetase (GS) (figura 18, P= 0,0174) que apresentou uma redução de sua atividade no hipocampo de ratos diabéticos em relação aos controles.

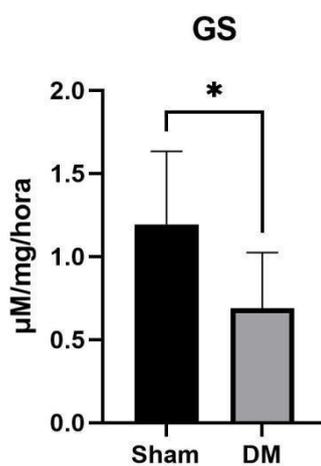


Figura 18: Prejuízo no metabolismo glutamatérgico astrocítario hipocampal em ratos Wistar jovens com DM1. Diminuição da atividade da GS nos ratos diabéticos. (GS P=0,0174)

## Estresse oxidativo e Detoxificação do Metilglioal no Hipocampo

Como vemos em nossos resultados, os animais diabéticos apresentaram maiores concentrações de Glioalase 1 (GLO1) e DCF (figura 19 A e B,  $P=0,0033$  e  $P=0,0259$ , respectivamente) que os animais controle. Enquanto que os níveis de Glutathiona (GSH) (figura 19 C,  $P=0,0405$ ) aparecem reduzidos nos animais diabéticos em relação aos animais controle.

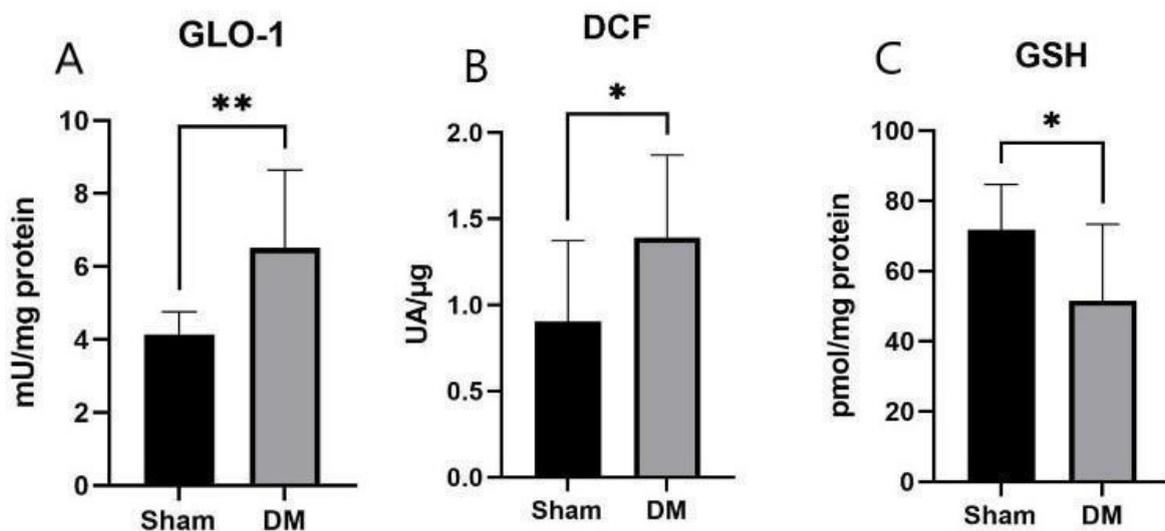


Figura 19: Estresse oxidativo e intoxicação por metilglioal hipocampal em ratos Wistar jovens com DM1. (a) Aumento de GLO-1; (b) Aumento de DCF; (c) Diminuição de GSH nos ratos diabéticos. (GLO-1  $P=0.0033$ ; DCF  $P=0,0259$ ; GSH  $P=0,0405$ )

## Discussão

### Caracterização do modelo de DM1

Em geral, em modelos de indução de DM1 em ratos apresentam-se com animais em torno de 8 a 10 semanas de idade, o que corresponde a animais adultos jovens, utilizando uma dosagem de 50 a 100 mg/Kg, pois a dose de STZ varia conforme o peso e idade dos animais (Furman, 2015; Simas, 2020). Nesses animais adultos, ocorre a hiperglicemia a partir do segundo dia após a indução do DM1, assim como em nosso modelo. Porém a glicemia fica estável em 300 mg/dL, mesmo mensurada 120 dias, equivalente a 4 meses, após a primeira injeção de STZ (Furman, 2015). Em nosso trabalho, observamos que a glicemia dos ratos Wistar jovens em 4 semanas após a indução do modelo, equivalente a 1 mês de

experimentação, ultrapassou esse limite, apresentando mais de 350 mg/dL de glicose sanguínea.

Assim como em nosso trabalho, a literatura (Robert et al., 2001; Oliveira et al., 2013; Shivanna et al., 2013) mostra que em modelos de DM1 induzidos por injeção de STZ em ratos adultos os animais diabéticos apresentam um menor peso corporal comparado aos controle. Em estudo de Shivanna et al. (2013) com ratos Wistar adultos de 3 meses de idade revela que em uma semana após indução do modelo de STZ a perda ponderal foi de 22%. Em nosso estudo, realizado com ratos jovens de 30 dias de idade, em plena fase de crescimento, percebemos que os animais ganharam peso, mas menos que os animais controle. Isso se dá, por conta do estado catabólico de um desequilíbrio do controle glicêmico. Nessas condições, os processos metabólicos aumentam. Essa perda ponderal é causada pela perda de tecido adiposo e muscular, que é conhecido como caquexia. Os tecidos adiposo e muscular precisam de sinalização de insulina para captação de glicose. Quando sem insulina, esses tecidos apresentam uma redução significativa da captação de glicose que compromete seu metabolismo geral (Gomes et al., 2017). Da mesma maneira, a lipólise e a degradação oxidativa de aminoácidos degradam as maiores reservas de energia e tecidos do organismo, diminuindo o peso corporal dos ratos diabéticos (Oliveira et al., 2013).

### **Glicemia e lactemia**

Já é bem estabelecido que a hiperglicemia é prejudicial ao organismo como um todo, mas principalmente e especificamente no encéfalo que é altamente suscetível a variações dos níveis de glicose. No SNC os neurônios aproveitam a glicose captada pelos astrócitos e os reservatórios de lactato que são formados a partir da glicose remanescente (González-Reyes, 2016). Há uma disfunção na função das células do SNC em metabolizar esse excesso de glicose circulante, levando a hiperglicemia no SNC e conseqüente prejuízo cognitivo e na formação da memória (González-Reyes, 2016). Dessa forma, corroborando com os dados obtidos através dos testes comportamentais em que presenciamos o declínio cognitivo dos animais diabéticos em relação aos controles.

Não dosamos corpos cetônicos neste trabalho, mas dados da literatura mostram aumento da cetonemia e aumento de corpos cetônicos no encéfalo de animais com DM (Isales et al., 1999). Aumento dos níveis de hidroxibutirato e

acetoacetato, que cruzam a barreira hemato encefálica (BHE) por meio de um sistema de transporte de ácido monocarboxílico, que é influenciado pelo aumento dos corpos cetônicos sanguíneos (Isales et al., 1999). Um achado interessante de Kreis & Ross (1992) nos sugere que o transporte de corpos cetônicos encefálico se encontra mais aumentado em indivíduos jovens no período de jejum quando comparados a adultos neste mesmo período. Do mesmo modo em estudos (Mediani et al., 2018) com soro de animais diabéticos, foi encontrado um aumento dos níveis de corpos cetônicos, pois a sua síntese e utilização também se encontra aumentada (Mediani et al., 2018).

Em estudo prévio, constatou-se um aumento da expressão da enzima Piruvato Cinase Desidrogenase 1 (PDK1), que é responsável pela fosforilação de outras enzimas, desencadeado pela sinalização intracelular ativada por receptores de insulina de membrana (Nomoto et. al, 2021). Com esse aumento de expressão, os autores consideraram que o piruvato produzido pela glicólise é direcionado para a geração de lactato através da enzima Lactato Desidrogenase A (LDHA), em vez do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). O que consiste numa reorganização do metabolismo das células beta pancreáticas para aumentar sua resiliência contra o dano causado pelas citocinas pró-inflamatórias.

### **Transaminasemia e catabólitos nitrogenados**

O aumento da concentração das enzimas transaminases no soro dos animais é compatível com a literatura (Shivanna et al., 2013; Gomes et al., 2017; Xie et al., 2018; Zeng et al., 2021; El-Sawah et al., 2022) cujos animais diabéticos apresentaram maior concentração das enzimas TGO e TGP no soro. A maioria dos autores relaciona esse aumento com a doença hepática gordurosa não-alcoólica causada pelo DM devido ao acúmulo excessivo de ácidos graxos nas células hepáticas e sua forte associação com a hiperglicemia (Xie et al., 2018; Zeng et al., 2021). É bem caracterizado que esta doença é mais comum em pacientes com DM1 (Xie et al., 2018). Em modelo de DM1 de ratos adultos, autores (Xie et al., 2018; Zeng et al., 2021) observaram, em conformidade, alterações histopatológicas no fígado de ratos com a doença. Nesse órgão, foram claramente encontradas gotículas de gordura de tamanhos diferentes, além de a estrutura do lóbulo hepático ter sido destruída, vacúolos foram encontrados nos hepatócitos e infiltrações de células inflamatórias estavam presentes, inclusive observou-se hiperplasia das

fibras no tecido. Assim, confirmando a doença hepática gordurosa não-alcóolica nos ratos diabéticos.

Como muitos tipos de células renais são sensíveis à insulina, níveis muito altos de glicose no sangue podem causar nefropatia diabética resultando em disfunção renal grave. Além disso, os parâmetros encontrados são compatíveis com fibrose renal quando alterados marcadores de função renal como baixa creatinina, proteína sérica e alto ácido úrico (Gomes et al., 2017). Essas alterações renais ocorrem como consequência da hiperglicemia, que induz a formação de AGEs, superexpressão de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo (Gomes et al., 2017; El-Sawah., 2022).

Há estudos que confirmam nossos achados, pois demonstram que ocorre a hiperuricemia em decorrência do DM (Hovind et al., 2011). Nesses estudos, a nefropatia gerada pelo DM com altos índices de ácido úrico encontrados no soro de ratos pode levar a patologias dos vasos pré-glomerulares, prejuízo na autorregulação e hipertensão glomerular, assim como disfunção endotelial (Hovind et al., 2011).

Outros estudos porém relacionam o próprio DM como consequência de uma hiperuricemia não-controlada (Lima et al., 2012). Isto porque o aumento da concentração sanguínea de ácido úrico pode causar uma impermeabilidade nos tecidos à insulina que pode vir a interromper a entrada da glicose nas células (Lima et al., 2012).

Aumento dos níveis de ureia circulante na corrente sanguínea de ratos diabéticos também é confirmado em outros estudos na literatura (Gomes et al., 2017; Arigela et al., 2021; El-Sawah. et al., 2022). Esse índice elevado está associado à presença de doença renal crônica diabética que gera distúrbios como hipertrofia renal, posteriormente glomeruloesclerose, levando à perda da função renal e proteinúria (Arigela et al., 2021).

A creatinina dos animais diabéticos foi encontrada reduzida em relação aos controles em nosso estudo. Isso é confirmado na literatura (Inaba et al., 2010; Wu et al., 2012; SBN) como um marcador de desnutrição quando estes índices são encontrados reduzidos, além de apresentarem redução de massa muscular e doença renal prévia ocasionada pelo DM (Inaba et al., 2010).

Além desses indícios, há outras causas possíveis para ocorrência de aumento dos níveis séricos de ureia e ácido úrico e diminuição da creatinina sanguínea em estudos com Diabetes *Mellitus*.

### **Lipidemia**

O aumento nas concentrações sanguíneas de triglicerídeos e colesterol são encontrados em concordância com a literatura (Wu et al., 2012; Zhao et al., 2020), sendo associados a aterosclerose, doença ocasionada por inflamação das paredes dos vasos sanguíneos, sendo as artérias o principal foco de estudo no campo da cardiopatia relacionada ao DM, além de enrijecimento desses vasos e acúmulo de placas de gordura intravascular. Desta forma, causando infarto do miocárdio, angina, isquemia cardiovascular e cerebral, entre outras causas de morte de pacientes acometidos por DM (Wu et al., 2012; Zhao et al., 2020).

### **Inflamação periférica e central**

Já foi constatado em estudos prévios (Seke Etet, 2017; Rom et al., 2019) que a hiperglicemia no SNC leva a ativação do processo inflamatório e aumento de TNF- $\alpha$ , como consequência, ocorre o prejuízo cognitivo em roedores com DM1. No entanto, na literatura essa informação é controversa, pois alguns autores indicam que a inflamação tecidual é que leva ao desbalanço do metabolismo da glicose celular (Ruan et al., 2002).

Nós avaliamos a região hipocampal, mas várias áreas do cérebro são afetadas pela neuroinflamação usando TNF- $\alpha$  como marcador (Seke Etet, 2017). Podemos ver em outros estudos que no cerebelo, estriado, hipotálamo, amígdala, pedúnculo cerebral ocorre a neuroinflamação, o que nos permite ter certos indícios de que o processo inflamatório nessas regiões leva ao prejuízo cognitivo e motor (Seke Etet, 2017) como foi observado em nossos dados de comportamento comparando ratos diabéticos jovens com controles.

O aumento da concentração de TNF- $\alpha$  no soro indica que há processos inflamatórios ocorrendo em tecidos e órgãos periféricos dos organismos dos animais diabéticos (Zhao et al., 2020).

Este aumento se configura na incidência de neuroinflamação no tecido hipocampal, sabendo que TLR4 é um receptor ativado por conta da instauração de processo inflamatório no tecido (Prantner et al., 2020; Moreira et al., 2022). Além

disso, é considerado um marcador de dano cognitivo (Moreira et al., 2022), o que corrobora com as evidências demonstradas nos resultados dos testes comportamentais deste estudo.

### **Alterações comportamentais no modelo de DM1**

O teste de campo aberto também é usado para determinação do nível de ansiedade dos animais. Neste teste, os animais diabéticos apresentaram um comportamento ansioso. Essa medida qualitativa é percebida quando o animal fica muito tempo imóvel no aparato em que o teste é realizado. Situações em que isto ocorre são descritas como um “comportamento de desespero” (*despair behaviour*) dos animais (Wayhs et al., 2010; Cavalcanti et al., 2020). Essa menor atividade exploratória dos ratos diabéticos mimetiza corretamente achados na literatura (Shalimova et al., 2019) que indicam que humanos diabéticos apresentam pior desempenho em tarefas psicomotoras que não-diabéticos.

Os animais diabéticos ficaram mais tempo expostos ao centro do aparato que os animais controle. É dedutível essa informação, pois os animais intuitivamente se posicionam na periferia do aparato como modo de defesa ao se expor o menos possível. Essa habilidade fica debilitada nos animais com DM1, como podemos ver neste resultado (figura 11C, DM  $P=0,01$ ). Comportamentos ansiosos e redução da preocupação com o cuidado próprio como os encontrados neste trabalho podem estar relacionados à depressão. Sabe-se que os pacientes diabéticos são mais predispostos a esta condição quando apresentam complicações macro e microvasculares, o que tem sido associado, via de regra, a um maior declínio da função cognitiva no diabetes e a um menor motivação para o autocuidado (Shalimova et al., 2019). Inclusive, o prejuízo na plasticidade sináptica hipocampal prejudica a capacidade do cérebro de se adaptar e reorganizar importantes funções comportamentais e emocionais (Luna et al., 2021).

A maioria dos trabalhos na literatura nos informa sobre o declínio cognitivo avaliado pelo teste comportamental de Reconhecimento de Objetos em ratos com DM1 de dois a quatro meses de idade, considerados ratos adultos jovens e adultos maturos (De Senna et al., 2011, 2015; Wartchow et al., 2020; Rajizadeh et al., 2021). Esses trabalhos nos mostram em concordância com nosso estudo realizado com ratos com DM1 jovens que os animais diabéticos exploram menos, ou

demonstram ter menor interesse pelos objetos novos em relação aos ratos controle (De Senna et al., 2015).

Na literatura há muitos trabalhos publicados usando o MWM como principal teste comportamental para avaliação de desempenho cognitivo em ratos com DM1 (Grzęda & Wiśniewska, 2008; Zhou et al., 2018; Delkhosh-Kasmaie et al., 2018). Entretanto, esses trabalhos se referem a ratos Wistar adultos com DM1. Mesmo assim, os resultados sugerem que o dano cognitivo em animais adultos ocorre com diagnóstico mais tardio do que comparado a animais jovens (Grzęda & Wiśniewska, 2008; Zhou et al., 2018) que, no estudo que realizamos, mostrou que em 4 semanas após o diagnóstico de DM1, os animais jovens já apresentaram declínio cognitivo no teste de MWM comparado aos controles. Entretanto, o artigo publicado por Delkhosh-Kasmaie et al. em 2018 mostrou que ratos adultos que tinham 8 semanas de idade no momento da indução do DM1 por injeção IP de STZ apresentaram declínio na função cognitiva após 45 dias do diagnóstico da doença.

Apesar disso, vemos a pesquisa realizada por Grzęda & Wiśniewska que foi feita em 2008 com experimentos de desempenho cognitivo utilizando o MWM. Nessa pesquisa, ratos Wistar de aproximadamente 8 semanas de idade passaram por indução de DM1 através de injeção de STZ e foram submetidos ao teste de MWM 4 semanas após a confirmação do DM e 12 semanas após. Como resultados, os autores verificaram que em 4 semanas após o diagnóstico do DM1 não houve influência significativa no tempo de latência, que é o tempo que os animais levam para chegar a plataforma, nem entre os animais diabéticos, ou entre os animais tratados ou controles. Com essas informações constatamos que não houve prejuízo na aprendizagem dos animais, isso nos mostra que não houve dano cognitivo em 4 semanas após a indução de DM1 em ratos adultos de 8 semanas de idade. Nesse mesmo estudo os autores repetiram o teste de MWM após 12 semanas do diagnóstico do DM1 com os mesmos animais. Nesse contexto, os animais diabéticos apresentaram um declínio cognitivo significativo em relação ao controle ao refazerem o teste em 12 semanas após a indução do modelo.

Como vemos em nossos dados, com ratos Wistar jovens após quatro semanas do diagnóstico do DM1 utilizando o teste comportamental de MWM, já presenciemos o declínio cognitivo causado pelo diabetes de forma que os animais acometidos pela doença tiveram déficit de aprendizagem e de desempenho cognitivo nesse teste comportamental.

## **Dano neuronal hipocampal**

É estabelecido na literatura (Shalimova et al., 2019; Luna et al., 2021) que a hiperglicemia crônica pode desencadear mecanismos que promovem dano neuronal e disfunções endoteliais, juntos, esses fatores podem resultar no desenvolvimento de disfunções cognitivas ao longo do tempo. Inclusive, são observadas alterações no cérebro principalmente atribuídas à hiperglicemia crônica e são referidas como encefalopatia diabética (Luna et al., 2021).

A redução dos marcadores neuronais ChAT e NeuN em nosso trabalho nos indicam que houve dano neuronal acometido pelo DM nos animais diabéticos, pois NeuN é uma proteína nuclear neuronal usada como um marcador para neurônios (Mullen et al., 1992) e este índice se encontra reduzido em nossos resultados, possivelmente por conta de morte neuronal. Ocorre a perda neuronal no hipocampo, como resultado do estresse oxidativo gerado pelo DM. Além disso, há redução da densidade da espinha dendrítica, proteínas sinápticas e também aumento dos marcadores apoptóticos. Por outro lado, a neurogênese hipocampal também é afetada, prejudicando o surgimento de novas células neuronais (Luna et al., 2021).

Houve também redução da atividade colinérgica no tecido hipocampal, por apresentar diminuição da expressão de ChAT nesse tecido (Moreira et al., 2022).

## **Reatividade e Prejuízo no Metabolismo glutamatérgico astrocitário hipocampal**

O aumento da expressão da proteína GFAP corrobora com a literatura que afirma que o aumento dos níveis de GFAP em tecido hipocampal corresponde à resposta inflamatória ocasionada no SNC (Vizuet et al., 2022). Outros estudos já realizados com modelos de DM1 em ratos Wistar adultos resultaram em aumento dos níveis de GFAP no SNC, confirmando a resposta glial ao processo neuroinflamatório (Saravia et al., 2002; Baydas et al., 2003; Nardin et al., 2016). Além disso, a hiperglicemia, em via de regra, teve, em modelos de DM1, um poderoso efeito estimulador nas alterações astrocitárias do hipocampo (Saravia et al., 2002).

A GS é amplamente estudada no encéfalo, principalmente nas células gliais, tendo suas funções bem conhecidas e elucidadas (Lieth et al., 2000). Sua principal função é a síntese de Glutamina (Gln) e, para isso, participa de diversas rotas

bioquímicas, como a formação de aminoácidos para dar sequência à formação de nucleotídeos, proteínas e outros metabólitos (de Oliveira et al., 2016).

Sendo uma enzima exclusiva de astrócitos, a GS é também um marcador de atividade astrocitária e metabolismo glutamatérgico glial (Gu et al., 2018). A redução de sua atividade encontrada em nossa pesquisa, é compatível com a literatura (Gu et al., 2018) que relaciona a progressão do DM, com a redução da atividade e expressão da GS ao longo do tempo, levando a um comprometimento neuronal por disfunção no metabolismo astrocitário.

Na literatura, encontramos o trabalho de Lieth et al. com ratos diabéticos realizado em 2000 que corrobora com os dados obtidos em nossa pesquisa, em que os animais diabéticos apresentaram uma diminuição dos níveis de GS em relação aos controles. Nesse trabalho, os autores verificaram a atividade e o conteúdo de GS durante 6 meses nos ratos diabéticos. Com isso, puderam concluir que a atividade desta enzima e o seu conteúdo são alterados ao ponto de inibir a atividade da GS por conta do Diabetes e que o mesmo prejudica o metabolismo glutamatérgico.

### **Estresse oxidativo e Detoxificação do Metilglioal no Hipocampo**

Sabemos que o metabolismo da GSH está intimamente envolvido com a defesa contra agentes oxidantes intracelulares principalmente no SNC, agindo, dessa maneira, como um potente antioxidante não enzimático inato (Lu, 2013). A desregulação dos níveis de GSH em astrócitos e neurônios está relacionada a desordens neurológicas e neuropatologias. Isso se deve ao fato de se acumularem agentes oxidantes, como radicais livres no SNC, o que acomete à disfuncionalidade das células nele existentes (Johnson et al., 2012). Inclusive, no DM o aumento da produção de EROs está relacionado à diminuição por degradação da enzima Glutathione-Peroxidase que é responsável por converter GSH ao seu estado oxidado, em que apresenta uma ativa função antioxidante (Ullah et al., 2015).

Os níveis aumentados de DCF indicam que foi encontrada a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células hipocampais dos animais diabéticos em relação aos animais controle. Isso porque o DCF é uma substância que emite fluorescência a partir da ligação de EROs a sua estrutura e esse processo ocorre de maneira intracelular (Luparello et al., 2022).

A hiperglicemia leva ao dano endotelial através do aumento do estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias. Levando à formação de trombos que entram em pequenos vasos do cérebro causando isquemia cerebral. Dessa forma, ocorre um comprometimento cognitivo vascular (Luna et al., 2021). Além disso, a hiperglicemia intracelular aumenta o potencial de membrana mitocondrial acima do limite crítico necessário para aumentar a formação de superóxidos e, por consequência, aumentar a produção de EROs. A hiperglicemia pode também ativar várias outras vias de produção de superóxidos que podem amplificar o efeito danoso original da hiperglicemia primária (Giacco & Brownlee, 2010).

Em nossos resultados também observamos a presença aumentada da enzima GLO-1. Esta enzima está relacionada ao metabolismo da remoção de Metilglioxal (MG), que já é bem conhecido por ter seus níveis aumentados em doenças relacionadas à idade avançada como doenças neurodegenerativas, diabetes, entre outras. Esse metabólito é de interesse científico uma vez que nessas doenças ele é uma dos quais é altamente reativo no organismo e é formador dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) que, em altas concentrações, estão relacionadas com declínio cognitivo (Kold-Christensen & Johannsen, 2019). A GLO-1, por sua vez, se encontra aumentada no Diabetes na tentativa de amenizar a intensa concentração de metilglioxal existente nas células do SNC acometidas pela doença. Outro peptídeo muito relacionado ao metabolismo do metilglioxal é a GSH, um tripeptídeo que atua em seu estado reduzido como co-fator da GLO1. Um dos motivos para se perceber sua redução em nossos dados é por ela se encontrar em maioria no seu estado reduzido entrando no ciclo do metabolismo do MG e não estar tão disponível para ser quantificada (Kingkeoho & Chaplen, 2005).

### **Considerações Finais**

Considerando que a população acometida por DM1 é, em maioria, da faixa etária de crianças e adolescentes, a melhor mimetização da doença em modelos animais seria com animais igualmente jovens.

Em nosso trabalho, concretizamos a padronização do modelo de indução de DM1 utilizando ratos Wistar jovens, com cujo experimento confirmamos a hiperglicemia e perda ponderal seguida de neuroinflamação que desencadeou um prejuízo cognitivo aos ratos diabéticos após 4 semanas de indução do modelo de

DM1. A partir do teste comportamental de RO foi possível verificar o declínio cognitivo dos animais diabéticos, pois exploraram menos os objetos novos tanto no teste de 1h quanto 24h, relacionados com o prejuízo na consolidação da memória de curto e longo prazo, respectivamente. Assim também, no teste comportamental de MWM, em que os ratos diabéticos tiveram prejuízo na aprendizagem, pois levaram mais tempo para encontrar a plataforma no último dia de treino, assim como prejuízo na memória espacial e de trabalho por demorarem mais a chegar até a plataforma no teste final.

Presenciamos processo inflamatório ativo no SNC e na periferia dos animais diabéticos com o aumento dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  no hipocampo e soro dos animais. Além disso, também foi encontrado aumento da expressão da proteína TLR4 cuja atividade está envolvida na rota de neuroinflamação das células do SNC. Também encontramos diminuição de fatores neuronais, como NeuN que pode ser relacionado à morte neuronal nos ratos diabéticos, assim como a diminuição da atividade colinérgica por conta da redução da enzima ChAT no hipocampo desses ratos. Juntamente com os dados obtidos de redução da atividade da ChAT, o aumento dos níveis de TGF $\beta$  indicam prejuízo à plasticidade sináptica que corrobora com os dados comportamentais e confirmam que os animais diabéticos tiveram pior desempenho nas tarefas cognitivas por prejuízo na consolidação das memórias espacial, de aprendizado e de trabalho. Também encontramos o aumento da expressão da proteína GFAP podendo indicar reatividade astrocitária ao processo inflamatório ocorrido no SNC desses animais. Observamos também uma diminuição da atividade da GS hipocampal indicando prejuízo no metabolismo glutamatérgico astrocitário desencadeado por DM1 nos animais.

Inclusive, esses animais apresentaram aumento da atividade da GLO-1, indicando aumento do metilglioxal no hipocampo, do mesmo modo, foi observado um aumento dos níveis de DCF, um marcador de estresse oxidativo que indica a presença de EROs no SNC. Houve também uma diminuição dos níveis de GSH no hipocampo dos animais diabéticos por consequência da hiperglicemia do DM1, dessa forma, reduzindo as defesas antioxidantes dos ratos diabéticos.

Observamos alterações nos níveis de transaminases, metabólitos nitrogenados e lipídicos no soro dos animais diabéticos, indicando a presença de comorbidades decorrentes do DM1 nesses animais.

Com este estudo, trouxemos novidades a respeito da fisiopatologia do DM1 em ratos Wistar jovens, mas muito ainda precisa ser elucidado. São necessários mais estudos para que possamos melhorar nossa compreensão a respeito dessa doença no público jovem e, enfim, buscar melhores e mais eficientes formas de tratamento.

### **Fonte de Financiamento**

Este trabalho contou com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Referências Bibliográficas**

- Adak, T.; Samadi T.A.; Ünal, A.Z.; Sabuncuoğlu, S. A reappraisal on metformin, Regul. Toxicol. Pharmacol. 92. 324–332. 2018.
- Allen, S; Shea, J. M.; Felmet, T; Gadra, J. & Dehn, P. F. A kinetic microassay for glutathione in cells plated on 96-well microtiter plates. Methods in Cell Science, 22, p. 305–312. 2001.
- Anderson, M.A.; Ao, Y. and Sofroniew, M.V. Heterogeneity of reactive astrocytes. Neuroscience letters, 565, p. 23-29. 2014.
- Arigela, C.S.; Nelli, G.; Gan, S.H.; Sirajudeen, K.N.S.; Krishnan, K.; Abdul Rahman, N.; Pasupuleti, V.R. Bitter Gourd Honey Ameliorates Hepatic and Renal Diabetic Complications on Type 2 Diabetes Rat Models by Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Apoptotic Mechanisms. Foods. 2021.
- Bayat, M., Sharifi, M. D., Haghani, M., & Shabani, M. Enriched environment improves synaptic plasticity and cognitive deficiency in chronic cerebral hypoperfused rats. Brain Research Bulletin, 119, p. 34–40. 2015.
- Baydas G, Nedzvetskii VS, Tuzcu M, Yasar A, Kirichenko SV. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. Eur J Pharmacol. Feb 21;462(1-3):67-71. 2003.
- Bigaran, L.T.; Pereira, F.R.S.; Maia, A.K. da S.; Barbosa, T.C.; Ribeiro, E. dos S.L.P.; Lima, R.E. de A.; Orta, B.H.S.; Hércules , M.B.; Sartin, E.G.; El Hassan, S. Diabetes Mellitus Type 1: A literature review on the impact of the

disease on children's quality of life. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 11, n. 15, p. e236111536947, 2022.

- Boulton et al. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. 10<sup>a</sup> Edição. 2021.
- Cabrera SM, Henschel AM, Hessner MJ. Innate inflammation in type 1 diabetes. *Transl Res*. 2016.
- Cavalcanti CL, Gonçalves MCR, Alves AF, Araújo EV, Carvalho JLP, Lins PP, Alves RC, Soares NL, Pordeus LCM and Aquino JS. Antidepressant, Anxiolytic and Neuroprotective Activities of Two Zinc Compounds in Diabetic Rats. *Front. Neurosci*. 2020.
- Chung, Ji & Kim, Oh & Song, Juhyun. Role of ketone bodies in diabetes-induced dementia: sirtuins, insulin resistance, synaptic plasticity, mitochondrial dysfunction, and neurotransmitter. *Nutrition reviews*. 2021.
- Cho et al. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. 8<sup>a</sup> Edição. 2017.
- Cho et al. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. 9<sup>a</sup> Edição. 2019.
- Dahlqvist, P., Ronnback, A., Bergstrom, S.-A., Soderstrom, I., & Olsson, T. Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats. *European Journal of Neuroscience*, v. 8, n<sup>o</sup> 19, p. 2288–2298. 2004.
- Delkhosh-Kasmaie, A.A.F.; Farshid, E.T.; M.I. The effects of safranal, a constitute of saffron, and metformin on spatial learning and memory impairments in type-1 diabetic rats: behavioral and hippocampal histopathological and biochemical evaluations. *Biomed. Pharmacother*. 107. 2018.
- DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C. and Giambanco, I. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et biophysica acta*, 1793,1008-1022. 2009.
- El-Sawah SG, Rashwan HM, Althobaiti F, Aldahrani A, Fayad E, Shabana ES, El-Hallous EI, Amen RM. AD-MSCs and BM-MSCs Ameliorating Effects on The Metabolic and Hepato-renal Abnormalities in Type 1 Diabetic Rats. *Saudi J Biol Sci*. 2022.
- Finsterwald, C., Magistretti, P. J. and Lengacher, S. Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Current pharmaceutical*

design, 21, p. 3570-3581. 2015.

- Furman, B.L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2015.
- Glaser N, Chu S, Weiner J, et al. Effects of TRAM-34 and minocycline on neuroinflammation caused by diabetic ketoacidosis in a rat model. *BMJ Open Diab Res Care.* 2022.
- Gonçalves, C. A., Leite, M. C. and Nardin, P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical biochemistry*, 41,755-763.2008.
- Gonçalves, A., Ambrosio, A. F. and Fernandes, R. Regulation of claudins in blood-tissue barriers under physiological and pathological states. *Tissue barriers*, 1, 24782. 2013.
- González-Reyes RE, Aliev G, Ávila-Rodrigues M, Barreto GE. Alterations in Glucose Metabolism on Cognition: A Possible Link Between Diabetes and Dementia. *Curr Pharm Des.* 22(7):812-8. 2016.
- Gomes RM, de Paulo LF, Bonato Panizzon CPDN, Neves CQ, Cordeiro BC, Zanoni JN, Francisco FA, Piovan S, de Freitas Mathias PC, Longhini R, de Mello JCP, de Oliveira JC, Pedrino GR, da Silva Reis AA, Cecchini AL, Marçal Natali MR. Anti-Diabetic Effects of the Ethyl-Acetate Fraction of *Trichilia catigua* in Streptozo-tocin-Induced Type 1 Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem.* 42(3):1087-1097. 2017.
- Grzeda E, Wiśniewska RJ. Differentiations of the effect of NMDA on the spatial learning of rats with 4 and 12 week diabetes mellitus. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2008.
- Gu L, Xu H, Zhang C, Yang Q, Zhang L, Zhang J. Time-dependent changes in hypoxia- and gliosis-related factors in experimental diabetic retinopathy. *Eye (Lond).* Apr;33(4):600-609. 2018.
- Hall P, Cash J. What is the real function of the liver 'function' tests?. *Ulster Med J.*;81(1):30-36. 2012.
- Hansen F. et al. Methylglyoxal Induces Changes in the Glyoxalase System and Impairs Glutamate Uptake Activity in Primary Astrocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 11. 2017.
- Hovind P, Rossing P, Johnson RJ, Parving HH. Serum uric acid as a new player in the development of diabetic nephropathy. *J Ren Nutr.*

Jan;21(1):124-7. 2011.

- Hussain; S.K.Y.; Jainc, P.K.; Samaiyaa. Short-term westernized (HFFD) diet fed in adolescent rats: Effect on glucose homeostasis, hippocampal insulin signaling, apoptosis and related cognitive and recognition memory function. *Behavioural Brain Research*. 361. 113–121. 2019.
- Inaba, M.; Kurajoh, M.; Okuno, S.; Imanishi, Y.; Yamada, S.; Mori, K.; Ishimura, E.; Yamakawa, T.; Nishizawa, Y. Poor muscle quality rather than reduced lean body mass is responsible for the lower serum creatinine level in hemodialysis patients with diabetes mellitus. *74*: 266-272. 2010.
- Isales CM, Min L, Hoffman WH. Acetoacetate and beta-hydroxybutyrate differentially regulate endothelin-1 and vascular endothelial growth factor in mouse brain microvascular endothelial cells. *J Diabetes Complications*. 1999.
- Ji, M.; Wang, Z.; Sun, X.; Tang, H.; Zhang, H.; Jia, M.; Qiu, L.; Zhang, G.; Peng, Y. G. & Yang, J. Repeated Neonatal Sevoflurane Exposure-Induced Developmental Delays of Parvalbumin Interneurons and Cognitive Impairments Are Reversed by Environmental Enrichment. *Molecular Neurobiology*, v. 5, n° 54, p. 3759–3770. 2016.
- Johnson, William & Wilson-Delfosse, Amy & Mieryal, John. Dysregulation of Glutathione Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*. 4. 1399-440. 2012.
- Kandimalla, R; Thirumala, V e Reddy, P. H. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A Critical Appraisal. *Biochim Biophys Acta*. 2018.
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17016. 2017.
- Khemakhem R, Dridi Y, Hamza M, Ben Hamouda A, Khlayfia Z, Ouerda H, Halioui S, Siala N, Belhadj A, Maherzi A. Living with type 1 diabetes mellitus: How does the condition affect children's and adolescents' quality of life? *Arch Pediatr*. 2020.
- Kingkeohoi, Sarocha & Chaplen, Frank. Analysis of Methylglyoxal Metabolism in CHO Cells Grown in Culture. *Cytotechnology*. 48. 1-13. 2005.
- Kreis R, Ross BD. Cerebral metabolic disturbances in patients with subacute and chronic diabetes mellitus: detection with proton MR spectroscopy. *Radiology*. 1992.
- de Lima, M. N.; Laranja, D. C.; Bromberg, E.; Roesler, R.; Schroder, N. Pre-

or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res*, v. 156, n. 1, p. 139-43, 2005.

- Lee C, Kim D, Lee S, Kim D, Kim H, Park S, Seul D, Park J, Kim S, Choi M, Jung J, Han K. Association between Serum Liver Enzyme and Mortality in the Diabetes Patients of Korea. *KJFP*;8:504-511. 2018.
- Leite MC, Galland F, Brolese G, et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods* 169:93–9. 2008.
- Liang G, Song L, Chen Z, Qian Y, Xie J, Zhao L, Lin Q, Zhu G, Tan Y, Li X, Pang R, Gu D. Triptolide Improves Renal Injury in Diabetic Nephropathy Rats through TGF- $\beta$ 1/Smads Signal Pathway. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*.21(10):1905-1911. 2021.
- Lieth E, LaNoue KF, Antonetti DA, Ratz M. Diabetes reduces glutamate oxidation and glutamine synthesis in the retina. The Penn State Retina Research Group. *Exp Eye Res*. 2000.
- Livingstone R, Boyle JG, Petrie JR. Removal study team. A new perspective on metformin therapy in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017.
- Lima, A.S.; Batista, L.A.; Cardoso Filho, L.I. Relação da hiperuricemia com o Diabetes Mellitus Tipo II. IV Seminário de Pesquisas e TCC da FUG. 2012.
- Luna R, Talanki Manjunatha R, Bollu B, et al. A Comprehensive Review of Neuronal Changes in Diabetics. *Cureus* 13(10): e19142. 2021.
- Luparello C, Branni R, Abruscato G, Lazzara V, Drahos L, Arizza V, Mauro M, Di Stefano V, Vazzana M. Cytotoxic capability and the associated proteomic profile of cell-free coelomic fluid extracts from the edible sea cucumber *Holothuria tubulosa* on HepG2 liver cancer cells. *EXCLI J*. 2022.
- Malik S, Suchal K, Khan SI, Bhatia J, Kishore K, Dinda AK, Arya DS. Apigenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via MAPK-NF- $\kappa$ B-TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1-MAPK-fibronectin pathways. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017.
- Masters, C., Bateman, R., Blennow, K. *et al.* Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers* 1, 15056. 2015.
- Mediani A, Abas F, Maulidiani M, Abu Bakar Sajak A, Khatib A, Tan CP, Ismail IS, Shaari K, Ismail A, Lajis NH. Metabolomic analysis and biochemical

changes in the urine and serum of streptozotocin-induced normal- and obese-diabetic rats. *J Physiol Biochem*. 2018.

- Minet, R.; Villie, F.; Marcollet, M.; Meynial-Denis, D. & Cynober, L. Measurement of glutamine synthetase activity in rat muscle by a colorimetric assay. *Clinica Chimica Acta*, 268, p. 121–132. 1997.
- Mohammadi M, Huang Z. Fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetic nephropathy by an anti-inflammatory mechanism. *Kidney Int. Jan;93(1):95-109*. 2018.
- Monteiro, F.R.F.; Cemin, K.; Duzzioni, L.; Hermes, M.; Liliete, E.S. Novo Intervalo de Referência para Alanina Aminotransferase Usando o Sistema Automatizado de Bioquímica Dade Behring Ar Dimension. *NewsLab*. 65. 2004.
- Moreira, A.P., Vizuete, A.F.K., Zin, L.E.F. *et al.* The Methylglyoxal/RAGE/NOX-2 Pathway is Persistently Activated in the Hippocampus of Rats with STZ-Induced Sporadic Alzheimer's Disease. *Neurotox Res* 40, 395–409. 2022.
- Mullen, R.J.; Buck, C.R.; Smith A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1 September; 116 (1): 201–211. 1992.
- Nardin, P.T.; Sesterheim, P.A.C.; Rodrigues, L.; Biasibetti, R.; Gonçalves, C.A. COGNITIVE IMPAIRMENT INDUCED BY STREPTOZOTOCIN: An experimental link between diabetes and Alzheimer's disease. In: *Streptozotocin: Uses, Mechanism of Action and Side Effects Chapters Books*. (E. L. Gauthier ed.), pp. 37-60. Nova Science Publishers, Porto Alegre Brazil. 2014.
- Nardin, P.; Zanotto, C.; Hansen, F.; Batassini, C.; Gasparin, M. S.; Sesterheim, P. & Gonçalves, CA. Peripheral Levels of AGEs and Astrocyte Alterations in the Hippocampus of STZ-Diabetic Rats. *Neurochemical Research*, 41, 8, 2016.
- Nomoto H, Pei L, Montemurro C, Rosenberger M, Furterer A, Coppola G, Nadel B, Pellegrini M, Gurlo T, Butler PC, Tudzarova S. Activation of the HIF1 $\alpha$ /PFKFB3 stress response pathway in beta cells in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2020.
- de Oliveira, D.C., da Silva Lima, F., Sartori, T. *et al.* Glutamine metabolism and its effects on immune response: molecular mechanism and gene

expression. *Nutrire* 41, 14. 2016.

- Oliveira, G.O.; Braga, C.P.; Fernandes, A.A.H. Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.& Endl.)] treatment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 59, p. 256-260. 2013.
- Oliveira, W.H.; Nunes, A.K.; França, M.E.; Santos, L.A.; Lós, D.B.; Rocha, S.W.; Barbosa, K.P.; Rodrigues, G.B.; Peixoto, C.A.; Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice, *Brain Res.* 1644.149–160. 2016.
- Parvizi, M. R., Parviz, M., Tavangar, S. M., Soltani, N., Kadkhodae, M., Seifi, B., Azizi, Y. and Keshavarz, M. Protective effect of magnesium on renal function in STZ-induced diabetic rats. *Journal of diabetes and metabolic disorders*, 13, 84. 2014.
- Pellerin, L. and Magistretti, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Neurobiology*, v. 91, p. 10625-10629. 1994.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., Magistretti, P.J. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*. n. 55, p. 1251–62. 2007.
- Pirttimaki, T. M. and Parri, H. R. Astrocyte plasticity: implications for synaptic and neuronal activity. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 19, p. 604-615. 2013.
- Powers AC. Type 1 diabetes mellitus: much progress, many opportunities. *J Clin Invest.* 2021.
- Prantner D, Nallar S, Richard K, Spiegel D, Collins KD, Vogel SN. Classically activated mouse macrophages produce methylglyoxal that induces a TLR4- and RAGE-independent proinflammatory response. *J Leukoc Biol.* 1–15; 2020.
- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Diabetes Mellitus Tipo 1. CONITEC. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. 2019.
- Rajizadeh, Mohammad Amin, Amir Hashem Aminizadeh, Khadijeh Esmaeilpour, Mohammad Abbas Bejeshk, Asieh Sadeghi & Fouzieh Salimi: Investigating the effects of *Citrullus colocynthis* on cognitive performance and

anxiety-like behaviors in STZ-induced diabetic rats, *International Journal of Neuroscience*. 2021.

- Rasmus Kold-Christensen, Mogens Johannsen. Methylglyoxal Metabolism and Aging-Related Disease: Moving from Correlation toward Causation, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, Volume 31, Issue 2, 2020.
- Redolat, R., & Mesa-Gresa, P. Potential Benefits and Limitations of Enriched Environments and Cognitive Activity on Age-Related Behavioural Decline. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, p. 293–316. 2011.
- Robert, W.C. Ultrasound imaging: Principles and applications in rodent research. *Int. Lab. Anim. Res.* 42. 233-247. 2001.
- Rodrigues, L. Alterações neurogliais em hipocampo de ratos expostos à estreptozotocina intracerebroventricular: estratégias de neuroproteção. Tese de doutorado (Tese em neurociências) – UFRGS. Rio Grande do Sul. 2010.
- Rodrigues, L.; Wartchow, K.M.; Suardi, L.Z.; Federhen, B.C.; Selistre, N.G.; Gonçalves, C.A. Streptozotocin causes acute responses on hippocampal S100B and BDNF proteins linked to glucose metabolism alterations, *Neurochemistry International*, Volume 128, 2019.
- Rom S, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, Seliga A, Winfield M, Heldt NA, Kolpakov MA, Bashkirova YV, Sabri AK, Persidsky Y. Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models. *Mol Neurobiol.* 2019.
- Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes.* 2002.
- Saedi E, Gheini MR, Faiz F, Arami MA. Diabetes mellitus and cognitive impairments. *World J Diabetes;* 7(17): 412-422. 2016.
- Saravia FE, Revsin Y, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Roig P, Lima A, Homo-Delarche F, De Nicola AF. Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice. *Brain Res.* 2002.
- Sasaki-Hamada S, Sacai H, Oka JI. Diabetes onset influences hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-treated rats. *Neuroscience.* 2012.

- Seke Etet PF, Farahna M, Satti GMH, Bushara YM, El-Tahir A, Hamza MA, Osman SY, Dibia AC, Vecchio L. Garcinia kola seeds may prevent cognitive and motor dysfunctions in a type 1 diabetes mellitus rat model partly by mitigating neuroinflammation. *J Complement Integr Med*. 2017.
- de Senna PN, Ilha J, Baptista PP, do Nascimento PS, Leite MC, Paim MF, Gonçalves CA, Achaval M, Xavier LL. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab Brain Dis*. 2011.
- de Senna, P.N.; Xavier, L.L.; Bagatini P.B.; Saur, L; Galland, F; Zanotto, C; Bernardi, C; Nardin, P; Gonçalves, C.A.; Achaval, M. Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the Blood brain barrier in diabetic rats, *Brain Research*. 2015.
- Shehata, A.S.; Amer, M.G.; Abd El-Haleem, M.R.; Karam, R.A. The ability of hesperidin compared to that of insulin for preventing osteoporosis induced by type I diabetes in young male albino rats: A histological and biochemical study, *Exp. Toxicol. Pathol*. 69. 203–212. 2017.
- Sherifa A. Hamed: Brain injury with diabetes mellitus: evidence, mechanisms and treatment implications, *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2017.
- Shivanna N, Naika M, Khanum F, Kaul VK. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia rebaudiana. *J Diabetes Complications*. 2013.
- Silva, B. A., Leal, M. C., Farias, M. I., Erhardt, B., Galeano, P., Pitossi, F. J., & Ferrari, C. C. Environmental enrichment improves cognitive symptoms and pathological features in a focal model of cortical damage of Multiple Sclerosis. *Brain Research*, 146520. 2019.
- Simas JN, Mendes TB, Fischer LW, Vendramini V, Miraglia SM. Resveratrol improves sperm DNA quality and reproductive capacity in type 1 diabetes. *Andrology*. 2020.
- Thomazi, A. P.; Godinho, G.F.R.S.; Rodrigues, J. M.; Schwalma, F. D.; Frizzo, M.E.S.; Moriguchi, E.; Souza, D. O. & Wofchuk S.T. Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mechanisms of Ageing and Development*. 125, p. 475–481. 2004.
- Tramontina F, Leite MC, Cereser K, et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods* 162:282–286. 2007.

- Tsuneoka Y, Nishimura T, Oka JI. Fluorescein Permeability of the Blood-Brain Barrier Is Enhanced in Juvenile- but Not Young Adult-Onset Type 1 Diabetes in Rats. *Biol Pharm Bull.* 2021.
- Ullah A.; Khan A.; Khan I. Diabetes mellitus and oxidative stress — A concise review, *Saudi Pharmaceutical Journal*, Volume 24, Issue 5, Pages 547-553, ISSN 1319-0164, 2016.
- Umegaki, H. Type 2 diabetes as a risk factor for cognitive impairment: current insights. *Clinical interventions in aging*, 9, 1011-1019. 2014.
- Unsicker K, Kriegstein K. TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival. *Adv Exp Med Biol.* 513:353-74. 2002.
- Vizuite, A.F.K. Avaliação da neuroinflamação e da atividade astrocitária em modelo de epilepsia por Li-pilocarpina: S100B possível marcador e alvo farmacológico. Tese de doutorado (Tese em bioquímica) – UFRGS. Rio Grande do Sul. 2017.
- Vizuite, A.F.K., Fróes, F., Seady, M. *et al.* Early effects of LPS-induced neuroinflammation on the rat hippocampal glycolytic pathway. *J Neuroinflammation* 19, 255. 2022.
- Wartchow KM, Rodrigues L, Lissner LJ, Federhen BC, Selistre NG, Moreira A, Gonçalves CA, Sesterheim P. Insulin-producing cells from mesenchymal stromal cells: Protection against cognitive impairment in diabetic rats depends upon implant site. *Life Sci.* 2020.
- Wang W.T.; Lee P.; Yeh HW.; Smirnova IV.; Choi IY. Effects of acute and chronic hyperglycemia on the neurochemical profiles in the rat brain with streptozotocin-induced diabetes detected using in vivo <sup>1</sup>H MR spectroscopy at 9.4 T. *J Neurochem.* 2012.
- Wang, X. and Roper, M. G. Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Anal Methods*, v. 6, n.9, p. 3019–3024. 2014.
- Wayhs CA, Manfredini V, Sitta A, Deon M, Ribas G, Vanzin C, Biancini G, Ferri M, Nin M, Barros HM, Vargas CR. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. *Metab Brain Dis.* 2010.
- Wu D, Wen W, Qi CL, Zhao RX, Lü JH, Zhong CY, Chen YY. Ameliorative

effect of berberine on renal damage in rats with diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. *Phytomedicine*. Jun 15;19(8-9):712-8. 2012.

- Xie Y, Song T, Huo M, Zhang Y, Zhang YY, Ma ZH, Wang N, Zhang JP, Chu L. Fasudil alleviates hepatic fibrosis in type 1 diabetic rats: involvement of the inflammation and RhoA/ROCK pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 22(17):5665-5677. 2018.
- Zanotto, C. de B. Alterações do diabetes mellitus no sistema nervoso central: avaliação de parâmetros astrocitários, comportamentais, da funcionalidade das barreiras hematoencefálica e hematoliquórica e o papel da exendina-4 na neuroproteção. Tese de doutorado (Tese em bioquímica) – UFRGS. Rio Grande do Sul. 2016.
- Zeng F, Luo J, Han H, et al. Allopurinol ameliorates liver injury in type 1 diabetic rats through activating Nrf2. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 35. 2021.
- Zhou, C. et al. Metformin prevents cerebellar granule neurons against glutamate-induced neurotoxicity. *Brain Research Bulletin*. 121. 241–245. 2016.
- Zhou Y, Li X-Ling, Xie H-Long, Cao D-Na, Nie B-Bin, Zhao Y, Sun Z-Ren, Voxel-based morphology analysis of STZ-induced type 1 diabetes mellitus rats with and without cognitive impairment, *Neuroscience Letters*. 2018.
- Zilliox LA, Chadrsekaran K, Kwan JY, Russell JW. Diabetes and Cognitive Impairment. *Curr Diab Rep*. 2016.
- Zou, W.; Yuan, J.; Tang, Z. J.; Wei, H. J.; Zhu, W. W.; Zhang, P.; Gu, H. F.; Wang, C. Y.; Tang, X. Q. Hydrogen sulfide ameliorates cognitive dysfunction in 50 streptozotocin-induced diabetic rats: involving suppression in hippocampal endoplasmic reticulum stress. *Oncotarget*, v. 8, n. 38, p. 64203-64216, 2017.