



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

EXERCÍCIO FÍSICO MELHORA A MEMÓRIA ESPACIAL E
AS ALTERAÇÕES ASTROGLIAIS NO HIPOCAMPO DE
RATOS DIABÉTICOS

Dissertação de Mestrado

Priscylla Nunes de Senna

Porto Alegre
2011

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

EXERCÍCIO FÍSICO MELHORA A MEMÓRIA ESPACIAL E
AS ALTERAÇÕES ASTROGLIAIS NO HIPOCAMPO DE
RATOS DIABÉTICOS

Priscylla Nunes de Senna

Orientadora Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval

Co-Orientador Prof. Dr. Léder Leal Xavier

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre.

Porto Alegre

2011

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe Nanci Nunes de Senna.

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora Professora Doutora Matilde Achaval pela oportunidade, pela confiança e pela prestimosa ajuda.
- Ao meu co-orientador Professor Doutor Léder Leal Xavier pela acessibilidade, pelas horas e horas de trabalho despendidas com minha orientação e pelo bom humor em todos os momentos.
- Ao colega Jocemar Ilha por todas as sugestões, pela disponibilidade e pelo acolhimento antes mesmo de meu ingresso no mestrado.
- À colega Patrícia do Nascimento por todos os auxílios.
- Aos colegas Pedro Porto Alegre e Mariana Paim pelas horas de trabalho.
- Aos colegas de mestrado e do laboratório de Histofisiologia Comparada por tudo que me ensinaram e pela amizade.
- À professora Mônica Viana e sua aluna Martina Blank pelo auxílio.
- Aos meus pais que sempre acreditaram em mim, e que não só me mostraram a importância dos estudos, mas como também me ensinaram a estudar e a jamais desistir dos meus objetivos.

- Ao meu amor Luciano Mallmann pelo companheirismo, pelo incentivo e pela paciência.
- À minha irmã Shelly Senna pelo carinho e pela preocupação comigo.
- Aos meus tios, meus primos e minhas avós de Rio Grande pelo carinho e por compreenderem o porquê de minha ausência nos momentos em família.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências pela oportunidade de aprendizado.
- À CAPES pela bolsa de estudo.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) está associado a disfunções neurocognitivas e à astrogliose. Por outro lado, o exercício físico é capaz de prevenir danos cognitivos e de induzir importantes modificações no sistema nervoso central. Assim, o objetivo de nosso estudo foi investigar o efeito do exercício físico em esteira sobre a memória espacial e sobre a resposta de astrócitos no hipocampo de um modelo de DMT1. Cinquenta e sete animais foram divididos em quatro grupos: controle treinado (TC) (n=15), controle não-treinado (NTC) (n=13), diabético treinado (TD) (n=14) e diabético não-treinado (NTD) (n=15). Um mês após a indução do diabetes pela estreptozotocina, os grupos treinados foram submetidos a cinco semanas de exercício físico, e então, todos os grupos foram avaliados na tarefa de reconhecimento do objeto reposicionado. A atividade locomotora foi avaliada em campo aberto e analisada pelo programa *Any-maze*. As expressões da proteína fibrilar glial ácida no hipocampo (GFAP) e da proteína S100B no hipocampo e no líquido cérebro-espinal foram mensuradas através do método de ELISA, e a imunorreatividade para GFAP hipocampal avaliada por imunistoquímica associada à densitometria. Nossos resultados demonstraram que o exercício físico preveniu e/ou reverteu danos na memória espacial observado nos animais do grupo NTD. Diminuição na atividade locomotora foi observada em ambos os grupos NTD e TD quando comparado aos controles. As análises por ELISA e por imunistoquímica mostraram que os animais NTD apresentaram uma redução nos níveis de GFAP no hipocampo. Aumento nos níveis de S100B no líquido cérebro-espinal foi observado no grupo NTD quando comparada a todos os demais, indicando que o exercício físico evitou essas alterações. Desse modo, nossos achados indicaram que o exercício físico evitou os déficits cognitivos e as alterações nos astrócitos induzidas pelo DMT1.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is associated with neurocognitive dysfunction and astrogliosis. Physical exercise prevents cognitive impairments and induces important brain modifications. Thus, the aim of our study was to investigate the effect of treadmill exercise on spatial memory and astrocytic function in the hippocampus of a T1DM model. Fifty-seven Wistar rats were divided into four groups: trained control (TC) (n=15), non-trained control (NTC) (n=13), trained diabetic (TD) (n= 14) and non-trained diabetic (NTD) (n=15). One month after streptozotocin-induced diabetes, exercise groups were submitted to five weeks of physical training, and then, all groups were assessed in the novel object-placement recognition task. Locomotor activity was analyzed in the open field apparatus using Any-maze software. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100B in hippocampus and cerebrospinal fluid were measured using ELISA assay, and hippocampal GFAP immunoreactivity was evaluated by means of immunohistochemistry and optical densitometry. The results showed that physical exercise prevents and/or reverts spatial memory impairments observed in NTD animals ($P < 0.01$). Decreased locomotor activity was observed in both the NTD and TD groups when compared with controls ($P < 0.05$). ELISA and immunohistochemistry analyzes showed there was a reduction in GFAP levels in the hippocampus of NTD animals, which was not found in TD group. ELISA also showed an increase in S100B levels in the cerebrospinal fluid from the NTD group ($P < 0.01$) and no such increase was found in the TD group. Our findings indicate that physical exercise prevents and/or reverts the cognitive deficits and astroglial alterations induced by T1DM.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGES.....	Produtos finais de glicação avançada
BBB.....	Barreira hematoencefálica
CA.....	Corno de Ammon
CSF.....	Líquido cérebro-espinal
DLD.....	Depressão de longa duração
GFAP.....	Proteína ácida fibrilar glial
HLA.....	Antígeno leucocitário humano
IGF.....	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1.....	Interleucina 1
MHC.....	Complexo principal de histocompatibilidade
NOPR.....	Reconhecimento do objeto reposicionado
PLD.....	Potencial de longa duração
PKC.....	Proteína quinase C
SNC.....	Sistema nervoso central
SNP.....	Sistema nervoso periférico
STZ.....	Estreptozotocina
TNF.....	Fator de necrose tumoral

ARTIGO

BBB.....	Blood-brain barrier
CSF.....	Cerebrospinal fluid
GFAP.....	Glial fibrillary acidic protein
MET.....	Maximal exercise test
NOPR.....	Novel object-placement recognition task
NTC.....	Non-trained control group
NTD.....	Non-trained diabetic group
PB.....	Phosphate buffer
PBS.....	Phosphate-buffered saline
STZ.....	Streptozotocin
T1DM.....	Type 1 diabetes mellitus

TC.....Trained control group
TD.....Trained diabetic group

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura esquemática mostrando os mecanismos envolvidos na patogênese do Sistema Nervoso Central (SNC) no diabetes.....	6
Figura 2. Desenho esquemático dos dois processos tóxicos de destruição das células-beta pancreáticas induzidos pela SZT.....	7
Figura 3. Desenho esquemático mostrando a barreira hematoencefálica no SNC (a) e a participação dos astrócitos sobre ela (b).....	10
Figura 4. Desenho esquemático mostrando a participação dos astrócitos na “sinapse tripartite”.....	11
Figura 5. Desenho esquemático de estruturas e de conexões do hipocampo. CA, abreviatura de Corno de Ammon; GD, Giro Denteado	16
Figura 6. Representação esquemática mostrando os tipos de memória declarativa.....	17

ARTIGO

Figure 1. Blood glucose (A) and body weight (B) values obtained in pre, post and following experimental weeks after STZ induction. *p<0.001 comparing the diabetic groups and control groups.....	53
---	----

Figure 2. Behavioral measurements (mean \pm SEM) in the novel object-recognition task, obtained using Any-Maze software, showing the locomotor activity. Graphs A: number of line crossing; B: distance travelled; C: average speed. a = significant difference compared with the NTC group ($p < 0.05$); b = significant difference compared with TC group ($p < 0.05$).....53

Figure 3. Exploration measurements (mean \pm SEM) of the relocated object in the novel object-recognition task; * $p < 0.05$ comparing the NTD group with all other groups.....54

Figure 4. Biochemical analyses showing the effects of physical exercise (mean \pm SEM) in the hippocampal GFAP content (A) and in the cerebrospinal fluid S100 β content (B). * $p < 0.05$ comparing the NTD group with all other groups.....55

Figure 5. GFAP immunoreactivity in the stratum radiatum of the hippocampal CA1 area. A: digitized images of a coronal section in CA1 area from non-trained control (NTC), trained control (TC), non-trained diabetic (NTD) and trained diabetic (TD) groups; B: optical density measurement (OD) of GFAP immunoreactivity. ** $p < 0.01$ comparing the NTD group to all other groups.....56

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Diabetes Mellitus Tipo 1.....	2
1.1.1 Diabetes e Sistema Nervoso Central.....	5
1.2 Modelo Experimental de Diabetes.....	7
1.3 Astrócitos.....	8
1.3.1 Proteína Ácida Fibrilar Glial- GFAP.....	12
1.3.2 Proteína S100B.....	13
1.4 Hipocampo.....	15
1.5 Déficit Cognitivo.....	18
1.6 Exercício Físico.....	19
1.7 Hipótese do Trabalho.....	21
1.8 Objetivos.....	21
1.8.1 Objetivo geral.....	22
1.8.2 Objetivos específicos.....	22
2. MÉTODOS E RESULTADOS.....	24
2.1. Artigo- Priscylla Nunes de Senna, Jocemar Ilha, Pedro Porto Alegre Baptista, Patrícia Severo do Nascimento, Marina Concli Leite, Mariana Fontoura Paim, Carlos Alberto Gonçalves, Matilde Achaval, Léder Leal Xavier. Physical exercise improves spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats.....	25

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	60
4. REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) é definido como uma síndrome metabólica caracterizada por hiperglicemia decorrente da deficiência na secreção do hormônio insulina, sendo considerado um problema de saúde pública tanto de países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (TAO; TAYLOR, 2010).

Cronicamente, a hiperglicemia no DMT1 causa uma série de anormalidades metabólicas acarretando em dano celular e em complicações micro e macrovasculares, o que leva a associação do DMT1 com a neuropatia, a retinopatia, a nefropatia e com as doenças cardio e cerebrovasculares, respectivamente (PIROLA et al., 2010; GRZEDA; WISNIEWSKA, 2008; McCARTHY et al., 2002).

Déficits moderados de aprendizagem e de memória também estão associados à hiperglicemia crônica. Pacientes com diagnóstico de DMT1 apresentam piores desempenhos nos testes neurocognitivos comparado a sujeitos saudáveis, e em modelos animais de diabetes tipo 1, o déficit cognitivo é observado através do menor desempenho desses animais nos testes que avaliam, por exemplo, a memória espacial (REVSIN et al., 2009; GRZEDA; WISNIEWSKA, 2008).

Em associação, estão ainda presentes no DMT1 danos estruturais e funcionais no sistema nervoso central (SNC). No hipocampo de modelos experimentais de DMT1, já foi observado perda e atrofia de espinhos dendríticos (MALONE et al., 2008), diminuição da proliferação celular e apoptose neural (HAWKINS; DAVIES, 2001). Concomitante a essas alterações, foi demonstrado reatividade astrocitária (LEBED et al., 2008; BEAUQUIS et al., 2006; REVSIN et al., 2005; SARAVIA et al., 2002) em resposta à hiperglicemia, sugerindo que essa resposta dos astrócitos possa contribuir

para o déficit cognitivo associado ao diabetes tipo 1, uma vez que essas células da glia possuem um papel crítico sobre a atividade neural (KIMELBERG, 2010).

O exercício físico regular, juntamente com a insulinoterapia e o planejamento alimentar, é considerado como uma das três principais abordagens no tratamento do diabetes tipo 1. Seu efeito benéfico sobre o metabolismo de lipídios, de proteínas, de carboidratos – reduzindo o risco de eventos cardiovasculares, de disfunção autônoma e de lesões renais envolvidas no diabetes (ANGELIS et al., 2006) –, sobre a vascularização, a morfologia do gânglio da raiz dorsal (DO NASCIMENTO et al., 2010) e a regeneração neural (MALYSZ et al., 2010) – reduzindo as complicações da neuropatia diabética e a incidência de amputações não traumáticas (BALDUCCI et al., 2006) –, bem como os seus benefícios cognitivos e psicológicos- diminuindo os riscos de desenvolvimento de depressão, de doenças neurodegenerativas e de declínio cognitivo relacionado com a idade –, estão bem descritos na literatura (QIANG, 2008; DISHMAN et al., 2006).

Nos estudos experimentais, observa-se que animais submetidos ao treinamento físico apresentam um melhor desempenho nos testes de memória espacial, de trabalho e de exploração (ALAEI et al., 2008b; STRANAHAN et al., 2008; ALAEI et al., 2007a; ALBECK et al., 2006; ANG et al., 2006). Contudo, são escassos os estudos sobre os efeitos do exercício físico no aprendizado e na memória no estado diabético, tampouco relacionados com alterações astrocitárias.

1.1 Diabetes Mellitus Tipo 1

Classificado como uma doença metabólica, o DMT1 é, em 90% dos casos, diagnosticado na infância, sendo os demais 5 a 10% dos casos diagnosticado em adultos

com menos de 20 anos de idade (JAHROMI; EISENBARTH, 2007). As maiores incidências do DMT1 ocorrem entre as faixas etárias de 5 a 9 anos e de 10 a 14 anos de idade. Enquanto há uma prevalência de indivíduos do sexo masculino de origem europeia com DMT1, a prevalência no sexo feminino é maior naquelas de descendência não europeia (MAAHS et al., 2010).

Mundialmente, as maiores taxas de incidência de DMT1 (superiores a 35/100.000/ano) ocorrem na Finlândia e na Sardenha (Itália), seguidas por populações caucasianas na Europa e na América do Norte (cerca de 10-20/100.000/ano). No Brasil, a incidência é de 8/100.000/ano (KARVONEM et al., 2000).

Apesar dos indivíduos com DMT1 representarem apenas 5 a 10% do total de indivíduos com diagnóstico de diabetes, os custos anuais diretos e indiretos com o tipo 1 de diabetes são desproporcionais comparado ao número de pacientes com o tipo 2 e aos gastos com eles. Nos Estados Unidos, os custos médicos anuais com a doença superam os 10.5 bilhões de dólares (TAO; TAYLOR, 2010), demonstrando o grande impacto econômico que o DMT1 impõe a sociedade.

Um impacto social e emocional também estão envolvidos com a doença, uma vez que as complicações crônicas do diabetes tipo 1 são as principais causas de morbidade e de mortalidade nos pacientes diabéticos (MAAHS et al., 2010).

No que se refere ao diagnóstico, ele pode ser determinado pelo estado clínico do paciente ao apresentar o clássico quadro de polidipsia, de polifagia, de poliúria e de perda de peso corporal, caracterizando a presença de hiperglicemia. Níveis glicêmicos maiores que 126 mg/dL em jejum, maiores que 200 mg/dL a qualquer momento do dia (glicemia casual) ou duas horas após a ingestão de 75g de glicose dissolvida em água, confirmam o diagnóstico (*American Diabetes Association*, 2010).

Segundo a Associação Americana de Diabetes, o DMT1 pode subdividir-se em duas categorias: o tipo 1A ou diabetes auto-imune, e o tipo 1B ou idiopático. No tipo 1A há a presença de algum dos marcadores de agressão humoral, como anticorpos do tipo antiinsulina, antiilhas de Langerhans citoplasmáticos, anti enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65 ou antiantígeno 2 do insulínoma, ao passo que no tipo 1B são inexistentes os marcadores de destruição autoimune para células-beta pancreáticas, com etiologia desconhecida (*American Diabetes Association, 2003*).

No processo auto-imune de destruição das células-beta pancreáticas, cujo início precede o aparecimento dos sintomas clínicos, ocorre a formação de um processo inflamatório com a presença de linfócitos T-CD4 mediando a liberação de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1), de linfócitos T-CD8 e de macrófagos, produzindo auto-anticorpos (GRIECO, 2010; SILVA, DAVINI, MORINI 2008; NOTKINS 2002). O desencadeamento do processo auto-imune é atribuído a uma complexa interação entre predisposição genética e fatores ambientais, uma vez que os determinantes genéticos contribuem em apenas 50% do risco para o desenvolvimento do DMT1 (PENG; HAGOPIAN, 2006).

Desse modo, agentes infecciosos virais (Rubulavírus, Enterovírus), toxinas (pesticidas) e fatores nutricionais (substituição do leite materno por leite de vaca, baixa ingestão de Vitamina D) são citados como os possíveis agentes etiológicos para o processo auto-imune (PENG; HAGOPIAN, 2006; NOTKINS, 2002). No que se refere à suscetibilidade genética, pelo menos 20 locus gênicos já foram identificados e associados ao DMT1, e o antígeno leucocitário humano (HLA), alelo do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), é o principal locus de predisposição genética (GRIECO 2010; MAAHS et al., 2010; NOTKINS, 2002).

1.1.1 Diabetes e Sistema Nervoso Central

Complicações no sistema nervoso periférico (SNP) de pacientes diabéticos do tipo 1 já estão bem descritas na literatura clínica (YAGIHASHI et al., 2007). Estima-se que 15% dos indivíduos com a doença desenvolverão úlceras plantares, neuropatia diabética, evoluindo para amputação de causa não traumática (EDWARDS et al., 2008).

São escassos, no entanto, os estudos que investigaram as complicações no SNC relacionados com o diabetes. Em humanos diabéticos do tipo 1, algumas alterações anatômicas foram identificadas através de estudos de imagem, a citar: aumento do tamanho dos ventrículos; leve atrofia cortical; diminuição da densidade da substância cinzenta no cuneo esquerdo e direito, no pré-cuneo direito (PERANTIE et al., 2007), no cíngulo posterior e no giro temporal superior esquerdo, no giro parahipocampal direito, e no hipocampo e no tálamo esquerdo (MUSEN et al., 2006); além de diminuição do volume da substância branca na área pré-frontal (PERANTIE et al., 2007).

Embora os mecanismos responsáveis pelos danos estruturais e funcionais no SNC ainda não estejam bem esclarecidos (VAN HARTEN et al., 2006), certamente devem-se à patologia celular, molecular e microvascular do diabetes (Figura 1), a qual leva uma redução do fluxo e do metabolismo cerebral contribuindo para as alterações cognitivas do diabetes (WESSELS et al., 2008; GISPEN, BIESSELS, 2000).

Dessa forma, em consequência ao processo de hiperglicemia crônica, o dano celular ocorre por estresse oxidativo, com formação de produtos da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e de DNA, e redução dos níveis de glutathione (TUZCU; BAYDAS, 2006). Para o dano vascular, contribuem pelo menos quatro fatores metabólicos: via do poliols, via da hexosaminase, formação de produtos finais da glicação avançada (AGE'S) e excesso ou ativação inadequada de isoformas da proteína

quinase C [(PKC); BROWNLEE, 2005; KLEIN; WAXMAN, 2003]. Níveis elevados de sorbitol intracelular que caracterizam o aumento da atividade da via do poliol em resposta à hiperglicemia, já foram demonstrado no hipocampo de ratos diabéticos com déficit de memória espacial (MALONE et al., 2008).

Acredita-se que assim como na neuropatia diabética (ISHII, 1995), alterações neurotróficas, como redução da expressão gênica do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), e neuromodulatórias – associada aos níveis de insulina, de seus receptores e da sua sinalização – sejam também responsáveis pela patogênese do SNC no diabetes (WUARIN et al., 1996).

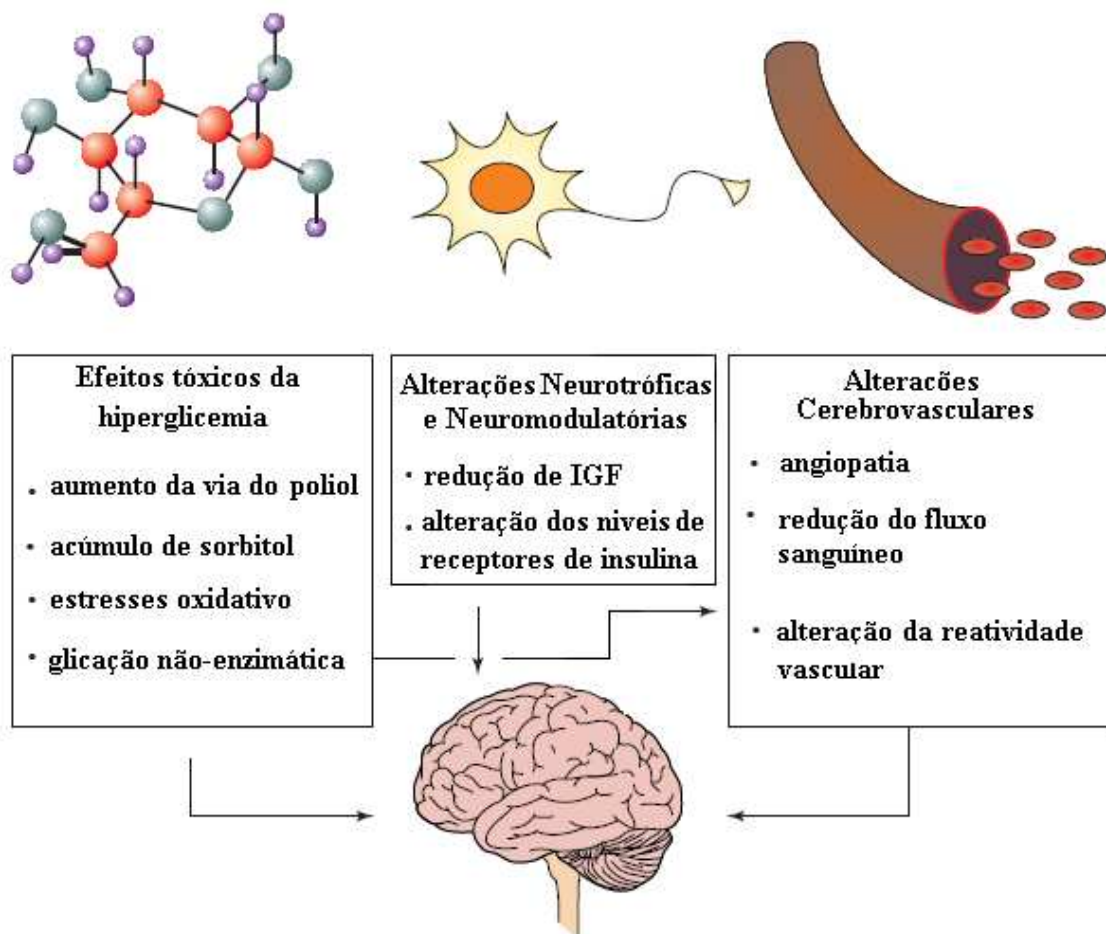


Figura 1: Figura esquemática mostrando os mecanismos envolvidos na patogênese do Sistema Nervoso Central (SNC) no diabetes (modificado de Gispen e Biessels, 2000).

1.2 Modelo Experimental de Diabetes

Drogas como aloxano e estreptozotocina (STZ) são frequentemente usadas para induzir o modelo experimental de DMT1 (LENZEN, 2008).

A STZ é um antibiótico derivado da *Streptomyces achromogenes* cujo mecanismo de destruição das células-beta pancreáticas acarreta em inibição da produção do hormônio insulina. Possuindo afinidade pelos transportadores do tipo GLUT2, a STZ é transportada pela membrana plasmática das células beta pancreáticas agindo toxicamente sobre elas não só por meio da metilação do DNA, mas como também por meio da formação de espécies reativas de oxigênio [(Figura 2); LENZEN, 2008; MURATA et al., 1999].

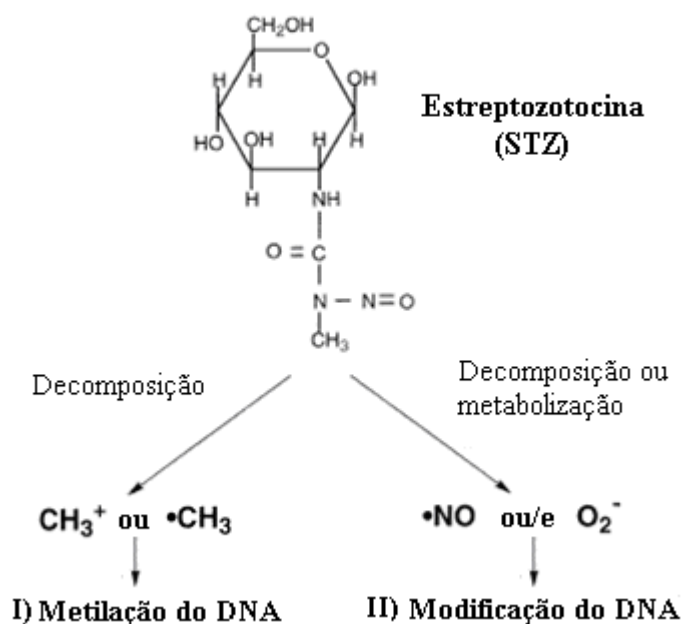


Figura 2: Desenho esquemático dos dois processos tóxicos de destruição das células-beta pancreáticas induzidos pela STZ: metilação do DNA (I) e modificação do DNA (II) por formação de espécies reativas de oxigênio (modificado de Murata, 1999).

Doses únicas de STZ, entre 40 a 60 mg/kg da massa corporal, são suficientes para induzir o DMT1 (SKUDELSKI, 2001). A administração intravenosa da droga via veia caudal é a forma mais utilizada pelo menor risco de mortalidade dos animais e pela maior confiabilidade de seu efeito diabetogênico, embora a mesma severidade do diabetes possa ser atingida via veia sublingual ou injeção intraperitoneal de STZ (DELFINO et al., 2002).

A STZ causa nos modelos experimentais hiperglicemia, hiperosmolaridade plasmática, hipoinsulinemia, hiperfagia, polidipsia e perda de massa corporal (SERINO et al., 1998) caracterizando o estado diabético. Os modelos animais de diabetes por STZ, assim, têm sido largamente utilizados para avaliar o efeito do diabetes sobre diferentes estruturas do SNC, bem como para mensurar a efetividade de diversos tratamentos para o DMT1.

1.3 Astrócitos

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes do SNC (ARAQUE; NAVARRETE, 2010). São divididos em dois subtipos conforme a morfologia celular e a localização anatômica: astrócitos protoplasmáticos, dotados de numerosos e curtos prolongamentos e encontrados na substância cinzenta, e astrócitos fibrosos, com ramificação mais longa e situados na substância branca. Os astrócitos protoplasmáticos estão em contato com a região sináptica; os fibrosos em contato com nodos de Ranvier, e ambos os subtipos estão em contato com vasos capilares através dos pés-terminais (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

As células astrocitárias representam um importante constituinte celular do SNC. Estando morfológica e funcionalmente associadas com a unidade neurovascular, elas se

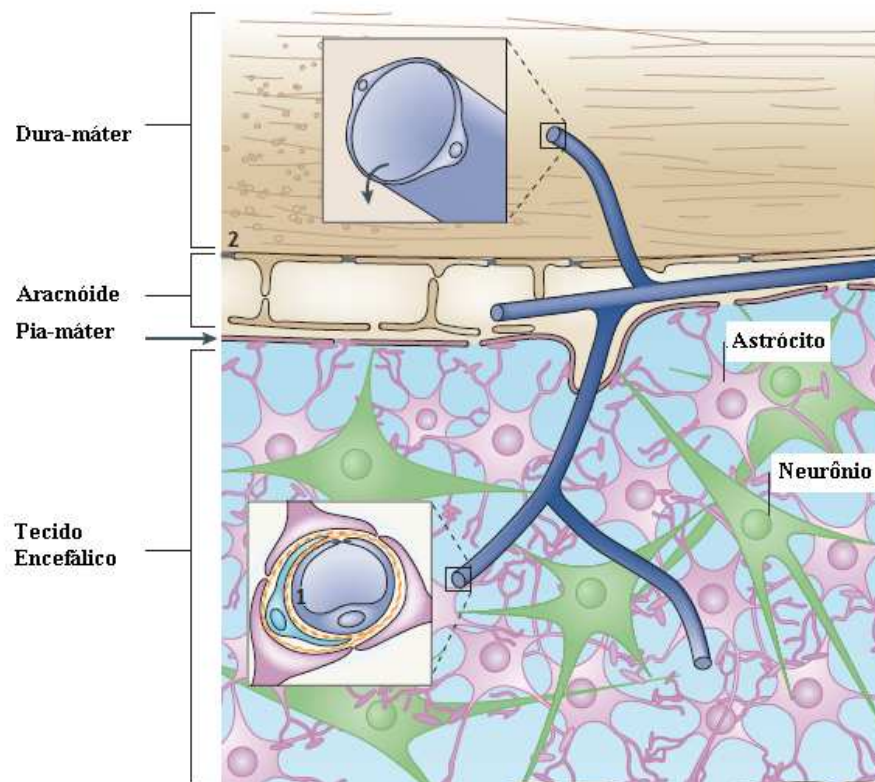
tornam essenciais para o mecanismo de microcirculação cerebral (IADECOLA; NEDERGAARD, 2007), para a manutenção da barreira hematoencefálica (Figura 3) e para o suporte trófico e metabólico dos neurônios (PELLERIN, 2005).

Os astrócitos regulam os níveis extracelulares de glutamato, atuam na proteção contra espécies reativas de oxigênio – garantindo efeito neuroprotetor (COLEMAN et al., 2010) –, e formam a “sinapse tripartite” (Figura 4), modulando a neurotransmissão sináptica (ARAQUE et al., 1999; THEODOSIS et al., 2008), a plasticidade neuronal (ARAQUE; NAVARRETE, 2010), e inclusive, contribuindo para o processo de formação de memória (PEREIRA, FURLAN, 2010; SANTELO, VOLTERRA, 2010).

Recentemente, Henneberger e colaboradores (2010) demonstraram o envolvimento dos astrócitos na indução do potencial de longa duração (LTP), o mecanismo eletrofisiológico de consolidação de memória de longo prazo (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993), através da liberação de uma molécula neuroativa, a D-serina. No estudo, fora observado que os astrócitos regulam a ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), facilitando a LTP, ao liberarem o aminoácido D-serina, um co-agonista dos receptores NMDA (HENNEBERGER et al., 2010). O processo de formação de memória dependente do tradicional contato entre neurônio pré e pós-sináptico, é, assim, influenciado pela participação de uma célula da glia, ou seja, os astrócitos (SANTELLO, VOLTERRA, 2010).

Somado a isso, o envolvimento dos astrócitos na etiologia de diferentes disfunções neurológicas, como a epilepsia (SEIFERT et al., 2009), a doença de Alzheimer (KUCHIBHOTLA et al., 2009), a esquizofrenia (MITTERAUER, 2009), e a depressão (MCNALLY et al., 2008), ainda sugere que eles estejam associados com alterações neurocognitivas (SHALEV et al., 2009).

(a)



(b)

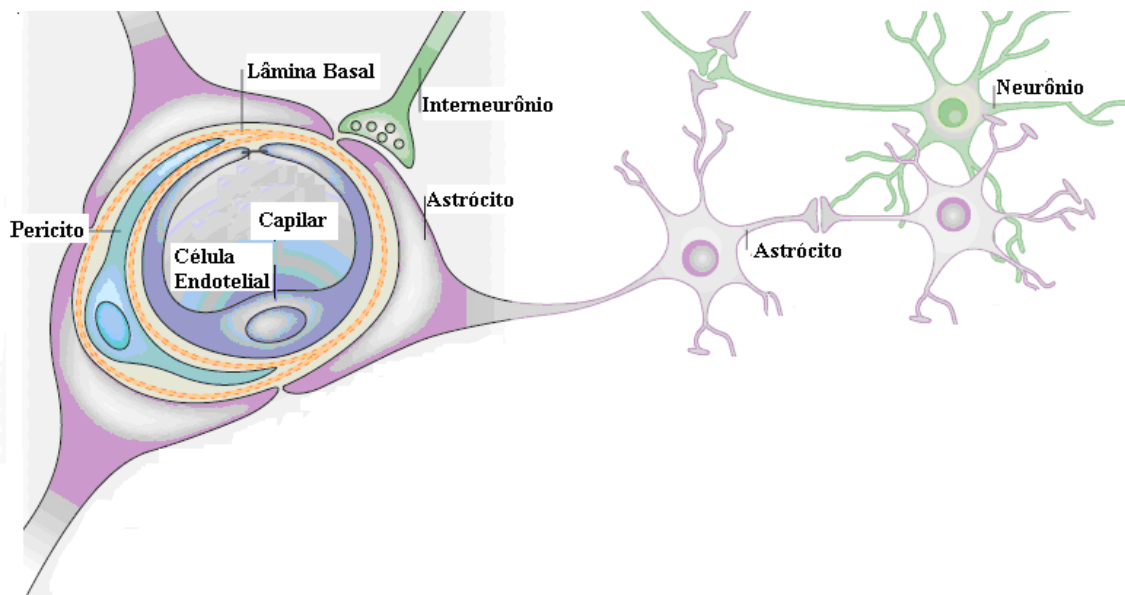


Figura 3: Desenho esquemático mostrando a barreira hematoencefálica no SNC (a) e a participação dos astrócitos sobre ela (b) (modificado de Abbott, 2006).

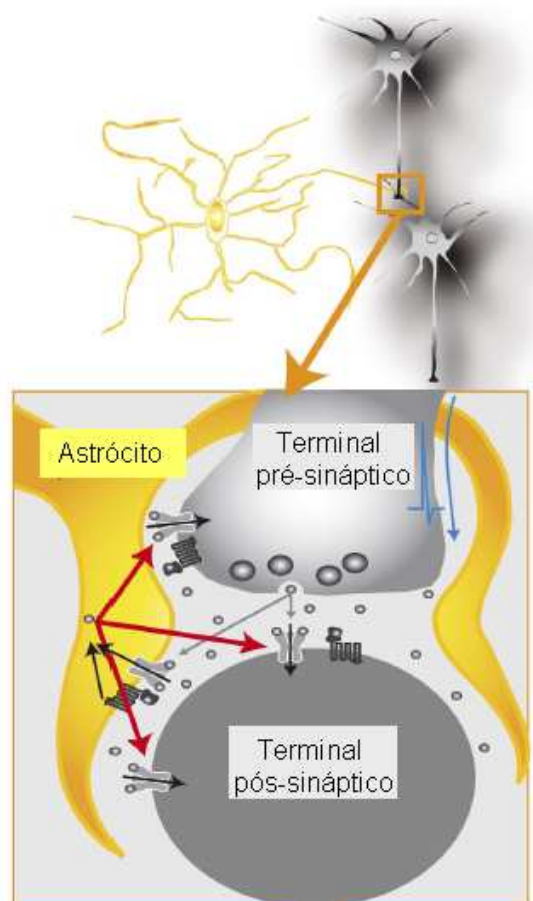


Figura 4: Desenho esquemático mostrando a participação dos astrócitos na “sinapse tripartite”. A liberação de gliotransmissores, como D-serina (setas em vermelho), atuam sobre ambos os terminais sinápticos influenciando a transmissão glutamatérgica (setas em cinza) (modificado de Theodosis, Poulain e Oliet, 2008).

No SNC, a glicose é estocada sobre a forma de glicogênio nos astrócitos, sendo vital para a atividade neuronal, incluindo formação de memória (BENTON, NABB, 2003), e para a manutenção da função encefálica durante episódios de hipoglicemia ou de alta atividade cerebral (SUH et al., 2007; McCALL, 2004). Contudo, na hiperglicemia crônica, o excesso de glicose causa danos celulares e neurovasculares afetando o metabolismo e a perfusão cerebral (RORIZ-FILHO et al., 2009; WESSELS et al., 2008). Assim, ao participarem da unidade neurovascular, do metabolismo energético, regulando os níveis de glicose e o fluxo sanguíneo cerebral, os astrócitos

tornam-se, conseqüentemente, células alvo no DMT1 em decorrência do estado hiperglicêmico (SETH; KOUL, 2008).

1.3.1 Proteína Ácida Fibrilar Glial- GFAP

A identificação dos astrócitos pode ser possível por meio da expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), principal componente dos filamentos intermediários o qual compõe astrócitos maduros. Embora a distribuição celular e regional dessa proteína não seja uniforme – pés terminais expressam mais GFAP comparado à ramificação que circunda a região sináptica, por exemplo, (NISHIYAMA, 2005) –, a proteína glial é comumente utilizada para avaliar a participação dessas células astrocitárias em diferentes processos neuropatológicos, por meio da técnica de imunistoquímica (THEODOSIS et al., 2008).

Na presença de um evento neuropatológico ou mediante o processo de neuroplasticidade, os astrócitos tornam-se reativos no intuito de proteger as células do SNC (COLEMAN et al., 2004) ou de regular o microambiente sináptico em resposta ao aumento da atividade neural (DONG; GREENOUGH, 2004), respectivamente. O grau a que expressam a proteína GFAP e a sua morfologia podem caracterizar, conseqüentemente, a resposta astrocitária (SOFRONIEW, VINTERS, 2010).

Assim, o aumento da expressão da proteína GFAP pode indicar proliferação de astrócitos, hipertrofia ou aumento do número e do comprimento dos prolongamentos dessas células (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Atividade física e experiências de aprendizado evocam neuroplasticidade, o que determina a necessidade de alterações morfológicas nos astrócitos (THEODOSIS et al., 2008; LI et al, 2005). O ambiente enriquecido, por exemplo, altera a densidade da proteína GFAP no stratum radiatum de

ratos saudáveis, relacionada com a ramificação astrocitária, além de alterar o formato fusiforme dos astrócitos para um formato mais estrelado (VIOLA et al., 2009), modificações essas certamente envolvidas para a interação entre espinhos dendríticos e prolongamentos astrocitários (HABER et al., 2006), relevante para plasticidade sináptica (VIOLA et al., 2009).

Diferentemente, a diminuição da expressão da proteína GFAP pode indicar morte astrocitária, redução da sua proliferação ou do número e do comprimento de sua ramificação (SOFRONIEW, VINTERS, 2010; PEKNY, PEKNA, 2004).

Em modelos experimentais de diabetes, a diminuição da expressão da proteína GFAP, determinando redução do número de astrócitos e do tamanho dos seus prolongamentos, parece caracterizar a resposta crônica à hiperglicemia (LECHUGA-SANCHO et al., 2006a, 2006b), e embora essa diminuição já tenha sido demonstrada no hipocampo de modelo animal de diabetes (COLEMAN et al., 2004), a literatura carece desses dados.

1.3.2 Proteína S100B

Os astrócitos também podem ser identificados pela marcação da proteína S100B, proteína a qual pertence a uma família de proteínas ligantes de cálcio, do tipo EF-hand, solúveis em solução 100% saturada de sulfato de amônio (S100), produzida e liberada por astrócitos no SNC (DONATO, 2001).

Intracelularmente, a proteína S100B é capaz de inibir a fosforilação de proteínas, como GFAP (FRIZZO et al., 2004), de regular atividades enzimáticas, o crescimento e a diferenciação celular, a homeostase do cálcio, (DONATO, 2003), e de modular a polimerização do citoesqueleto (GARBUGLIA et al., 1999). Já os seus efeitos

extracelulares são dependentes de sua concentração: concentração picomolar a valores baixos nanomolar de S100B é trófico – sobrevivência neural e crescimento de neuritos –, enquanto a concentração entre altos níveis nanomolar a micromolar é tóxica- morte neuronal por apoptose ao elevar os níveis de espécies reativas de oxigênio, do citocromo C, e ao ativar a cascata das caspases (DONATO, 2001). Os níveis da proteína S100B podem aumentar extracelularmente [no líquido cérebro-espinal (CSF) e no soro] em decorrência a um dano no SNC, possivelmente devido a uma maior atividade dos astrócitos ou morte deles (ROTHERMUNDT et al, 2003).

A dosagem dos níveis de S100B no CSF, todavia, pode não só avaliar o dano nos astrócitos como também avaliar a integridade da BBB (MARCHI et al., 2003). Níveis elevados de S100B no CSF já foram observados na doença de Alzheimer, na síndrome de Down (GRIFFIN et al., 1989), em lesões cerebrais traumáticas e isquêmicas e na hemorragia subaracnóidea (ROTHERMUNDT et al., 2003), por exemplo. Sugere-se, assim, que as desordens psiquiátricas estão etiológicamente associadas com alteração na barreira hematoencefálica (BBB) e nos astrócitos (SHALEV et al., 2009).

No DMT1, as evidências de dano nos astrócitos ou na BBB através da dosagem da proteína S100B restringem-se ao seu aumento sérico (HOVSEPYAN et al., 2004). Todavia, é importante considerar o fato de que a concentração sérica basal de S100B não é exclusivamente de origem do SNC. Outros tipos celulares, como adipócitos, condrócitos e linfócitos, também produzem e secretam a proteína S100B e, logo, podem ser concomitantemente responsáveis pela concentração sérica observada no DMT1 (DONATO, 2001).

A dosagem da proteína S100B astrogliar no CSF, portanto, deve ser considerada como um bom parâmetro para avaliar a ativação ou a morte glial nas diferentes lesões do SNC (RE et al., 2003; ROTHERMUNDT et al., 2003).

1.4 Hipocampo

O hipocampo é uma das estruturas mais estudada do SNC e é anatomicamente dividido nas áreas de *cornu de Ammon* (CA1 a CA4), representando o hipocampo propriamente dito (LORENTE DE NÓ, 1943) e no giro denteado, cujo formato côncavo forma um invólucro ao redor da área de CA4 [(Figura 5); LANGSTON et al., 2010; FALOUGY; BENUSKA, 2006; DUVERNOY, 1988].

De acordo com a subdivisão descrita por Ramón y Cajal, o *cornu de Ammon* é estratificado em seis camadas microscopicamente distintas: *alveus*, *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiatum*, *stratum lacunosum* e *stratum moleculare* (RAMÓN Y CAJAL, 1974). No *stratum pyramidale* são encontrados os somas dos neurônios piramidais, estando os seus axônios no *stratum alveus* e os seus dendritos no *stratum radiatum* (FALOUGY et al., 2008; SILVA; ARNOLDS, 1978).

O hipocampo propriamente dito, juntamente com o giro denteado, com o complexo subicular e com o córtex entorrinal, compreende a formação hipocampal – um componente do sistema límbico –, estabelecendo com essas estruturas conexões dentre as quais se destaca o circuito anatômico da “via tri-sináptica: do córtex entorrinal, partem aferências corticais para o hipocampo, via feixes de axônios mediais e laterais (chamadas via perforante) as quais realizam sinapses com os neurônios do giro denteado; deste, projetam-se os neurônios (denominados de fibras musgosas) que se comunicam com as células da região CA3 do hipocampo; e por fim, projetam-se, de

CA3, neurônios que deixam o hipocampo – através do fórnix –, ou que fazem conexões com neurônios da área CA1 do hipocampo [(chamados de colaterais de Schaffer); LANGSTON et al., 2010; Van STRIEN et al., 2009].

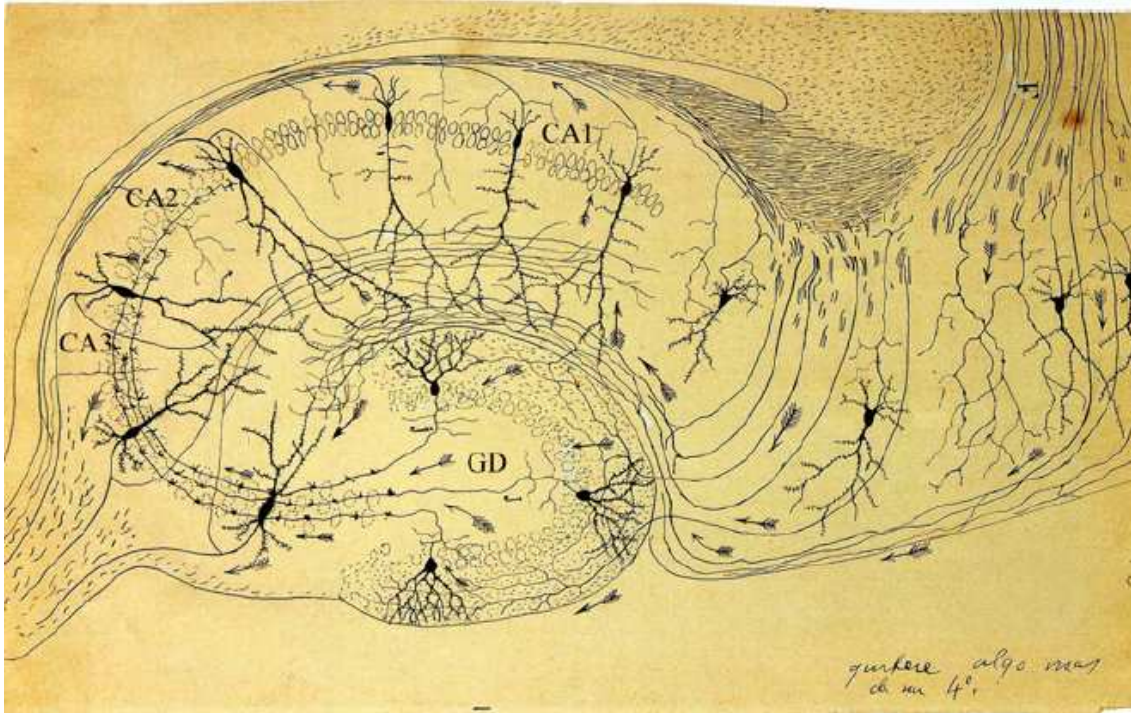


Figura 5: Desenho esquemático de estruturas e de conexões do hipocampo. CA, abreviatura de Corno de Ammon; GD, Giro Denteado (Ramón y Cajal, 1995).

A distribuição e a densidade de capilares, e logo o suprimento vascular, não são homogêneas no hipocampo. A área de CA1 é a região com a menor densidade de capilares, o que a torna, conseqüentemente, suscetível aos diferentes insultos encefálicos e, portanto, uma das áreas mais estudadas do SNC (CAVAGLIA et al., 2001).

Funcionalmente, o hipocampo é a principal estrutura envolvida com a formação de memórias declarativas. Esse tipo de memória está associado com o conhecimento de fatos, de lugares, de pessoas, de coisas e com seus significados. A memória declarativa, por sua vez, distingue-se em dois tipos de memória, a episódica e a semântica (Figura

6), associadas, respectivamente, com lembranças pessoalmente experimentadas, e com lembranças tomadas independentes do contexto em que foram aprendidas (SHARMA et al., 2010).

A memória espacial, envolvida com localização e com movimentação dentro de um ambiente, é conceituada como uma forma de memória episódica (SHARMA et al., 2010), podendo ser danificada após lesões no hipocampo (ASTUR et al., 2002). Em modelos experimentais, ela é avaliada através de diferentes tarefas comportamentais, as quais são utilizadas para mensurar a efetividade de terapias cognitivas ou os mecanismos neurobiológicos e neuroanatômicos envolvidos no processo de aprendizado e de memória (PIAZZA et al., 2010; REVSIN et al., 2008; DERE et al., 2005).

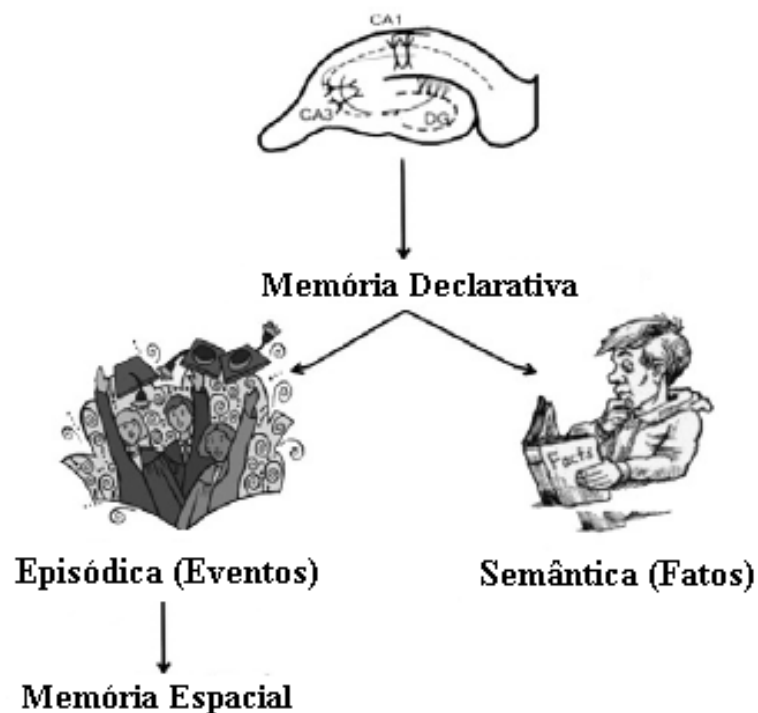


Figura 6: Representação esquemática mostrando os tipos de memória declarativa em memória episódica e semântica e uma subdivisão da memória episódica (modificado de Sharma et al., 2010).

1.5 Déficits Cognitivos

Os danos celular e vascular decorrentes da hiperglicemia crônica prejudicam o metabolismo e a perfusão cerebral podendo determinar déficits cognitivos nos indivíduos com DMT1 (RORIZ-FILHO et al., 2009; WESSELS et al., 2008). Ainda que esses déficits possam ser modestos, ocasionalmente podem se tornar graves (GISPEN, BIESSELS, 2000).

As possíveis bases do processo de aprendizagem e de memória - potencial de longa duração (LTP) e depressão de longa duração [(LTD); STEVENS, 2008], mostram-se alteradas no hipocampo de ratos com DMT1. A partir de seis semanas da indução do diabetes por STZ, evidencia-se que o diabetes do tipo 1 inibe a indução do PLD e facilita a DLD na região CA1 do hipocampo (STRANAHAN et al, 2010; KAMAL et al., 2006, 1999), possivelmente contribuindo para os déficits cognitivos relacionados com o diabetes (GRZĘDA; WIŚNIEWSKA, 2008; RIEDEL et al., 2008).

Crianças com diagnóstico precoce de DMT1 (antes dos 7 anos de idade) tendem a apresentar menor desempenho nas habilidades escolares e verbais (ler, soletrar, contar) quando comparadas a crianças saudáveis (HANNONEN et al., 2010). Adultos cujo diagnóstico de DMT1 também tenha precedido os 7 anos de idade demonstram menor habilidade intelectual e processamento de informação (BRANDS et al., 2005; FERGUSON et al., 2005).

Nos modelos experimentais de DMT1 induzido por STZ o déficit cognitivo é demonstrado quando os animais são submetidos a testes de memória espacial, por exemplo. Na tarefa do labirinto aquático de Morris – *water maze* –, os animais diabéticos despendem um maior tempo – latência – e percorrem uma maior distância para alcançar a plataforma alvo do teste, comparado aos animais controles (GRZĘDA;

WIŚNIEWSKA, 2008; TUZCU; BAYDAS, 2006; BIESELS et al, 1998), enquanto na tarefa de reconhecimento do objeto reposicionado (NOPR), os animais com DMT1 despendem um menor tempo na exploração do objeto reposicionado (REVSIN et al., 2009).

Os testes que avaliam a memória espacial em modelos animais são, portanto, ferramentas essenciais para estudar a efetividade de mecanismos que possam prevenir ou reverter déficits de memória associados a diferentes patologias (SHARMA et al., 2010), inclusive, o diabetes.

Nos estudos com modelo experimental de DMT1, contudo, torna-se importante avaliar, concomitantemente à memória espacial, a atividade locomotora dos animais diabéticos. Uma vez que o diabetes induzido por STZ causa uma redução na habilidade motora (DO NASCIMENTO et al. 2011), mensurá-la torna-se essencial para aferir se o dano motor está intervindo, ou não, no desempenho dos animais nos testes de aprendizado e de memória.

1.6 Exercício Físico

A prática de pelo menos 150 minutos por semana de exercício físico aeróbico em intensidade moderada é recomendada aos indivíduos com DMT1 no intuito de auxiliar o controle dos níveis glicêmicos, de reduzir os riscos cardiovasculares (*American Diabetes Association*, 2010) e a incidência de lesões no SNP associada ao diabetes (BALDUCCI et al., 2006).

Com modelos experimentais de diabetes tipo 1, muito se tem pesquisado acerca dos efeitos do exercício físico sobre a neuropatia diabética, e protocolos de treino em esteira tem sido bem aceito para avaliar a relação entre o treinamento físico e as

respostas no SNP de animais diabéticos (KIM; LEE, 2010; SNOW et al., 2005). Dez semanas de caminhada em esteira, por exemplo, previnem e/ou revertem alterações morfológicas no núcleo e no soma das células A do gânglio da raiz dorsal de L5 (DO NASCIMENTO et al., 2010) e alterações morfométricas da porção proximal do nervo ciático (MALYSZ et al., 2010) encontradas em ratos com diabetes tipo 1.

Os benéficos do exercício físico, no entanto, estendem-se também aos aspectos neurocognitivos. A sua prática regular está associada a menores riscos de desenvolvimento da doença de Alzheimer e outras demências (LAURIN et al., 2001), parecendo, portanto, ser eficaz em prevenir déficits cognitivos (QIANG, 2008).

O melhor desempenho neurocognitivo associado ao exercício físico (ALAEI et al., 2008; ALAEI et al., 2007; ALBECK et al., 2006; ANG et al., 2006) certamente deve-se ao fato do treinamento físico ser capaz de induzir neurogênese, angiogênese, sinaptogênese (LISTA; SORRENTINO, 2010), bem como ser capaz de diminuir a expressão de genes associados com o estresse oxidativo, de aumentar a expressão de genes associados à plasticidade sináptica, à função mitocondrial, aos espinhos dendríticos, evocando aprendizado e memória (STRANAHAN et al., 2008).

Além do mais, o exercício físico possui efeitos positivos sobre a atividade motora (ALAE et al., 2008). A sua influência benéfica sobre a bradicinesia observada no DMT1 experimental (REVSIN et al., 2009) foi recentemente demonstrada em ratos diabéticos quando esses apresentaram melhor desempenho nas tarefas motoras a que foram submetidos associado a um aumento da imunorreatividade da tirosina hidroxilase na Substância Nigra *pars compacta* (DO NASCIMENTO et al., 2011).

Quanto aos estudos sobre os efeitos do exercício físico sobre a resposta de células gliais no SNC, eles são escassos e tampouco são relacionados com aprendizado, com memória e com diabetes.

Em animais saudáveis, o exercício físico em esteira é capaz de promover proliferação astrocitária na zona subgranular do giro denteado (MUNEHIRO UDA et al., 2006), do córtex frontoparietal e do corpo estriado (LI et al., 2005). Porém, com animais diabéticos induzidos por STZ, apenas um estudo foi realizado demonstrando que o treino em esteira promove proliferação celular na zona granular do giro denteado do hipocampo (KIM et al., 2003), sem caracterizar essas células e utilizando um protocolo de treino de apenas seis dias.

Desse modo, ainda não foram estabelecidas as relações entre alterações astrocitárias no estado diabético associado ao efeito do exercício físico e, sobretudo, através de um protocolo de treinamento em esteira de longo prazo.

1.7 Hipótese de Trabalho

Embora existam alguns estudos sobre alterações astrocitárias e sobre os déficits cognitivos nos modelos animais de diabetes tipo 1, ainda não foram estabelecidos os efeitos do exercício físico sobre a resposta dos astrócitos no estado diabético, tampouco associado ao processo de memória e de aprendizado.

Com base nos efeitos benéficos do exercício físico sobre a morfofisiologia dos astrócitos e sobre o processo de memória, e uma vez que a prática de exercício físico é um dos protocolos mais prescritos e utilizados na atenuação dos efeitos deletérios do diabetes mellitus tipo 1 em humanos, este estudo visa investigar os efeitos do treinamento físico sobre a resposta astrocitária e sobre o déficit cognitivo encontrado no estado diabético.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do exercício físico sobre o déficit cognitivo e sobre alterações astrocíticas no hipocampo de ratos machos com diabetes mellitus tipo 1, induzido por estreptozotocina.

1.8.2 Objetivos Específicos

1.8.2.1 Acompanhar a influência do exercício físico sobre a glicemia e o peso corporal de ratos diabéticos submetidos ao exercício físico em esteira;

1.8.2.2 Quantificar os níveis de GFAP no hipocampo e da proteína S100B no hipocampo e no líquido cérebro-espinal através do método de ELISA, em ratos diabéticos submetidos ao exercício físico em esteira;

1.8.2.3 Avaliar a expressão regional de GFAP hipocampal por imunohistoquímica associada à densitometria óptica, em ratos diabéticos submetidos ao exercício físico em esteira;

1.8.2.4 Avaliar a influência do exercício físico sobre a memória espacial, através do teste de reconhecimento do objeto reposicionado, em ratos diabéticos submetidos ao exercício físico em esteira;

1.8.2.5 Avaliar a atividade locomotora em campo aberto de ratos diabéticos submetidos a um protocolo de exercício físico em esteira, e analisá-la através do programa *Any-maze*,

2. MÉTODOS E RESULTADOS

2.1. **Artigo-** Priscylla Nunes de Senna, Jocemar Ilha, Pedro Porto Alegre Baptista, Patrícia Severo do Nascimento, Marina Concli Leite, Mariana Fontoura Paim, Carlos Alberto Gonçalves, Matilde Achaval, Léder Leal Xavier. **Physical exercise improves spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats.**

Artigo submetido à Brain Research.

Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats

Priscylla Nunes de Senna^{a,b}, Jocemar Ilha^{a,b}, Pedro Porto Alegre Baptista^c, Patrícia Severo do Nascimento^{a,b}, Marina Concli Leite^d, Mariana Fontoura Paim^c, Carlos Alberto Gonçalves^{a,d}, Matilde Achaval^{a,b}, Léder Leal Xavier^{c*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

^bLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

^cLaboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

^dDepartamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básica da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil

*Corresponding author:

Léder Leal Xavier (PhD)

Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, prédio 12, sala 144, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90619-900. Phone: (55) (51) 33203545. FAX: (55) (51) 33203568

E-mail address: llxavier@pucri.br

Abstract

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is associated with neurocognitive dysfunction and astrogliosis. Physical exercise prevents cognitive impairments and induces important brain modifications. Thus, the aim of our study was to investigate the effect of treadmill exercise on spatial memory and astrocytic function in the hippocampus of a T1DM model. Fifty-seven Wistar rats were divided into four groups: trained control (TC) (n=15), non-trained control (NTC) (n=13), trained diabetic (TD) (n= 14) and non-trained diabetic (NTD) (n=15). One month after streptozotocin-induced diabetes, exercise groups were submitted to five weeks of physical training, and then, all groups were assessed in the novel object-placement recognition task. Locomotor activity was analyzed in the open field apparatus using Any-maze software. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100B in hippocampus and cerebrospinal fluid were measured using ELISA assay, and hippocampal GFAP immunoreactivity was evaluated by means of immunohistochemistry and optical densitometry. The results showed that physical exercise prevents and/or reverts spatial memory impairments observed in NTD animals ($P<0.01$). Decreased locomotor activity was observed in both the NTD and TD groups when compared with controls ($P<0.05$). ELISA and immunohistochemistry analyzes showed there was a reduction in GFAP levels in the hippocampus of NTD animals, which was not found in TD group. ELISA also showed an increase in S100B levels in the cerebrospinal fluid from the NTD group ($P<0.01$) and no such increase was found in the TD group. Our findings indicate that physical exercise prevents and/or reverts the cognitive deficits and astroglial alterations induced by T1DM.

Keywords: Type 1 Diabetes Mellitus; Treadmill training; Spatial Memory; Astrocytes; GFAP; S100B

1. Introduction

Neuropsychological studies have shown that patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) experience cognitive impairments in processes such as: explicit verbal and nonverbal memory, attention, processing speed and intellectual development (Roriz-Filho et al., 2009). “Memory loss” is a complaint in their anamneses (Wessels et al., 2008). Animal models of T1DM also reveal learning and memory deficits, which is become notably apparent during the performance of behavioral tasks, such as water maze test and novel object-placement recognition task (Kim et al., 2003; Reisi et al., 2009; Revsin et al., 2009). Furthermore, studies with diabetic rats have shown neuronal apoptosis, decreased neurogenesis and astrocytic reactivity in the hippocampus (Beauquis et al., 2006; Li et al., 2002), suggesting that astrocytic dysfunction could contribute to cognitive function decline since astrocytes have a critical role in neuronal activity (Nardin et al., 2007).

Glial fibrillary acid protein (GFAP) is commonly used as a marker of astrogliosis and astrocyte activation in several situations involving brain injury and decreased GFAP levels have been reported to be a consequence of hyperglycemia (Lechuga-Sancho et al., 2006a). S100B is also an astroglial protein which has been used as a parameter of glial activation and/or death in several types of brain injury (Gonçalves et al., 2008), and/or blood-brain barrier (BBB) disruption (Marchi et al., 2003). Increased levels of S100B protein in cerebrospinal fluid (CSF) are associated with increased permeability of the BBB and has been observed in brain disorders such as Alzheimer disease, Down syndrome (Griffin et al., 1989), ischemia and traumatic brain damage (Rothermundt et al., 2003). In animal models of diabetes, changes in S100B levels have not been consistently demonstrated.

It is well known that, under normal conditions, physical exercise induces psychological and cognitive improvements in humans (Qiang, 2008), enhances behavioral performance of animals in spatial memory tasks (Alaei et al., 2007; Alaei et al., 2008; Albeck et al., 2006), and increases brain cell proliferation (Li et al., 2005; Uda et al., 2006). Since cognitive deficits in diabetes are associated with astrocytic dysfunction, the aim of the study was to analyze the possible benefits of physical activity in Wistar rats submitted to an experimental model of T1DM, by evaluating the following parameters: spatial memory, locomotor activity and expression of glial fibrillary acidic proteins (GFAP) and S100B protein, using ELISA and immunohistochemistry.

2. Results

2.1. Blood glucose levels and body weight

Blood glucose levels significantly increased 48 h after diabetes induction in streptozotocin-induced diabetic rats ($P < 0.05$), demonstrating that T1DM induction was successful. Furthermore, throughout the duration of the experiment, blood glucose levels were higher in the NTD and TD groups when compared with the control groups ($P < 0.001$; Fig. 1A). Significant weight loss was observed in the NTD and TD groups when compared to the NTC and TC groups ($P < 0.01$). Then, the physical exercise protocol, used in our study, did not affect the streptozotocin-induced blood glucose levels and weight changes (Fig. 1A and B).

2.2. Locomotor activity and spatial memory analysis

The use Any Maze software to analyze the locomotor activity showed that the diabetic groups present reduced locomotor activity when compared with controls groups as shown by the lower number of lines crossed [(p<0.05); Fig.2A], and in the reduced distance travelled [(p<0.01); Fig. 2B]. A degree of bradikinesia could be observed when the average speed of diabetic groups was compared to control groups, a significant reduction in the average speed was recorded in the diabetic groups [(p<0.001); Fig.2C].

Analyzing the behavioral effects as shown by the use of the novel object-placement recognition task, no significant differences were found between the groups in the following parameters measured in zone 12: 1 – Total time spent, 2 – Duration of the visit, 3 – Number of entries, 4 – Latency to the first entry and first exit, 5 – Time of longest and shortest visit, 6 – Time mobile and time immobile, 7 – Minimum and maximum distance from the zone, 8 – Time moving toward the relocated object, 9 – Distance of animal's head from the relocated object and 10 – Time the animal's head was oriented toward the object (data not shown).

Figure 3 shows the results of the spatial memory test. It can be seen that the animals from the NTD group spent less time exploring the relocated object than all the other groups (P<0.01), this reduction was prevented/reverted by physical training in the TD group (Fig. 3).

2.3. Biochemical assays for GFAP and S100B

Biochemical assays showed that diabetes induced a significant decrease in GFAP content in the hippocampus (P<0.05) which was prevented and/or reverted by

physical exercise. Trained diabetic rats showed higher GFAP protein content compared to non-trained diabetic rats, which was similar to control levels [(P< 0.05); Fig.4A].

Similarly, the S100B content in CSF was significantly higher in the NTD group when compared to all the other groups (P<0.01). This increase was prevented/ reverted by physical exercise in the trained diabetic animals, which presented similar S100B values to those found in the trained and non-trained control groups (Fig.4B). No significant difference was detected between the groups in the hippocampal S100B content (data not shown).

2.4. GFAP immunoreactivity

Astrocytic cell bodies and processes were identified in the stratum radiatum of CA1 as shown in Fig.5A. In the NTD group the astrocytes were mainly fusiform in shape, due to few astrocytic branching, while stellate shapes were observed less often, when compared to the other groups. In the TD group, the morphology of the astrocytes was similar to that of the control groups. The astrocytic primary processes were normal in length, and presented a more stellate shape.

Densitometric measurements of GFAP immunoreactivity in the stratum radiatum of CA1 showed that immunoreactivity decreased in the diabetic rats (p<0.01), and that physical exercise was effective in preventing and/or reverting this decrease (p<0.001). No significant differences were observed between the trained control, non-trained control and trained diabetic groups (Fig. 5)

3. Discussion

In the present study, diabetic rats showed hyperglycemia and weight loss, and as expected, physical exercise did not affect blood glucose levels and body weight (Kim et al., 2003; Malysz et al., 2010; Do Nascimento et al., 2010, 2011).

As previously described (Revsin et al., 2009), Diabetic animals walked more slowly and for shorter distances in the novel object-placement recognition task [(NOPR; Fig.2 A and B)]. Interestingly, the other behavioral parameters measured in zone 12 (see above, subsection 4.6.2) did not differ between the groups. Although, previous studies have reported that treadmill running enhances locomotor activity (Alaei et al., 2008; Do Nascimento et al., 2011; Malysz et al., 2010; Reisi et al., 2009), in our study physical exercise was unable to improve locomotor activity in both the trained control and trained diabetic groups when compared with the non-trained control and non-trained diabetic groups, respectively (Fig.2C). These discrepancies between the results of the present study and those of other studies could be related to the differences in the physical exercise protocols employed. In the protocol used by Reisi and co-workers (2009), the rats were submitted to treadmill running at a speed of 17 m/min for 40 min daily, 7 days a week, for 12 weeks. Alaei and co-workers (2008) used a treadmill exercise session of 1 h, during 6 weeks, at the same speed of 17 m/min. Nascimento and cols. (2011), as well as Malysz and cols. (2010), used a twice daily, 1 h treadmill exercise sessions, 5 days a week, during 8 and 10 weeks, respectively. In the present study, the running speed was lower (10.1 m/min for the TC group and 8.2 m/min for the TD group). In fact, the protocols used in these previous studies are more robust in terms of velocity and duration. The increases in locomotor activity observed in these studies could be related to the intensity and duration of the protocols employed, whereas our physical exercise protocol may not have been sufficiently demanding to induce these changes. Additionally, the first week of our protocol was used to adapt the animals to

the physical exercise protocol. Thus, the time effectively used for the training was 4 weeks.

Ours findings for the NOPR task showed that the NTD rats spend less time exploring the relocated object (Fig.3), which confirms the results of previous studies (Biessels et al., 1998; Grzeda and Wisniewska, 2008; Tuzcu and Baydas, 2006) where T1DM was shown to induce spatial memory impairments.

The TD group spent significantly more time exploring the relocated object in zone 12 than the NTD rats (Fig.3). This enhancement in spatial memory found in the TD group when compared with NTD animals is probably related to the fact that physical exercise improves parameters such as: neurogenesis, cell proliferation (Kim et al, 2003; Ra et al., 2002; van Praag et al., 1999a; van Praag et al., 1999b), long-term potentiation (LTP), synaptic plasticity (Qiang, 2008; Reisi et al., 2010), besides increase the expression of neurotrophic factors, as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Gomes da Silva et al., 2010), and prevents oxidative stress (Stranahan et al., 2008). In contrast, hyperglycemia associated to diabetes induces a reduction in neurogenesis (Alvarez et al., 2009) and increases oxidative stress (Tuzcu et al., 2006) and neuronal death (Hawkins and Davies, 2001). Furthermore, since locomotor activity was impaired in both diabetic groups, this parameter had no influence in the memory task result. Thus, the results suggest that the physical exercise protocol used in our study was capable of preventing, to some degree, the deterioration of cognitive function induced by diabetes.

In the present biochemical results, it was observed that diabetes induced a decrease in hippocampal GFAP levels, which was completely reversed in the TD animals (Fig.4A). A reduction in GFAP levels has been demonstrated in the brains of diabetic animals (Baydas et al., 2003; Coleman et al., 2004; Lechuga-Sancho et al.,

2006a; Lechuga-Sancho et al., 2006b) probably as a chronic consequence of hyperglycemia (Lebed et al., 2008). Physical exercise has been shown to induce astrocyte proliferation in the cortex and striatum of healthy animals (Li et al., 2005). Our study is the first to demonstrate increased hippocampal GFAP levels in diabetic animals following running exercise on a treadmill apparatus. Thus, our findings provide evidence that physical training prevents and/or reverts the diabetes-induced GFAP reduction in the hippocampus.

Our data shows that the S100B content was extremely high in the CSF of the non-trained diabetic animals and unaltered in trained diabetic group. S100B protein has commonly been used as a marker for brain injury (Gonçalves et al., 2008), and an increase in S100B levels in the CSF has been reported in several brain damage models (Bartosik-Psujek et al., 2010; Griffin et al., 1989; Schimidt et al., 2010). Our study is the first to extend these findings to T1DM. These findings regarding CSF levels of S100B protein probably indicate that STZ-induced T1DM could be associated with disruption of the BBB (Blyth et al., 2009; Marchi et al., 2003; VanGilder et al., 2009) or astrocytic damage (Rothermundt et al., 2003). The high S100B content in the CSF together with the reduced hippocampal GFAP levels in the non-trained diabetic animals also lends weight to the idea that astrocytic cell death is related to the release of S100B in CSF (Rothermundt et al., 2003).

Although few studies have been published on physical activity associated to the BBB, physical exercise has been shown to enhance BBB integrity, thus reducing brain injury, after focal ischemia in rats (Guo et al., 2008). Additionally, it has been suggested that astrocyte proliferation after exercise coupled with angiogenesis may improve the neurovascular unit (Li et al., 2005), a structure consisting of microvascular endothelium, astrocytes, neurons and extracellular matrix. In our study, we have demonstrated that

running exercise is effective in suppressing the high S100B levels observed after STZ-induced diabetes, showing that physical exercise may protect the BBB from disruption induced by T1DM or other types of brain injury.

On the other hand, our findings regarding the hippocampal S100B show there is no difference between any of the groups. A previous immunohistochemical study failed to find any difference in S100B astrocytic immunoreactivity in the hippocampus, cerebellum or corpus callosum between control and diabetic animals (Coleman et al., 2004). However, studies involving experimental diabetes have reported contradictory results for hippocampal S100B levels. Increased S100B protein was observed after six weeks of STZ injection by Baydas and co-workers (2003). Lebed and co-workers (2008) described an increase in S100B levels after three days of STZ-diabetes induction, demonstrating a progressive reduction in these levels on seventh and fourteenth day after diabetes induction.

These apparently contradictory findings for S100B protein are probably due to the time after diabetes induction when the protein analyses were performed. Additionally, the different protocols used to assay this protein may lead to these discrepancies: western blot (Baydas et al., 2003), immunohistochemistry (Coleman et al., 2004; Lebed et al., 2008) and ELISA, used in the present study.

Morphological changes in astrocytes in the stratum radiatum of CA1 after physical activity were observed in the TD group, which led astrocytes to change from their usually fusiform morphology (Bushong et al., 2002) to a more stellate shape. This finding is probably relevant for the interaction between astrocytes and synaptic terminals and related to hippocampal synaptic plasticity (Viola et al., 2009).

To confirm astrocytic response, we evaluated the intensity of the GFAP immunoreactivity using semi-quantitative densitometric analysis. The non-trained

diabetic animals presented a decrease in GFAP immunoreaction in the stratum radiatum of the hippocampal CA1, while GFAP immunoreactivity increased in the trained diabetic animals. Increased GFAP immunoreactivity was also demonstrated in the hippocampal dentate gyrus of adult animals submitted to chronic treadmill running (Albeck et al., 2006). Nevertheless, prior to the present study, no experimental approach had shown changes in hippocampal GFAP levels in a T1DM animal model.

In summary, our findings demonstrate that treadmill running exercise prevents and/or reverts diabetes-induced spatial memory deficits, since the trained diabetic rats performed better in the novel object-placement recognition task. The physical exercise protocol proved effective at preventing and/or reverting astrocyte alterations, since the elevated levels of S100B in cerebrospinal fluid and the reductions in GFAP levels in the hippocampus of the diabetic rats were reverted in diabetic animals submitted to a five-week treadmill training protocol.

Since this study only assessed spatial memory and astrocytic alterations at the end of the treadmill protocol, without evaluating these parameters along the experiment, we cannot state whether physical exercise prevents or reverses the cognitive deficits and astroglial alterations induced by DMT1. Nevertheless, previous studies have demonstrated that astrocytes are dramatically affected in the hippocampus (Coleman et al., 2004) and in the cerebellum (Coleman et al., 2014; Lechuga-Sancho et al., 2006b) 4 weeks after STZ diabetes induction, with no effect on GFAP levels in the hypothalamus (Lechuga-Sancho et al., 2006a) or cerebellum (Lechuga-Sancho et al., 2006b) at 1 and 2 weeks following the onset of diabetes, suggesting that physical exercise in this present study probably reverted spatial memory impairment and astrocytic changes.

Nevertheless, these findings corroborate those of previous studies, where physical activity is shown to improve different physiological parameters in T1DM.

Additionally, our study is the first to demonstrate that T1DM induces important changes in GFAP and S100B levels and fortunately these changes are prevented/reverted by physical exercise training.

4. Materials and methods

4.1. Animals

The experiment was performed on three-month old male Wistar rats, weighing 280 g to 390 g, obtained from a local breeding colony (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil). Animals were housed in standard plexiglass boxes (three per cage) under standard laboratory conditions (temperature $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 12:12-h light/dark cycle, with food and water *ad libitum*). All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institute of Health (USA) and the Brazilian Laws for animal care and ethical use of animals. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul [(UFRGS) (protocol number: 2008105) and all efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals needed.

4.2. Experimental design

Fifty seven animals were randomly divided into four groups: non-trained control (NTC) (n=13), trained control (TC) n=15), non-trained diabetic (NTD) (n=14) and trained diabetic (TD) (n=15). Each group was subdivided, with 6 animals for detection

of GFAP and S100B using ELISA and the remainder for the GFAP immunohistochemical study.

4.3. Diabetes induction

Type 1 diabetes mellitus was induced with a single intravenous injection into the tail vein of streptozotocin (STZ) (Sigma Chemicals, Co., USA) dissolved in 0.01M citrate buffer, pH 4.5 (50 mg/kg of corporal weight), after a 6 h fasting period. Control groups received only citrate buffer. Glycemia was evaluated in blood collected from the rat tail vein (test strips, Advantage, Roche, Indianapolis, In, USA) 48 h after the STZ injection to confirm the T1DM, and every 2 weeks following STZ/citrate buffer injection, following a 6 h morning fasting. Diabetes was defined as a fasting glucose level of 300 mg/dL or higher (Do Nascimento et al., 2010).

On the 20th day after diabetes induction, all animals underwent adaptation to a treadmill apparatus.

4.4. Treadmill adaptation and maximal exercise test (MET)

The animals were adapted to the treadmill over a four-day period, walking at 5 m/min for 10 min. On the fifth day, they were submitted to the MET, which consisted of a graded treadmill exercise with speed increments of 5 m/min every 3 min, starting at 5 m/min and continuing up to the maximal intensity attained by each rat (Melo et al., 2003). The values obtained in the MET were used to plan a moderate intensity exercise protocol (Rodrigues et al., 2007).

4.5. Treadmill training

The physical exercise consisted of running on the treadmill for 20 min on the first day, this training period was progressively increased every day up to 60 min on the sixth day, which was maintained for the next 4 weeks. Each training session included a warm up period of 5 min running at 30% of the maximal speed reached in the MET (6.3 m/min for TC and 5.1 m/min for the TD group), 10 to 50 min running at 50% to 60% (~10.1 m/min for TC and 8.2 m/min for the TD group) and 5 min recovery at 30% again (6.3 m/min for TC and 5.1 m/min for the TD group), 5 sessions per week, once a day during 5 weeks, at 0° of inclination (Ilha et al., 2008). This training program was considered a moderate-intensity endurance regime because the animals ran for a long time at 50% to 60% of the maximal speed reached in their MET (Rodrigues et al., 2007).

One day after the last training session, all animals were submitted to a spatial memory test in which locomotor activity was assessed.

4.6. Analyses of spatial memory and locomotor activity

4.6.1. Open field

Spatial memory and locomotor activity were evaluated using the open field apparatus (50 x 60 x 40cm), consisting of a roofless box with plywood walls in which the floor was divided into 12 equally-sized quadrants. A video camera was mounted 100 cm above the center of the open field. The novel object-placement recognition task (NOPR) was used to assess spatial memory and two identical objects (plastic bottles,

0.5 L, filled with water) were used to evaluate object exploration. All animals were habituated to the open field one day before the memory task, by being placed inside an opaque cylinder in the center of the apparatus (Revsin et al., 2009), and released after 10 seconds to allow the rats to explore the environment for 3 min (Piazza et al., 2010). One day after habituation, sixty days after diabetes induction, and one day after the end of the physical exercise protocol, animals were submitted to the memory task.

4.6.2. Novel object-placement recognition task (NOPR)

Each animal received one sample trial and a test trial. In the sample trial, animals were placed inside the open field containing two bottles placed in two quadrants – one in the northwest quadrant (zone 1) and one in the southwest quadrant (zone 3) – and allow to explore for 5 min (Piazza et al., 2010). Fifty minutes after the end of the sample trial, the test trial began under identical conditions except that one of the bottles (from zone 3) was moved to the southeast quadrant (zone 12) in order to analyze the exploration of the relocated object. After each trial, the apparatus and objects were cleaned with a 75% ethanol solution.

Time exploring the relocated object was defined as described by Revsin and co-workers (2009), where exploration is considered to occur when the animal is at least 2 cm from the object (the bottle) and/or in physical contact with it, defined as being when the rat touches the object with the snout, forepaws or vibrissae. Locomotor activity and behavior were analyzed with the aid of Any-maze software. The number of line crossings, total distance travelled and average speed in the open field were measured, as was the total time spent in zone 12, the duration of each visit, the number of entries, the latency to the first entry and first exit, the time of longest and shortest visit, the time

mobile and time immobile, the minimum and maximum distance from zone 12, in addition to time spent moving toward the relocated object, distance of animal's head from the relocated object and time that the animal's head was oriented toward the object.

4.7 GFAP and S100B biochemical analysis

In the day after the behavioral analysis, twenty four rats (6 animals per group) were anesthetized using ketamine (90 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) (i.p.) and then positioned in a stereotaxic holder for cerebrospinal fluid (CSF) collection from cistern magna. The puncture was performed using an insulin syringe (27 gauge x ½" length). Rats were then removed from the stereotaxic apparatus and killed by decapitation, brains were removed, and hippocampi were dissected out and placed in cold saline solution. Hippocampal samples were then homogenized in specific buffers for biochemical measurements, described as follows.

S100B content in the CSF and hippocampus was measured using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (Leite et al., 2008). Briefly, 50 µL of sample plus 50 µL of Tris buffer (pH 8.6) were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B (Dako,UK) was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. A colorimetric reaction with ophenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 1.9 pg/mL to 1 ng/mL.

ELISA for GFAP (Dako, UK) was carried out by coating the microtiter plate with 100 µL samples containing 30 µg of protein for 24 h at 4 °C. Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit for 1 h was followed by incubation with a secondary

antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL (Tramontina et al., 2007).

4.8. GFAP Immunohistochemistry

One day after the memory task, nine weeks after diabetes induction, all rats were anesthetized using ketamine (90 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) (i.p.) Twenty eight animals (7 per group) were perfused through the left cardiac ventricle, using a peristaltic pump (Milan, Brazil, 50 mL/min), with 200 mL of saline solution followed by 200 ml of fixative solution of 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Heparin (1000 IU; Cristalia, Brazil) was previously injected into the left cardiac ventricle.

Brains were extracted from the skull, post-fixed for 4 h in the same fixative solution at room temperature, cryoprotected in 30% sucrose (Synth, Brazil) solution in PB at 4 °C until they sank, and then frozen in liquid nitrogen (Nitrovet, Brazil). After these procedures the brains kept in a freezer (- 70 °C) for further analyses.

Coronal brain sections (50 µm) were obtained using a cryostat (Leica, Germany) from between the coordinates interaural 6.7 mm, bregma 2.3 mm and interaural 4.8 mm, bregma -4.16 mm, according to Paxinos and Watson's Atlas (1997). Brain sections were collected in phosphate-buffered saline (PBS) and processed for GFAP immunohistochemistry following the unlabeled antibody peroxidase – antiperoxidase (PAP) procedure (Sternberger, 1979). Free floating sections were washed and blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS containing 0.4% Triton X-100 (PBS-Tx, Sigma Chemical Co., USA) for 30 min. Then, they were incubated with polyclonal GFAP antiserum raised in rabbit (Dako, UK) diluted 1:500 in 0,3% of PBS-Tx for 48 h

at 4 °C. After being washed two times with PBS-Tx, sections were incubated in anti-rabbit IgG (Amersham, UK) diluted 1:50 in PBS-Tx at room temperature for 2 h. The reaction was developed by incubating the sections in a medium containing 0.06% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, SigmaChemical Co., USA) dissolved in PBS for 10 min and in the same solution containing 1 µL of 3% H₂O₂ per mL of DAB medium for an additional 10 min. Finally, sections were rinsed in PBS, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and covered with Permount and coverslips. A few sections were prepared omitting the primary antibody by replacing it with PBS as a control to rule out unspecific binding. The brains in both experimental groups were fixed and post-fixed for the same time in identical solutions, processed at the same time, and incubated in the same immunostaining medium for the same period of time, in order to minimize differences in the staining of astrocytes and in background levels (Viola et al., 2009).

4.9. Evaluation of GFAP immunoreactivity

Firstly, the images of the GFAP immunostained sections were carefully observed by two independent researchers using a Nikon Eclipse E-600 microscope (500×, Japan) and a single descriptive, non quantitative, analysis was performed. After this, the GFAP immunoreactivity was evaluated by means of regional semi-quantitative optical densitometry (Viola et al., 2009; Xavier et al., 2005), using the same microscope, coupled to a CCD camera and Image Pro Plus software 6.1. Digitized images obtained from the selected areas were converted to an 8-bit gray scale [(256 gray levels); Viola et al., 2009]. All lighting conditions and magnifications were kept constant during the capture process. Five images were analyzed in the stratum radiatum of the CA1 in the hippocampus from each animal (four fields were analyzed per

section). Optical density, background correction and background staining subtraction were measured according to the previously described protocol (Xavier et al., 2005).

4.10. Statistical Analysis

Data for all variables are expressed as mean \pm standard error. Repeated measures analyses of variance (ANOVA) was used for blood glucose and weight comparisons between groups. Two-way ANOVA followed by Duncan post-hoc, were used to analyze all other data. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. STATISTICA 9 software was used in all statistical analyses.

Acknowledgements

This research was supported by UFRGS and the Brazilian funding agencies CNPq and CAPES. We are grateful to Silvia Barbosa and Antonio Generoso Severino for their technical assistance. Priscylla Senna was supported by an MSc scholarship from CAPES and Carlos Alberto Gonçalves, Matilde Achaval and Léder Leal Xavier are CNPq investigators.

References

Alaei, H.A., Moloudi, R.A., Sarkaki, A.R., Azizi-Malekabadi, H., Hanninen, O., 2007. Daily running promotes spatial learning and memory in rats. *Pathophysiology* 14, 105–108.

Alaei, H.A., Moloudi, R.A., Sarkaki, A.R., 2008. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *J. Bodyw. Mov. Ther.* 12, 72–75.

Albeck, D.S., Sano, K., Prewitt, G.E., Dalton, L., 2006. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behav. Brain Res.* 168, 345–348.

Alvarez, E.O., Beauquis, J., Revsin, Y., Banzan, A.M., Roig, P., De Nicola, A.F., Saraiva, F., 2009. Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behav. Brain Res* 198, 224–230.

Asl, N.A., Sheikhzade, F., Torchi, M., Roshangar, L., Khamnei, S., 2008. Long-term regular exercise promotes memory and learning in young but not in older rats. *Pathophysiology* 15, 9–12.

Baydas, G., Nedzvetskii, V.S., Tuzcu, M., Yasar, A., Kirichenko, S.V., 2003. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. *Eur. J. Pharmacol.* 462, 67–71.

Bartosik-Psujek, H., Psujek, M., Jaworski, J., Stelmasiak, Z., 2010. Total tau and S100b proteins in different types of multiple sclerosis and during immunosuppressive treatment with mitoxantrone. *Acta Neurol. Scand.* 123, 252–256.

Beauquis, J., Roig, P., Homo-Delarche, F., De Nicola, A., Saravia, F., 2006. Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurons in streptozotocina-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1539–1546.

Biessels, G.J., Kamal, A., Urban, I.J., Spruijt, B.M., Erkelens, D.W., Gispen, W.H., 1998. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res.* 800, 125–135.

Blyth, B.J., Farhavar, A., Gee, C., Hawthorn, B., He, H., Nayak, A., Stocklein, V., Bazarian, J.J., 2009. Validation of serum markers for blood-brain barrier disruption in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 26, 1497–1507.

Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., Ellisman, M.H., 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22, 183–192.

Coleman, E.S., Judd, R.L., Hoel, J., Dennis, J., Posner, P., 2004. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia* 48, 166–178.

Do Nascimento, P.S., Malysz, T., Ilha, J., Araujo, R.T., Hermel, E.E., Kalil-Gaspar, P.I., Faccioni-Heuser, M.C., Schaan, B.D., Achaval, M., 2010. Treadmill training

increases the size of A cells from the L5 dorsal root ganglia in diabetic rats. *Histol Histopathol*, 25, 719–732.

Do Nascimento, P.S., Lovatel, G.A., Barbosa, S., Ilha, J., Centanaro, L.A., Malysz, T., Xavier, L.L., Schaann, B.D., Achaval, M. 2011. Treadmill training improves motor skills and increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta in diabetic rats, *Brain Res.* 1382, 173-180.

Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 1997. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.

Gomes da Silva, S., Unsain, N., Masco, D.H., Toscano-Silva, M., de Amorim, H.A., Silva Araújo, B.H., Simões, P.S., da Graça Naffah-Mazzacoratti, M., Mortara, R.A., Scorza, F.A., Cavalheiro, E.A., Arida, R.M., 2010. Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. *Hippocampus*. DOI 10.1002/hipo.20903.

Gonçalves, C.A., Leite, M.C., Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin. Biochem.* 41, 755–763.

Griffin, W.S., Stamley, L.C., Ling, C., White, L., Macleod, V., Perrot, L.J., White, C.L., Araoz, C., 1989. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in down syndrome and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7611–7615.

Grzęda, E., Wiśniewska, R., 2008. Differentiations of the effect of NMDA on the spatial learning of rats with 4 and 12 week diabetes mellitus. *Acta Neurobiol. Exp.* 68, 398–406.

Guo, M., Cox, B., Mahale, S., Davis, W., Carranza, A., Hayes, K., Sprague, S., Jimenez, D., Ding, Y., 2008. Pre-ischemic exercise reduces matrix metalloproteinase-9 expression and ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke. *Neuroscience* 151, 340–351.

Hawkins, C.L., Davies, M.J., 2001. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 196–219.

Ilha, J., Araujo, R.T., Malysz, T., Hermel, E.E., Rigon, P., Xavier, L.L., Achaval, M., 2008. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 22, 355–366.

Kim, H.B., Jang, M.H., Shin, M.C., Lim, B.V., Kim, Y.P., Kim, K.J., Kim, E.H., Kim, C.J., 2003. Treadmill exercise increases cell proliferation in dentate gyrus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Diabetes Complications* 17, 29–33.

Lebed, Y.V., Orlovsky, M.A., Nikonenko, A.G., Ushakova, G.A., Skibo, G.G., 2008. Early reaction of astroglial cells in rat hippocampus to streptozotocin-induced diabetes. *Neurosci. Lett.* 444, 181–185.

Lechuga-Sancho, A.M., Arroba, A., Frago, L.M., García-Cáceres, C., Célix, A.D.R., Argente, J., Chowen, J.A., 2006a. Reduction in the number of astrocytes and their projections is associated with increased synaptic protein density in the hypothalamus of poorly controlled diabetic rats. *Endocrinology* 47, 5314–5324.

Lechuga-Sancho, A.M., Arroba, A., Frago, L.M., Pañeda, C., García-Cáceres, C., Célix, A.D.R., Argente, J., Chowen, J.A., 2006b. Activation of the intrinsic cell death pathway, increased apoptosis and modulation of astrocytes in the cerebellum of diabetic rats. *Neurobiol. Dis.* 23, 290–299.

Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M., Gottfried, C., Gonçalves, C.A., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99.

Li, Z.G., Zhang, W., Grunberger, G., Sima, A., 2002. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res.* 946, 221–231.

Li, J., Ding, Y.H., Rafols, J., Lai, Q., McAllister, J.P., Ding, Y., 2005. Increase astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neurosci. Lett.* 386, 160–164.

Malysz, T., Ilha, J., I Do Nascimento, P.S., De Angelis, K, D'agord Schaan, B., Achaval, M., 2010. Beneficial effects of treadmill training in experimental diabetic nerve regeneration. *Clinics (Sao Paulo)*, 65, 1329–1337

Marchi, N., Rasmussen, P., Kapural, M., Fazio, V., Kight, K., Mayberg, M.R., Kanner, A., Ayumar, B., Albeni, B., Cavaglia, M., Janigro, D., 2003. Peripheral markers of brain damage and blood–brain barrier dysfunction. *Restor. Neurol. Neurosci.* 21, 109–121.

Melo, R.M., Martinho, E. Jr., Michelini, L.C., 2003. Training-induced pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and non exercised muscles. *Hypertension* 42, 851–857.

Nardin, P., Tramontina, F., Leite, M.C., Tramontina, A.C., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L.M., Battastini, A.M., Gottfried, C., Gonçalves, C.A., 2007. S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem. Int.* 50, 774–782.

Piazza, F.V., Pinto, G.V., Trott, G., Marcuzzo, S., Gomez, R., Fernandes, M.C., 2010. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behav. Brain Res.* 217, 16–20.

Qiang, Ma, 2008. Beneficial effects of moderate voluntary physical exercise and its biological mechanisms on brain health. *Neurosci. Bull.* 24, 265–270.

Ra, S.M., Kim, H., Jang, M.H., Shin, M.C., Lee, T.H., Lim, B.V., Kim, C.L, Kim, E.H., Kim, K.M, Kim, S.S., 2002. Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats. *Neurosci. Lett.* 333, 123–126.

Reisi, P., Alaei, H., Babri, S., Sharifi, M.R., Mohaddes, G., 2009. Effects of treadmill running on spatial learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci. Lett.* 455, 79–83.

Reisi, P., Babri, S., Alaei, H., Sharifi, M.R., Mohaddes, G., Noorbakhsh, S.M., Lashgari, R., 2010. Treadmill running improves long-term potentiation (LTP) defects in streptozotocin-induced diabetes at dentate gyrus in rats. *Pathophysiology* 17, 33–38.

Revsin, Y., Saravia, F.E., Roig, P., Lima, A., Kloet, E.R., Homo-Delarche, F., De Nicola, A.F., 2005. Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes. *Brain Res.* 1038, 22–31.

Revsin, Y., Rekers, N.V., Louwe, M.C., Saravia, F.E., Nicola, A.F., Kloet, E.R., Oitzl, M.S., 2009. Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology* 34, 747–758.

Rodrigues, B., Figueroa, D.M., Mostarda, C.T., Heeren, M.V., Irigoyen, M.C., De Angelis, K., 2007. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc. Diabetol.* 13, 6–38.

Roriz-Filho, J., Sá-Roriz, T.M., Rosset, I., Camozzato, A.L., Santos, A.C., Chaves, M.L., Moriguti, J.C., Roriz-Cruz, M., 2009. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 432–443.

Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J.H., Arolt, V., 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. and Tech* 60, 614–632.

Schmidt, H., Gerber, J., Stuartz, K., Djukic, M., Bunkowski, S., Fischer, F.R., Otto, M., Nau, R., 2010. S100B in the cerebrospinal fluid- a marker for glial damage in the rabbit model of pneumococcal meningitis. *Neurosci. Lett.* 475, 104–107.

Sternberger, L.A., 1979. The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. *J. Histochem. Cytochem.* 27, 1657.

Stranahan, A.M., Lee, K., Becker, K.G., Zhang, Y., Maudsley, S., Martin, B., Cutler, R.G., Mattson, M.P., 2008. Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of aging memory by running in aged mice. *Neurobiol. Aging* 31, 1937–1949.

Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andreazza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., Gonçalves, C.A., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J. Neurosci. Methods* 162, 282–286.

Tuzcu, M., Baydas, G., 2006. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Europ. J. Pharmacol.* 537, 106–110.

Uda, M., Ishido, K., Kami, K., Masuhara, M., 2006. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Res.* 1104, 64–72.

VanGilder, R.L., Kelly, K.A., Chua, M.D., Ptachcinski, R.L., Huber, J.D., 2009. Administration of sesamol improved blood–brain barrier function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp. Brain Res.* 197, 23–34.

Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 1999a. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2, 266–279.

Van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H., 1999b. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13427–13431.

Viola, G., Rodrigues, L., Américo, J., Hansel, G., Vargas, R., Biasibetti, R., Swarowsky, A., Gonçalves, C.A., Xavier, L.L, Achaval, M., Souza, D.O, Amaral, O.B., 2009. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res.* 1274, 47–54.

Wessels, A.M., Scheltens, P., Barkhof, F., Heine, R.J., 2008. Hyperglycaemia as a determinant of cognitive decline in patients with type 1 diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 88–96.

Xavier, L.L., Viola, G., Ferraz, A.C., Cunha, C., Deonizio, J.M.D., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res. Protocols* 16, 58–64.

Legends

Fig.1 – Blood glucose (**A**) and body weight (**B**) values obtained in pre, post and following experimental weeks after STZ induction. * $p < 0.001$ comparing the diabetic groups and control groups.

Fig.2 – Behavioral measurements (mean \pm SEM) in the novel object-recognition task, obtained using Any-Maze software, showing the locomotor activity. Graphs **A**: number of line crossing; **B**: distance travelled; **C**: average speed. a = significant difference compared with the NTC group ($p < 0.05$); b = significant difference compared with TC group ($p < 0.05$).

Fig. 3 – Exploration measurements (mean \pm SEM) of the relocated object in the novel object-recognition task; * $p < 0.05$ comparing the NTD group with all other groups.

Fig. 4 – Biochemical analyses showing the effects of physical exercise (mean \pm SEM) in the hippocampal GFAP content (**A**) and in the cerebrospinal fluid S100 β content (**B**). * $p < 0.05$ comparing the NTD group with all other groups.

Fig. 5 – GFAP immunoreactivity in the stratum radiatum of the hippocampal CA1 area. **A**: digitized images of a coronal section in CA1 area from non-trained control (NTC), trained control (TC), non-trained diabetic (NTD) and trained diabetic (TD) groups; **B**: optical density measurement (OD) of GFAP immunoreactivity. ** $p < 0.01$ comparing the NTD group to all other groups.

Figure 1

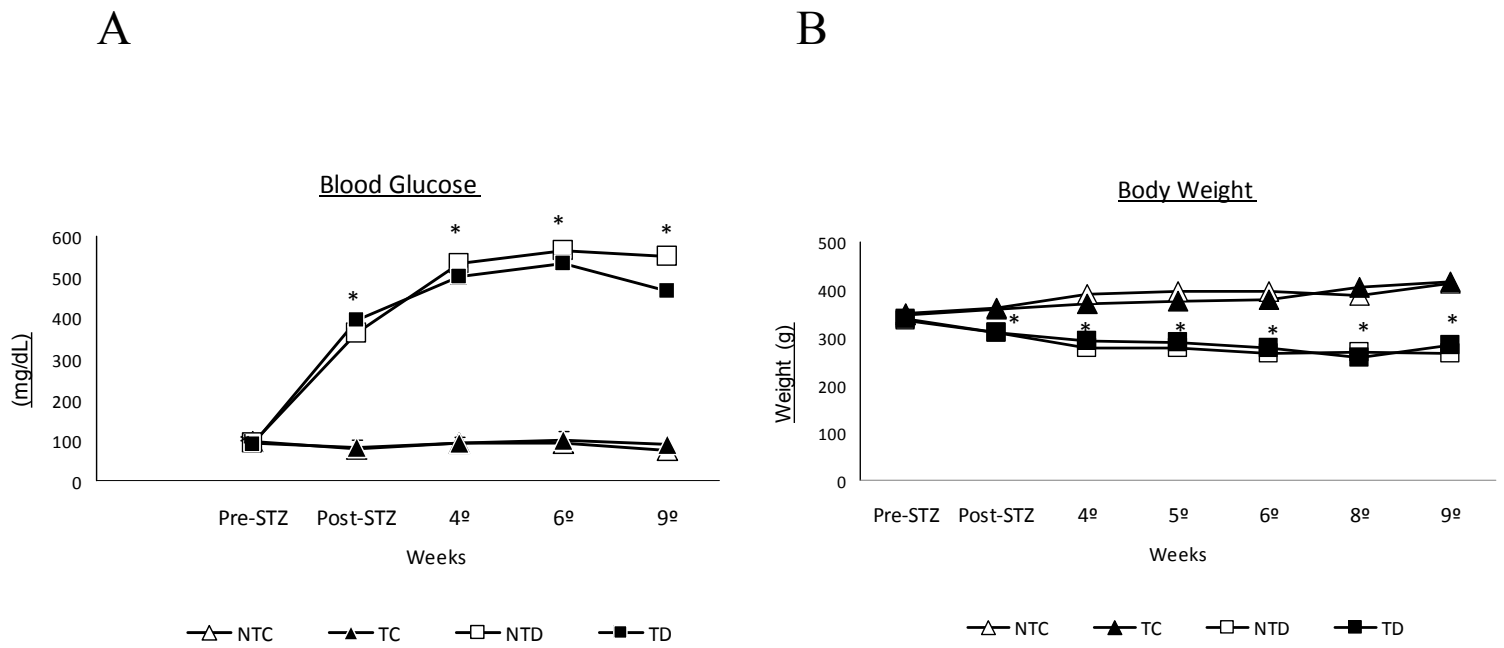
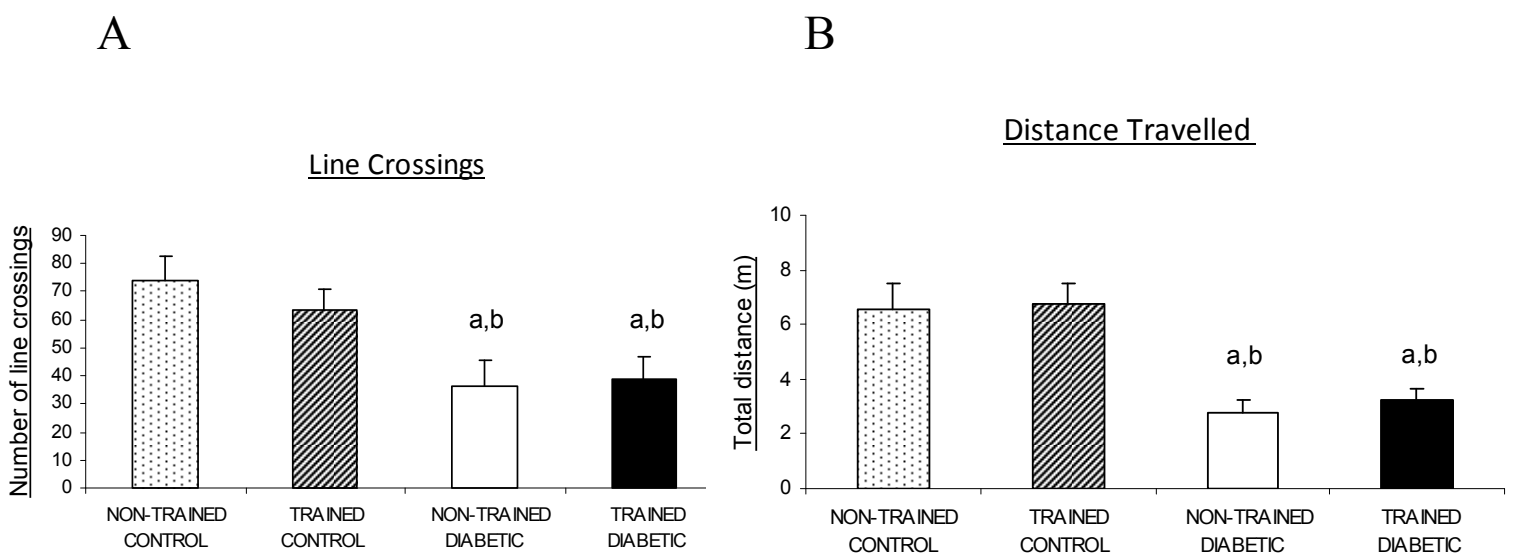


Figure 2



C

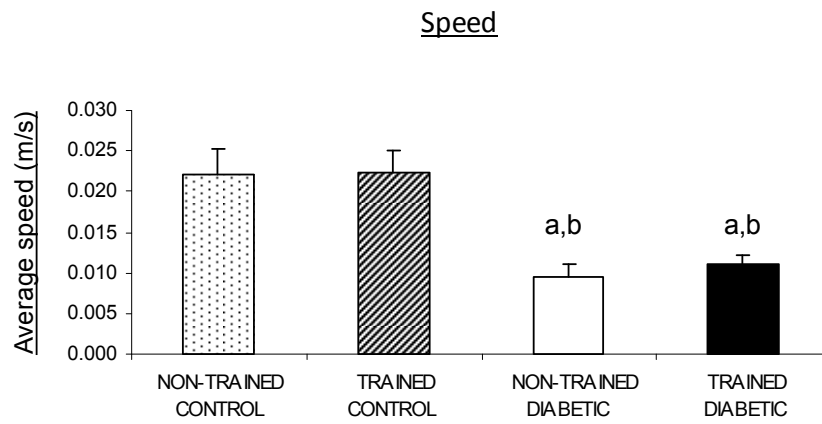


Figure 3

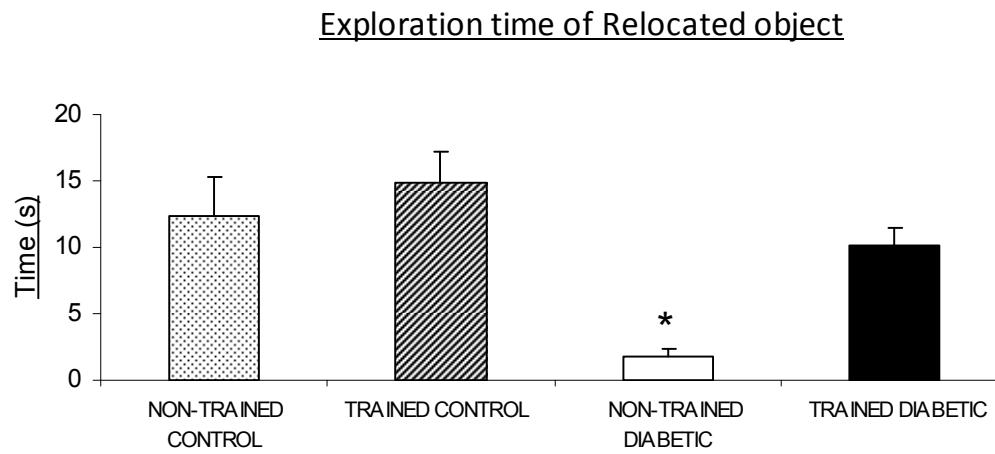
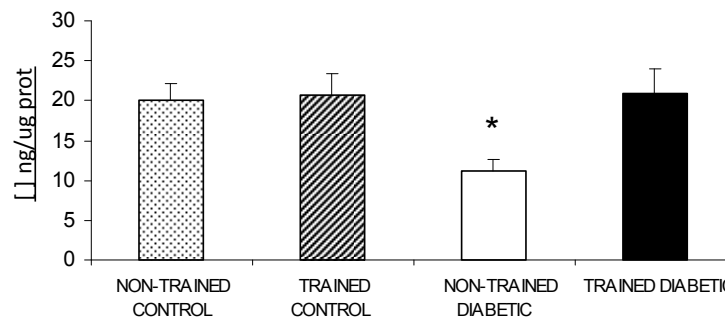


Figure 4

A

GFAP Hippocampus

B

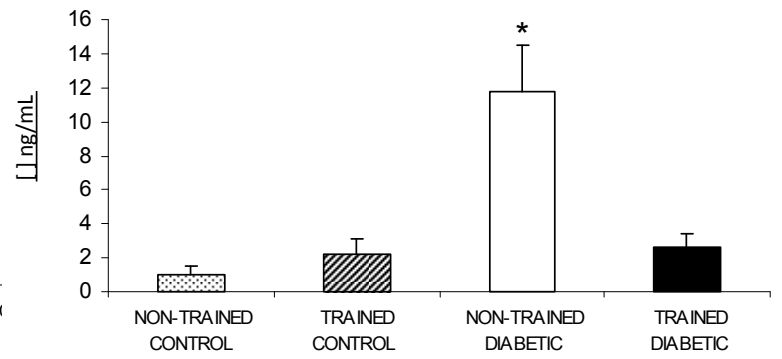
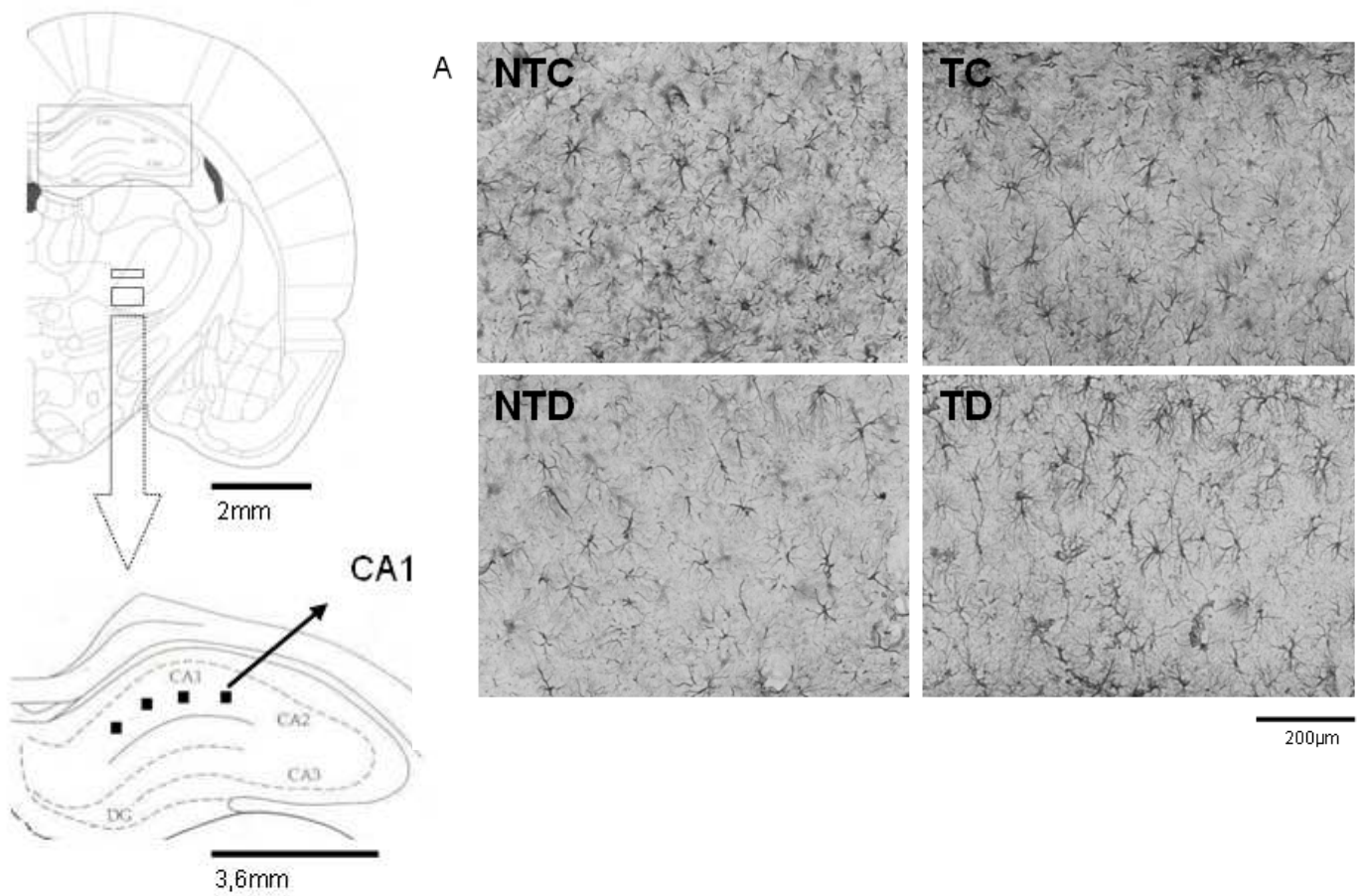
S100B-Cerebrospinal Fluid

Figure 5



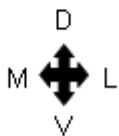
Bregma: -3.14 mm

Interaural: 5.86 mm

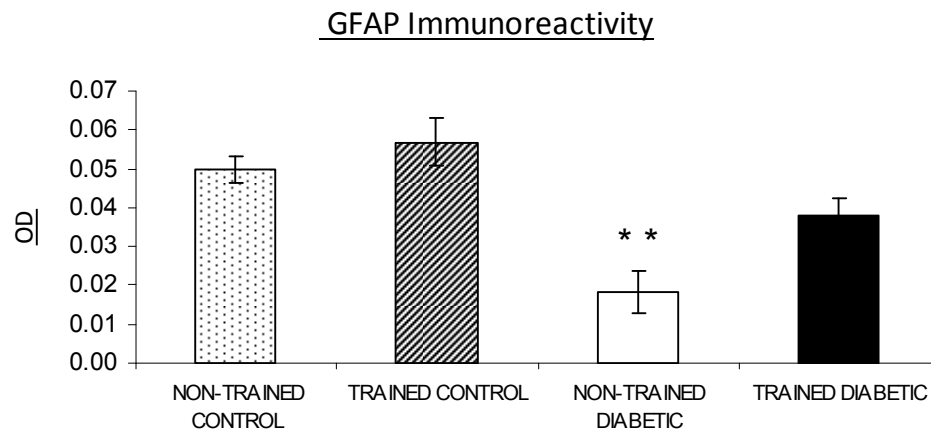
Bregma: -3.14 mm

Interaural: 5.86 mm

■ = AOI



B



3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste estudo indicam que o exercício físico é capaz de: prevenir ou reverter o déficit de memória espacial induzido pelo diabetes, uma vez que os animais diabéticos submetidos ao protocolo de exercício físico em esteira obtiveram um melhor desempenho na tarefa de reconhecimento do objeto reposicionado; e de prevenir ou reverter alterações astrócitárias, visto que níveis elevados da proteína S100B no líquido cérebro-espinhal e níveis reduzidos da proteína GFAP no hipocampo foram prevenidos ou revertidos nos animais diabéticos que realizaram cinco semanas de treinamento físico. Desse modo, este estudo foi o primeiro a demonstrar que o diabetes mellitus tipo 1 induz alterações importantes sobre os níveis de S100B e de GFAP, e que, felizmente, essas alterações são prevenidas ou revertidas pelo exercício físico.

Contudo, o protocolo de exercício físico utilizado não é capaz de reverter o déficit na atividade locomotora observado no estado diabético.

No intuito de melhor compreender os resultados obtidos neste trabalho, faz-se necessário um estudo mais detalhado sobre as alterações celulares no estado diabético e a influência do treinamento físico sobre elas. Assim, tem-se como perspectiva investigar a proliferação celular no hipocampo, a expressão da proteína GFAP no estriado, e a integridade da barreira hematoencefálica, por exemplo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N.J., RÖNNBÄCK, L., HANSSON, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 41–53, 2006.

ALAEI, H. MOLOUDI, R., SARKAKI, A.R., AZIZI-MALEKABADI, H., HANNINEN, O. Daily running promotes spatial learning and memory in rats. *Pathophysiology*, 14: 105–108, 2007.

ALAEI, H.; MOLOUDI, R.; SARKAKI, A. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, 12: 72–75, 2008.

ALBECK, D., SANO, K., Prewitt, G.E., Dalton, L. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behavioral Brain Research*, 168: 345–348, 2006.

ANG, E.T, DAWE, G.S., WONG, P.T., MOOCHHALA, S., NG, Y.K. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Research*, 1113: 186–193, 2006.

ANGELIS, K., PUREZA, D.Y., FLORES, L.J.F, RODRIGUES, B., MELO, K.F.S., SCHAAN, B.D., IRIGOYEN, M.C. Efeitos fisiológicos do treinamento físico em

pacientes portadores de diabetes tipo1. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo, 50(6): 1005–1013, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care, 26: 5–20, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care, 33: 11–61, 2010.

ANDERSON, R.E., WINNERKVIST, A., HANSSON, L.O., NILSSON, O., ROSENGREN, L., SETTERGREN, G., VAAGE, J. Biochemical markers of cerebrospinal ischemia after repair of aneurysms of the descending and thoracoabdominal aorta. Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 17(5): 598–603, 2003.

ARAQUE, A., NAVARRETE, M. Glial cells in neuronal network function. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 365(1551): 2375–2381, 2010.

ARAQUE, A., PARPURA, V., SANZGIRI, R.P., HAYDON, P. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends in Neuroscience, 22(5): 208-15, 1999.

ASTUR, R.S., TAYLOR, L.B., MAMELAK, A.N., PHILPOTT, L., SUTHERLAND, R.J. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behavioral Brain Research*, 132: 77–84, 2002.

BALDUCCI, S., IACOBELLIS, G., PARISIC, L., BIASEA, N., CALANDRIELLO, E., LEONETTI, F., FALLUCCA, F. Exercise training can modify the natural history of diabetic peripheral neuropathy. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 20: 216–223, 2006.

BEAUQUIS, J., ROIG, P., HOMO-DELARCHE, F., DE NICOLA, A., SARAVIA, F. Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurons in streptozotocina-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *European Journal of Neuroscience*, 23: 1539–1546, 2006.

BENTON, D., NABB, S. Carbohydrate, memory, and mood. *Nutrition Reviews*, 61: 61–67, 2003.

BIESSELS, G.J., KAMAL, A., URBAN, I.J., SPRUIJT, B.M., ERKELENS, D.W., GISPEN, W.H. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Research*, 800: 125–135, 1998.

BLISS, T.V.P., COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long term potentiation in hippocampus. *Nature*, 361: 31–38, 1993.

BRANDS, A M.A., BIESSELS, G.J., HAAN, E.H.F., KAPPELLE, L.J., KESSELS, R.P.C. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance. *Diabetes Care*, 28(3): 26–35, 2005.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes*, 54: 1615–1625, 2005.

COLEMAN, E.S., JUDD, R.L., HOEL, J., DENNIS, J., POSNER, P. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia*, 48: 166–178, 2004.

COLEMAN, E.S., DENNIS, J.C., BRADEN, T.D., JUDD, R.L., POSNER, P. Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 and 8 weeks of diabetes duration. *Brain Research*, 1306: 131–141, 2010.

DELFINO, V., FIGUEIREDO, J.F., MATSUO, T., FAVERO, M.E., MATNI, A.M., MOCELIN, A.J. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. *Journal Brasileiro de Nefrologia*, 24(1): 31–36, 2002.

DERE, E., HUSTON, J.P., DE SOUZA SILVA, MA. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Research Protocols*, 16(1-3):10– 19, 2005.

DISHMAN, R.K., BERTHOUD, H., BOOTH, F.W., COTMAN, C.W., EDGERTON, V.R., FLESHNER, M.R., GANDEVIA, S.C., GOMEZ-PINILLA, F., GREENWOOD, B.N., HILLMAN, C.H., KRAMER, A.F., LEVIN, B.E., MORAN, T.H., RUSSO-NEUSTADT, A.A., SALAMONE, J.D., VAN HOOMISSEN, J., WADE, C.E., YORK, D.A., ZIGMOND, M.J. *Neurobiology of Exercise. Obesity*, 14(3): 345–356, 2006.

DO NASCIMENTO, P.S., MALYSZ, T., ILHA, J., ARAUJO, R.T., HERMEL, E.E., KALIL-GASPAR, P.I., FACCIÓNI-HEUSER, M.C., SCHAAN, B.D., ACHAVAL, M. Treadmill training increases the size of A cells from the L5 dorsal root ganglia in diabetic rats. *Histology and Histopathology*, 25(6): 719–732, 2010.

DO NASCIMENTO, P.S., LOVATEL, G.A., ILHA, J., CENTENARO, L.A., MALYSZ, T., XAVIER, L.L., SCHAAN, B.D., ACHAVAL, M. Treadmill training improves motor skills and increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta in diabetic rats. *Brain Research*, (2011), doi:10.1016/j.brainres. 2011.01.063.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33: 637–668, 2001.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy Research and Technique*, 60: 540–551, 2003.

DUVERNOY, M.H. The human hippocampus. An atlas of applied anatomy. Germany: J.F. Bergmann, 1988. pp. 6.

EDWARDS, J.L., VINCENT, A.M., CHENG. H.T., FELDMAN. E.L. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & Therapeutics*, 1: 1–34, 2008.

FALOUGY, H., BENUSKA, J. History, anatomical, nomenclature, comparative anatomy and functions of the hippocampal formation. *Bratisl Lek Listy*, 107(4): 103–106, 2006.

FALOUGY, H., KUBIKOVA, E., BENUSKA, J. The microscopical structure of the hippocampus in the rat. *Bratisl Lek Listy*, 109(3): 106–110, 2008.

FERGUSON, S.C., BLANE, A., WARDLAW, J., FRIER, B.M., PERROS, P., MCCRIMMON, R.J., DEARY, I.J. Influence of an Early-Onset Age of Type 1 Diabetes on Cerebral Structure and Cognitive Function. *Diabetes Care*, 28: 1431–1437, 2005.

FRIZZO, J.K., TRAMONTINA, F., BORTOLI, E., GOTTFRIED, C., LEAL, R.B., LENGYEL, I., DONATO, R., DUNKLEY, P.R., GONÇALVES, C.A. S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochemical Research*, 29: 735–740, 2004.

GARBUGLIA, M., VERZINI, M., SORCI, G., BIANCHI, R., GIAMBANCO, I., AGNELETTI, A.L., DONATO, R. The calcium-modulated proteins, S100A1 and S100B, as potential regulators of the dynamics of type III intermediate filaments. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32(10): 1177–1185, 1999.

GISPEN, W.H., BIESSELS, G.J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends in Neuroscience*, 23: 542–549, 2000.

GRIECO, F.A., VENDRAME, F., SPAGNUOLO, I., DOTTA, F. Innate immunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. *Seminars in Immunopathology*, 33(1): 57–66, 2011.

GRIFFIN, W.S., STAMLEY, L.C., LING, C., WHITE, L., MACLEOD, V., PERROT, L.J., WHITE, C.L., ARAOZ, C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in down syndrome and Alzheimer disease. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 86: 7611–7615, 1989.

GRZEDA, E.; WISNIEWSKA, R. Differentiations of the effect of NMDA on the spatial learning of rats with 4 and 12 week diabetes mellitus. *Acta Neurobiologia Experimentalis*, 68: 398–406, 2008.

HABER, M., ZHOU, L., MURAI, K.K. Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *Journal of Neuroscience*, 26: 8881–8891, 2006.

HANNONEN, R., KOMULAINEN, J., EKLUND, K. TOLVANEN, A., RIIKONEN, R., AHONEN, T. Verbal and academic skills in children with early-onset type 1 diabetes. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 52(7): 143–147, 2010.

HAWKINS, C.L., DAVIES, M.J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1504: 196–219, 2001.

HENNEBERGER, C, PAPOUIN, T., OLIET, H.R., RUSAKOV, D.A. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*, 463: 232–237, 2010.

HOVSEPYAN, M.R., HAAS, M.J., BOYAJYAN, A.S., GUEVORKYAN, A.A., MAMIKONYAN, A.A., MYERS, S.E., MOORADIAN, A.D. Astrocytic and neuronal biochemical markers in the sera of subjects with diabetes mellitus. *Neuroscience Letters*, 369(3): 224–227, 2004.

IADECOLA, C., NEDERGAARD, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*, 10(11): 1369–1376, 2007.

ISHII, D.N. Implication of insulin-like growth factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Brain Research Reviews*, 20: 47-67, 1995.

JAHROMI, M. M., EISENBARTH, G. S. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cellular and Molecular Life Science*, 64: 865–872, 2007.

KAMAL, A., BIESSELS, G. J., URBAN, I. J.A. hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin diabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression. *Neuroscience*, 90(3): 737–745, 1999.

KAMAL, A., BIESSELS, G.J., GISPEN, W.H., RAMAKERS, G.M. Synaptic transmission changes in the pyramidal cells of the hippocampus in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Brain Research*, 16: 276–280, 2006.

KARVONEM, M., VIIK-KAJANDER, M., MOLTCHANOVA, E., LIBMAN, I., LAPORTE, R., TUOMILEHTO, J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Care*, 23(10): 1516–1526, 2000.

KIM, H.B., JANG, M.H., SHIN, M.C., LIM, B.V., KIM, Y.P., KIM, K.J., KIM, E.H., KIM, C.J. Treadmill exercise increases cell proliferation in dentate gyrus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 17: 29–33, 2003.

KIM, W.S., SU, L. Harmful effect of land-based endurance exercise in rats with diabetic nerve. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 42(9): 1625–31, 2010.

KIMELBERG, H.K. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *The Neuroscientist*, 16(1): 79–106, 2010.

KLEIN, J.P., WAXMAN, S.G. The brain in diabetes: molecular changes in neurons and their implications for end-organ damage. *The Lancet Neurology*, 2(9): 548–554, 2003.

KUCHIBHOTLA, K.V., LATTARULO, C.R., HYMAN, B.T., BACSKAI, B.J., Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science*, 323: 1211–1215. 2009.

LANGSTON, R.F., STEVENSON, C.H., WILSON, C.L., SAUNDERS, I., WOOD, E.R. The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. *Behavioural Brain Research*, 215: 275–291, 2010.

LAURIN, D., VERREAULT, R., LINDSAY, J., MACPHERSON, K., ROCKWOOD, K. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Archives of Neurology*, 58: 489–504, 2001.

LEBED, Y. V., ORLOVSKY, M.A., NIKONENKO, A.G., USHAKOVA, G.A., SKIBO, G.G. Early reaction of astroglial cells in rat hippocampus to streptozotocin-induced diabetes. *Neuroscience Letters*, 444: 181–185, 2008.

LECHUGA-SANCHO, A.M., ARROBA, A., FRAGO, L.M., GARCÍA-CÁCERES, C., CÉLIX, A.D.R., ARGENTE, J., CHOWEN, J.A. Reduction in the number of astrocytes and their projections is associated with increased synaptic protein density in the hypothalamus of poorly controlled diabetic rats. *Endocrinology*, 47: 5314–5324, 2006a.

LECHUGA-SANCHO, A.M., ARROBA, A.I., FRAGO, L.M., PAÑEDA, C., GARCÍA-CÁCERES, C., DELGADO, R.C., ARGENTE, J., CHOWEN, J.A. Activation of the intrinsic cell death pathway, increased apoptosis and modulation of astrocytes in the cerebellum of diabetic rats. *Neurobiology of Disease*, 23: 290–299, 2006b.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51: 216–226, 2008.

LI, J., DING, Y.H., RAFOLS, J.A., LAI, Q, McALLISTER, J.P., DING, Y. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neuroscience Letters*, 386(3): 160–164, 2005.

LISTA, L., SORRENTINO, G. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(4): 493–503, 2010.

LORENTE DE NÓ, M. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal of Psychology and Neurology*, 46: 113-77, 1934.

MAAHS, D. M., WEST, N., LAWRENCE, J.M., MAYER-DAVIS, E.J. Epidemiology of type 1 Diabetes. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 39: 481–497, 2010.

MAGISTRETTI, P., PELLERIN, L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354: 1155–1163, 1999.

MALONE, J.I., HANNA, S., SAPORTA, S., MERVIS, R.F., PARK, C.R., CHONG, L., DIAMON, D.M. Hyperglycemia not hypoglycemia alters neuronal dendrites and impairs spatial memory. *Pediatric Diabetes*, 9: 531–539, 2008.

MALYSZ, T., ILHA, J., DO NASCIMENTO, P.S., DE ANGELIS, K, D'AGORD SCHAAN, B., ACHAVAL, M. Beneficial effects of treadmill training in experimental diabetic nerve regeneration. *Clinics (Sao Paulo)*, 65(12): 1329–1337, 2010.

MARCHI, N., RASMUSSEN, P., KAPURAL, M., FAZIO, V., KIGHT, K., MAYBERG, M.R., KANNER, A., AYUMAR, B., ALBENSI, B., CAVAGLIA, M.,

JANIGRO, D. Peripheral markers of brain damage and blood–brain barrier dysfunction. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 21: 109–121, 2003.

McCALL, A.L. Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus. *European Journal of Pharmacology* 490:147–158, 2004.

McCARTHY, A., McCARTHY, A.M., LINDGREN, S., MENGELING, M.A., TSALIKIAN, E. Effects of diabetes on learning in children. *Pediatrics*, 109: 1–10, 2002.

MCNALLY, L., BHAGWAGAR, Z., HANNESTAD, J., Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. *CNS Spectrums*, 13: 501–510, 2008.

MITTERAUER, B.J., The syncytiopathy hypothesis of depression: downregulation of glial connexins may protract synaptic information processing and cause memory impairment. *Medical Hypotheses*, 74 (3): 497–502. 2009.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11: 47–60, 1984.

MUNEHIRO, U., ISHIDO, M., KAMI, K., MASUHARA, M. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Research*, 1104: 64–72, 2006.

MURATA, M., TAKAHASHI, A., SAITO, I., KAWANISHI, S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochemical Pharmacology*, 57: 881–887, 1999.

MUSEN, G., LYOO, I.K., SPARKS, C.R., WEINGER, K., HWANG, J., RYAN, C.M., JIMERSON, D.C., HENNEN, J., RENSHAW, P.F., JACOBSON, A.M. Effects of type 1 diabetes on gray matter density as measured by voxel-based morphometry. *Diabetes* 55: 326–333, 2006.

NISHIYAMA, A., YANG, Z., BUTT, A. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *Journal of Anatomy*, 207: 687–693, 2005.

NOTKINS, A.L. Immunologic and Genetic Factors in Type 1 Diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(46): 43545–43548, 2002.

PELLERIN, L. How astrocytes feed hungry neurons. *Molecular Neurobiology*, 32: 59–72, 2005.

PENG, H., HAGOPIAN, W. Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 7: 149–162, 2006.

PEKNY, M., PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *Journal of Pathology*, 204: 428–437, 2004.

PERANTIE, D.C., WU, J., KOLLER, J.M., LIM, A., WARREN, S.L., BLACK, K.J., SADLER, M., WHITE, N.H., HERSHEY, T. Regional brain volume differences associated with hyperglycemia and severe hypoglycemia in youth with type 1. *Diabetes Care*, 30(9): 2331-2337, 2007.

PEREIRA, A., FURLAN, F.A. Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Progress in Neurobiology*, 92: 405–420, 2010.

PIAZZA, F.V., PINTO, G.V., TROTT, G., MARCUZZO, S., GOMEZ, R., FERNANDES, M.C. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behavioral Brain Research*, 217: 16–20, 2010.

PIROLA, L., BALCERCZYK, A., OKABE, J.O., EL-OSTA, A. Epigenetic phenomena linked to diabetic complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 6: 665:675, 2010.

QIANG, MA. Beneficial effects of moderate voluntary physical exercise and its biological mechanisms on brain health. *Neuroscience Bull*, 24(4): 265–270, 2008.

RAMÓN y CAJAL, S. *The Structure of Ammon 's Horn*. Transl by 1968 by L. M. Kraft. Springfield, Ill.: Thomas, 1893.

RAMÓN y CAJAL, S. *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates*. New York: Oxford University Press, 1995.

REISI, P., BABRI, S., ALAEI, H., SHARIFI, M.R., MOHADDES, G., NOORBAKHSH, S.M., LASHGARI, R. Treadmill running improves long-term potentiation (LTP) defects in streptozotocin-induced diabetes at dentate gyrus in rats. *Pathophysiology*, 17: 33–38, 2010.

REVSIN, Y., SARAIVIA, F., ROIG, P., LIMA, A., KLOET, E.R., HOMO-DELARCHE, F., DE NICOLA, A.F. Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes. *Brain Research*, 1038: 22–31, 2005.

REVSIN, Y., REKERS, N.V., LOUWE, M.C., SARAIVIA, F.E., NICOLA, A.F., KLOET, E.R., OITZL, M.S. Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology*, 34: 747–758, 2009.

RIEDEL, G., PLATT, B., MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioral Brain Research*, 140(1-2): 1–47, 2003.

RORIZ-FILHO, J., SÁ-RORIZ, T.M., ROSSET, I., CAMOZZATO, A.L., SANTOS, A.C., CHAVES, M.L., MORIGUTI, J.C., RORIZ-CRUZ, M. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792: 432–443, 2009.

ROTHERMUNDT, M., PETERS, M., PREHN, J.H., AROLT, V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microscopy Research and Technique*, 60: 614–632, 2003.

SANTELLO, M., VOLTERRA, A. Neuroscience: Astrocytes as aide-mémoires. *Nature*, 463(7278): 169-70, 2010.

SARAVIA, F.E., REVSIN, Y., GONZALEZ DENISELLE, M.C, GONZALEZ, S.L., ROIG, P., LIMA, A., HOMO-DELARCHE, F., DE NICOLA, A.F. Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine mode type 1 diabetes: the non obese diabetic (NOD) and streptozotocin -treated mice. *Brain Research*, 957: 345–353, 2002.

SEIFERT, G., CARMIGNOTO, G., STEINHÄUSER, C. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Research Review*, 63 (1–2): 212–221, 2009.

SERINO R, UETA Y, TOKUNAGA M, HARA Y, NOMURA M, KABASHIMA N, SHIBUYA I, HATTORI Y, YAMASHITA H. Up regulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, 41(6): 640-648, 1998.

SETH, P., KOUL, N. Astrocyte, the star avatar: redefined. *Journal Bioscience*, 33: 405–421, 2008.

SHALEV, H., SERLIN, Y., FRIEDMAN, A., Breaching the blood–brain barrier as a gate to psychiatric disorder. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*: 278531, 2009.

SHARMA, S., RAKOCZY, S., BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*, 87: 521–536, 2010.

SILVA, F.H.L., ARNOLDS, D.E.A.T. Physiology of the hippocampus and related structures. *Annual Review of Physiology*, 40: 185–216, 1978.

SILVA, M.E.R., MORY, D., DAVINI, E. Marcadores genéticos e auto-imunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52(2): 166– 180, 2008.

SNOW, L.M., SANCHEZ, O.A., McLOON, L.K., SERFASS, R.C., THOMPSON, L.V. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain isoform expression in diabetic rats with peripheral neuropathy. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 84(10): 770–779, 2005.

SOFRONIEW, M.V., VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119: 7–35, 2010.

STEVENS, C.F. A million dollar question: Does LTP = Memory? *Neuron*, 20: 1–2, 1998.

STRANAHAN, A., LEE, K., BECKER, K.G., ZHANG, Y., MAUDSLEY, S., MARTIN, B., CUTLER, R.G., MATTSON, M.P. Hippocampal gene expression patterns underlying the enhancement of memory by running in aged mice. *Neurobiology of Aging*, 31(11): 1937–1949, 2010.

SUH, S.W., BERGHER, J.P., ANDERSON, C.M., TREADWAY, J.L., FOSGERAU, K., SWANSON, R.A. Astrocyte glycogen sustains neuronal activity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(1): 45–50, 2008.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50(6): 537–46, 2001.

TAO, T. B., TAYLOR, D. G. Economics of type 1 diabetes. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 39: 499–512, 2010.

THEODOSIS, D.T., DOMINIQUE A. POULAIN, D.A., OLIET, S.H.R. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological Reviews*, 88: 983–1008, 2008.

TUZCU, M., BAYDAS, G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *European Journal of Pharmacology*, 537: 106–110, 2006.

VAN HARTEN, B., LEEUW, F., WEINSTEIN, H.C., SCHELTENS, P., BIESSELS, G.J. Brain imaging in patients with diabetes. *Diabetes Care*, 29(11): 2539–2548, 2006.

VAN STRIEN, N.M., CAPPAERT, N.L. M., WITTER, M.P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal– hippocampal network. *Nature Reviews*, 10: 272–282, 2009.

WESSELS, A.M., SCHELTENS, P., BARKHOF, F., HEINE, R.J. Hyperglycaemia as a determinant of cognitive decline in patients with type 1 diabetes *European Journal of Pharmacology*, 585: 88–96, 2008.

WUARIN, L., NAMDEV, R., BURNS, J.G., FEI, Z.J., ISHII, D.N. Brain insulin-like growth factor-II mRNA content is reduced in insulin-dependent and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of Neurochemistry*, 67: 742–751, 1996.

YAGIHASHI, S., YAMAGISHI, S., WADA, R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77: 184–189, 2007.