

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**ANA CLÁUDIA ALVES FREIRE RIBEIRO**

**SÍNDROME METABÓLICA OU DIABETES ACENTUA OS SINTOMAS  
SEMELHANTES AO TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO E A  
ATIVACÃO GLIAL**

**Alfenas/MG**

**2020**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANA CLÁUDIA ALVES FREIRE RIBEIRO

**SÍNDROME METABÓLICA OU DIABETES ACENTUA OS SINTOMAS  
SEMELHANTES AO TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO E A  
ATIVÇÃO GLIAL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Fabiana Cardoso Vilela Giusti

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alenas

R484s Ribeiro, Ana Cláudia Alves Freire.  
Síndrome metabólica ou diabetes acentua os sintomas semelhantes  
ao transtorno do estresse pós-traumático e a ativação glial / Ana Cláudia  
Alves Freire Ribeiro -- Alenas/MG, 2020.  
105f. il. --

Orientadora: Fabiana Cardoso Vilela Giusti.  
Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade  
Federal de Alenas, 2020.  
Bibliografia.

1. Frutose. 2. Aloxano. 3. Transtornos de Estresse Pós-Traumático. 4.  
Proteína Glial Fibrilar Ácida. 5. Neuroglia. 6. Córtex Pré-Frontal. 7.  
Hipocampo. I. Giusti, Fabiana Cardoso Vilela. II. Título.

CDD-612.8

Ana Cláudia Alves Freire Ribeiro

Síndrome metabólica ou diabetes acentua os sintomas semelhantes ao transtorno do estresse pós-traumático e a ativação glial

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências Comportamento.

Aprovada em: 12 de junho de 2020

Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Josie Resende Torres da Silva  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Hudsara Aparecida de Almeida Paula  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli  
Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo  
UFES

Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten  
Instituição: Universidade Paulista  
UNIP- SP



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Cardoso Vilela, Professor do Magistério Superior**, em 12/06/2020, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Berti Kirsten, Usuário Externo**, em 12/06/2020, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jones Bernardes Graceli, Usuário Externo**, em 12/06/2020, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Josie Resende Torres da Silva, Presidente**, em 15/06/2020, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hudsara Aparecida de Almeida Paula, Professor do Magistério Superior**, em 15/06/2020, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0308716** e o código CRC **C3ED155A**.

---

*Dedico a finalização desta etapa da minha vida a Deus e aos meus pais, José A. e Elza, a quem devo tudo que sou.*

## AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever essa tese, foi utilizar apenas duas páginas para agradecer as pessoas que fizeram parte dessa minha trajetória do início até a finalização dela. É com grande orgulho que comemoro essa imensa conquista, a qual foi regada por desafios, sorrisos, lágrimas e muito aprendizado. Nessa etapa triunfal da minha vida devo primeiramente a Deus, que está sempre à frente de tudo, me guiando e fortalecendo, dando a coragem necessária para seguir em frente.

Aos meus pais, José Antônio e Elza, pelos valores e princípios ensinados, que me deram a estrutura para tornar a pessoa que sou hoje. Pela confiança, força, e amor incondicional que me fortalecem todos os dias. Pelos sacrifícios que sempre fizeram para me ver sorrir, renunciando muitas vezes aos próprios sonhos em prol dos meus, sem dúvidas o meu maior incentivo para concluir mais uma etapa de minha vida e com certeza das muitas outras que virão.

A minha orientadora, Fabi, pela confiança, dedicação e ensinamentos ao longo desses anos que contribuíram e foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pela amizade, paciência nos momentos de desespero, pelo carinho, por ter me adotado como filha científica e por nos presentear com o Rique, que com certeza é uma benção de Deus e que sempre me faz sorrir e também com mais um anjinho que está por chegar e irá nos trazer muitas felicidades.

Ao professor, Alexandre, pela confiança na utilização do laboratório, aos ensinamentos e colaboração para realização desse trabalho.

Ao meu irmão Luiz Otávio e minha cunhada Rebeca pela compreensão e carinho demonstrados, além de me presentear com as duas sobrinhas mais lindas, Manu e Duda, os melhores presentes que Deus poderia ter me enviado, uma verdadeira benção na minha vida. Manu e Duda vocês que me alegram meus dias, como é bom receber fotos e vídeos, com certeza são eles que fazem toda diferença e me deixam mais feliz, pois nos sorrisos tão puros encontro a verdadeira felicidade.

Ao meu noivo, Fábio, por me amar mesmo diante das minhas imperfeições. Por ter me ensinado a acreditar mais em meus sonhos, pela paciência, o cuidado e sempre ficar do meu lado nas alegrias, e principalmente nos momentos de dificuldades. Obrigada por perseverar nossa união e sempre procurar me entender, ser honesto comigo e por fazer com que esse

amor cresça cada dia mais e continue a transbordar de momentos ainda mais felizes ao seu lado.

Aos amigos do Lab quantas alegrias ao longo desses anos pelas conquistas que juntos tivemos e pelos fracassos que juntos superamos e que só me fizeram crescer. Obrigada a todos pela amizade, apoio, respeito, convivência, as confraternizações, disposição para ajudar nos experimentos, descontrações diárias, apoio físico e emocional. E saibam que cada um com seu jeito de ser foi a peça chave fundamental para o desenvolvimento dessa etapa!

A Lê que acompanha minhas alegrias e tristezas desde 2008, pela paciência, carinho, compreensão, incentivo e por sempre estar ao meu lado.

Aos amigos e familiares que mesmo na distância foram companheiros, demonstram apoio, amizade, por sempre me darem força para perseguir meus sonhos e ajudarem a alcançá-los, além das orações diárias.

Aos meus afilhados Lulu, Antônio, José e Eloá que são uma benção na minha vida e por sempre me fazerem sorrir com cada evolução diária, o amor e carinho gratuito de vocês, que com certeza faz toda diferença no meu dia.

Ao Zé, nosso querido técnico, por todo carinho, ajuda e cuidado com os animais e o laboratório.

À secretária, Adriana, e o coordenador do programa, Professor Valdemar Antônio Paffaro Jr., que sempre com muito zelo e um sorriso no rosto, resolvem todos os problemas e nos ajudam diariamente.

A professora, Bruna, pelo apoio, colaboração e ensinamentos que contribuíram muito para esse trabalho.

Aos animais que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa pela disponibilidade da participação e as contribuições que serão muito importantes para a finalização desse trabalho.

À UNIFAL, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para essa minha realização e que não tenha sido mencionado, meu muito obrigada!



*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King, 195-?)*

## RESUMO

A alteração psiquiátrica desencadeada após uma experiência ou evento traumático, é caracterizado como o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT). Estudos demonstram que o TEPT pode modificar o metabolismo, porém se o metabolismo alterado pode modificar seu desenvolvimento ainda não é esclarecido. Assim, o presente trabalho investigou as influências do desenvolvimento do TEPT nas alterações metabólicas, síndrome metabólica (SM) e diabetes. Experimento 1: foi investigado a caracterização da SM nos animais que ingeriram a solução 10% de frutose ou da diabetes nos animais que receberam dose única de aloxana (150 mg/Kg) pela via intraperitoneal. Experimento 2: após caracterização (SM ou diabetes) os grupos de animais foram expostos ou não ao choque inescapável e isolamento social (14dias) e foram avaliados nos seguintes testes comportamentais: aparato do campo aberto, teste de interação social, nado forçado, aparato de labirinto em cruz elevado e teste de reconhecimento de objetos. Além, da verificação de quantificação de proteínas (técnica de Western Blotting) para avaliação da expressão da proteína fibrilar ácida da glia (GFAP) e molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1 (Iba-1) no hipocampo e córtex. Os resultados demonstram que os animais SM TEPT e Controle TEPT apresentaram um aumento no tempo de congelamento, aumento da imobilidade no teste do nado forçado (sugerindo um comportamento tipo depressivo), aumento no tempo nos braços fechados e redução do tempo nos braços abertos (sugerindo um comportamento tipo ansioso), redução na interação social e déficit de memória dos animais comparados aos seus respectivos controles (Controle não TEPT e SM não TEPT). Os animais Diabetes TEPT e Controle TEPT comparados aos seus respectivos controles (Controle não TEPT e Diabetes não TEPT) apresentaram resultados semelhantes aos encontrados em animais com SM. Além disso, vale ressaltar que essas alterações foram mais acentuadas nos animais SM TEPT e Diabetes TEPT comparado aos seus respectivos Controles TEPT. Em relação a ativação glial foi observado um aumento da expressão de GFAP e Iba-1 nos animais SM TEPT e um aumento da expressão de GFAP nos animais diabetes TEPT. Portanto, é possível concluir que a SM ou diabetes preexistente acentua os sintomas relacionados ao TEPT. E nos animais SM TEPT as alterações observadas podem estar relacionadas com a ativação glial.

**Palavras-chave:** Frutose. Aloxana. TEPT. GFAP. Iba-1. Córtex pré-frontal. Hipocampo.

## ABSTRACT

The psychiatric alteration triggered after a traumatic experience or event is characterized as Post-traumatic Stress Disorder (PTSD). Studies have shown that PTSD can modify the metabolism, but if the altered metabolism can modify its development is still not clear. Thus, the present study aimed to investigate the influences of the development of PTSD on metabolic alterations, such as in the metabolic syndrome (MS) and diabetes. Experiment 1: the characterization of MS was investigated in animals that ingested a 10% fructose solution or diabetes in animals that received a single dose of alloxan (150 mg / kg) intraperitoneally. Experiment 2: after characterization (MS or diabetes) the groups of animals were exposed or not to inescapable shock and social isolation (14 days) and were evaluated in the following behavioral tests: open field, social interaction test, forced swimming, elevated plus maze and object recognition test and in the verification of protein quantification (Western Blotting technique). In addition, the verification of protein quantification (Western Blotting technique) to evaluate the expression of glial acid fibrillar protein (GFAP) and ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) in the hippocampus and pre-frontal cortex. The results demonstrate that PTSD MS and PTSD Control animals group an increase in freezing time, increase immobility in the forced swimming test (suggesting a depressive behavior), increase time in closed arms and reduced time in open arms (suggesting behavior anxious type), reduced in the social interaction and memory deficit when compared to their respective controls (unexposed control and unexposed MS). The PTSD Diabetes and PTSD Control animals group showed similar results to those found in animals with MS when compared to their respective controls (Non-PTSD Control and Non-PTSD Diabetes). In addition, it is noteworthy that these changes were more pronounced in PTSD MS and PTSD Diabetes animals compared to their respective PTSD Controls. Regarding glial activation, was observed an increased expression of GFAP and Iba-1 in MS PTSD and increased expression of GFAP in Diabetes PTSD animals group. Therefore, it is possible to conclude that MS or diabetes pre-existing accentuates symptoms related to PTSD. And that in animals with PTSD MS the changes observed may be related to glial activation.

**Keywords:** Fructose. Alloxan. PTSD. GFAP. Iba-1. Pre-frontal cortex. Hippocampus.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Resposta a Curto-prazo e a Longo-prazo ao estímulo estressor.....	21
Figura 2 -	Esquema das áreas dos cérebros relacionados a funcionalidade e comprometimento de TEPT.....	23
Figura 3 -	Fisiopatologia da síndrome metabólica (Resistência Insulina) .....	26
Figura 4 -	Patogênese da DM1.....	30
Figura 5 -	Hiperglicemia na DM2.....	31
Figura 6 -	Delineamento experimental do Protocolo I.....	40
Figura 7 -	Delineamento experimental do Protocolo II.....	41
Figura 8 -	Tempo de Congelamento (s) dos grupos controle não choque (n = 10), SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10) .....	51
Figura 9 -	Tempo de imobilidade (s) - Gráfico A e distância em (cm) – Gráfico B dos grupos controle não choque (n = 10), SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10).....	52
Figura 10 -	Tempo de interação social (s) dos grupos controle não choque (n = 10), SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10)..	53
Figura 11 -	Tempo de imobilidade (s) dos grupos controle não choque (n = 10), SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10).....	54
Figura 12 -	Tempo de Congelamento (s) dos grupos controle não choque (n = 10), SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10).....	55
Figura 13 -	Tempo de permanência no braço fechado (s) - Gráfico A e tempo de permanência no braço aberto (s) Gráfico B dos grupos controle não choque (n = 10), SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10).....	56
Figura 14 -	Índice de Reconhecimento Memória Curto-prazo - Gráfico A e Índice de Reconhecimento Memória Longo-prazo - Gráfico B dos grupos controle não choque (n = 10), SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10).....	57
Figura 15 -	(GFAP/actina) % no hipocampo dos grupos controle não choque (n = 6), SM não choque (n = 6), controle choque (n = 6) e SM choque (n = 6).....	58
Figura 16 -	(GFAP/actina) % no Córtex pré-frontal dos grupos controle não choque (n = 6), SM não choque (n = 6), controle choque (n = 6) e SM choque (n =	

	6).....	59
Figura 17-	(Iba-1/actina) % no hipocampo dos grupos controle não choque (n = 6), SM não choque (n = 6), controle choque (n = 6) e SM choque (n = 6).....	60
Figura 18-	(Iba-1/actina) % no Córtex pré-frontal dos grupos controle não choque (n = 6), SM não choque (n = 6), controle choque (n = 6) e SM choque (n = 6)	61
Figura 19 -	Tempo de Congelamento (s) dos grupos controle não choque (n = 8), diabetes não choque (n = 8), controle choque (n = 8) e diabetes choque (n = 8).....	63
Figura 20 -	Tempo de imobilidade (s) - Gráfico A e distância em (cm) – Gráfico B dos grupos controle não choque (n = 8), diabetes não choque (n = 8), controle choque (n = 8) e diabetes choque (n = 8).....	64
Figura 21 -	Tempo de interação social (s) dos grupos controle não choque (n = 8), diabetes não choque (n = 8), controle choque (n = 8) e diabetes choque (n = 8).....	65
Figura 22 -	Tempo de imobilidade (s) dos grupos controle não choque (n=8), diabetes não choque (n=8), controle choque (n =8) e diabetes choque (n=8).....	66
Figura 23 -	Tempo de Congelamento (s) dos grupos controle não choque (n=8), diabetes não choque (n=8), controle choque (n =8) e diabetes choque (n=8).....	67
Figura 24 -	Tempo de permanência no braço fechado (s) - Gráfico A e tempo de permanência no braço aberto (s) Gráfico B dos grupos controle não choque (n=8), diabetes não choque (n=8), controle choque (n =8) e diabetes choque (n=8).....	68
Figura 25 -	Índice de Reconhecimento Memória Curto-prazo - Gráfico A e Índice de Reconhecimento Memória Longo-prazo - Gráfico B dos grupos controle não choque (n=10), diabetes não choque (n=10), controle choque (n =10) e diabetes choque (n=10).....	69
Figura 26-	(GFAP/actina) % no hipocampo dos grupos controle não choque (n=6), Diabetes não choque (n=6), controle choque (n =6) e Diabetes choque (n=6).....	70
Figura 27-	(GFAP/actina) % no Córtex pré-frontal dos grupos controle não choque	

(n=6), SM não choque (n=6), controle choque (n =6) e SM choque  
(n=6)..... 71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Tecido adiposo, dosagens bioquímicas e hormonais dos ratos pré- tratados com 10% frutose na água ou água normal (controle) por 5 semanas (n = 10 por grupo).....	50
Tabela 2 -	Glicemia (mg/dl) e variação da perda peso (g) dos ratos pré- tratados ou não com aloxana na dose 150 mg/kg (n = 8 por grupo).....	62

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
AGL	- Ácidos graxos livres
BHE	- Barreira hematoencefálica
CEUA	- Comissão de ética no uso animal
cm	- Centímetros
CNA	- Comprimento nasoanal
CPF	- Córtex pré-frontal
CRH	- Hormônio liberador de corticotrofina
DAG	- Distância anogenital
DCNT	- Doenças crônicas não transmissíveis
dl	- Decilitro
DM	- Diabetes (1ou 2)
DSM-5	- Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
g	- Gramas
GA	- Gordura Abdominal
GFAP	- Proteína Glial Fibrilar Ácida
HDL	- Lipoproteínas de alta densidade
Hip	- Hipocampo
HPA	- Hipotálamo-pituitária-adrenal
IBA-1	- Molécula Adaptadora de Ligação de Cálcio ionizada 1
ID	- Índice de Lee
IDO	- Indoleamina 2,3-dioxigenase
IL-1	- Interleucina 1
IL-6	- Interleucina 6
IR	- Índice de Reconhecimento
Kg	- Kilograma
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
MG	- Minas Gerais
mA	- Miliampere
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro



n	- Número
NMDA	- N-metil D-Aspartato
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PAI-1	- Inibidor do ativador do plasminogênio-1
pH	- Potencial Hidrogeniônico
POMC	- Pró-opiomelanocortina
PVN	- Paraventricular
SAG	- Síndrome de Adaptação Geral
SEM	- Erro padrão da média
SGLT-2	- Co transportador de sódio/glicose 2
SM	- Síndrome Metabólica
SNAs	- Sistema nervoso autônomo simpático
SNC	- Sistema Nervoso Central
TEPT	- Transtorno do Estresse Pós-traumático
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral $\alpha$
UNIFAL	- Universidade Federal de Alfenas
VLDL	- Lipoproteínas de densidade muito baixa

## LISTA DE SÍMBOLOS

- \* - Asterisco
- °C - Graus celsius
- = - Igual
- + - Mais
- ± - Mais ou menos
- < - Menor
- > - Maior
- / - Por
- % - Porcentagem
- : - Proporção
- α - Alfa
- β - Beta
- ® - Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	ANIMAIS.....	38
4.2	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	38
4.2.1	<b>Protocolo I: Síndrome metabólica induzida por frutose.....</b>	<b>38</b>
4.2.2	<b>Protocolo II: Diabetes Mellitus induzida por aloxana.....</b>	<b>38</b>
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
4.3.1	<b>Delineamento experimental do Protocolo I: Síndrome metabólica induzida por frutose.....</b>	<b>39</b>
4.3.2	<b>Delineamento experimental do Protocolo II: Diabetes Mellitus induzida por aloxana.....</b>	<b>40</b>
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA SÍNDROME METABÓLICA.....	41
4.4.1	<b>Ganho de peso corpóreo e Índice de Lee.....</b>	<b>42</b>
4.4.2	<b>Quantificação da adiposidade abdominal.....</b>	<b>42</b>
4.4.3	<b>Dosagens bioquímicas.....</b>	<b>42</b>
4.4.4	<b>Dosagem hormonal leptina .....</b>	<b>42</b>
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA DIABETES.....	43
4.5.1	<b>Peso corpóreo.....</b>	<b>43</b>
4.5.2	<b>Avaliação da Glicemia pelo Kit Glicosímetro.....</b>	<b>43</b>
4.5.3	<b>Dosagem bioquímica de glicemia.....</b>	<b>43</b>
4.6	EXPOSIÇÃO AO CHOQUE E INDUÇÃO DO TEPT.....	44
4.7	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....	44
4.7.1	<b>Campo aberto.....</b>	<b>44</b>
4.7.2	<b>Teste de Interação Social.....</b>	<b>45</b>
4.7.3	<b>Nado forçado.....</b>	<b>45</b>
4.7.4	<b>Labirinto em Cruz Elevado.....</b>	<b>45</b>
4.7.5	<b>Teste de Reconhecimento de Objetos.....</b>	<b>46</b>

4.8	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING....	46
5	ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	48
6	RESULTADOS.....	49
7	DISCUSSÃO.....	72
8	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90
	APÊNDICE A .....	105

# 1 INTRODUÇÃO

A presente introdução traz conhecimentos sobre o estresse, do TEPT, TEPT e alterações metabólicas, síndrome metabólica, diabetes e estresse e alterações metabólicas envolvidos com a ativação das células da glia.

## 1.1 ESTRESSE

O estresse está cada vez mais presente na sociedade moderna e exigente, podendo gerar prejuízos irreparáveis na saúde e bem-estar da população. Diversos são os aspectos do corpo que podem ser influenciados pelo estresse, tais como por exemplo, alterações hormonais (aumento dos níveis elevados de cortisol) que desencadeiam uma cascata de ações importantes para restaurar a homeostasia. Embora, seus efeitos (aumento da pressão arterial, reação luta ou fuga, aumento da circulação sanguínea, aumento da glicemia, etc.) sejam parcialmente mediados por hormônios corticosteroides que acometem o sistema nervoso, tão pouco se sabe sobre quando e como esses efeitos do estresse são benéficos e protetores ou prejudiciais podendo se tornar deletério no organismo (LUCASSEN et. al, 2014).

A relação entre estresse e doença, atualmente, está bem definida, porém nem sempre foi assim. A palavra estresse é usada na física para se referir à interação entre uma força e a resistência para contrabalançar essa força. Hans Selye (1956), foi quem primeiro incorporou esse termo ao léxico médico para descrever a "resposta não específica do corpo a qualquer demanda", ou seja, estresse seria a situação gerada por um desafio ao qual o organismo estaria submetido. Selye é conhecido como o "pai da pesquisa do estresse", ao tomar consciência da controvérsia conceitual e da perda de distinção entre a causa e o efeito, e dada a grande difusão do termo estresse em várias línguas, ele criou um neologismo, o termo estressor, para designar o agente causador (estímulo) e manteve o termo estresse para a condição provocada pelo desafio. Esse conceito utilizado ao termo estresse impactou comunidades científicas e leigas, em campos tão diversos quanto a endocrinologia, a medicina complementar, a criação de animais e a psicologia social. (SIANG YONG TAN; A YIP, 2018).

Em seus estudos experimentais, Selye observou as consequências do estresse em animais submetidos a uma variedade de agentes estressores, como por exemplo, variações térmicas, físicas, comportamentais, entre outros. Com o decorrer das investigações foi constatado que as respostas de ataque ou fuga eram apenas a primeira reação, numa sequência

de outras reações que o organismo produz quando é confrontado a um agente estressor. E essas reações fisiológicas foram denominadas de Síndrome de Adaptação Geral (SAG). A SAG consiste em três fases: a) Fase de alerta: mecanismo de resposta de luta ou fuga perante uma emergência frente a ruptura do equilíbrio interno do organismo, assim a sua finalidade é a de mobilizar todos os recursos do organismo para enfrentar o agente. É uma resposta rápida e mediada principalmente pela ativação do sistema nervoso autônomo simpático (SNAs) que promove a liberação de neurotransmissores em diversos órgãos-alvo e estimula a medula das glândulas adrenais na liberação dos hormônios catecolaminérgicos (adrenalina e noradrenalina), potencializando a ativação neural; b) Fase de resistência: se o agente indutor de estresse se mantém ativo, mas não é suficientemente severo para causar a morte, é nesta fase que o organismo tenta se adaptar ao agente causador do estresse ou eliminá-lo. Assim, as respostas fisiológicas e comportamentais, a fim de restabelecer a homeostase se mantêm e são mediadas principalmente pelo cortisol (hormônio corticosteroide), sintetizado e liberado pelas glândulas suprarrenais, em resposta a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Nesta fase a eficiência das respostas chega ao seu ponto máximo e o indivíduo apresenta seu melhor desempenho físico e cognitivo, além de, manifestar ampla condição de neutralizar o agente estressor; c) Fase de exaustão: de estimulação fisiológica prolongada, em que o organismo tem uma resposta contínua de forma crônica e as alterações fisiológicas e comportamentais, inicialmente adaptativas, levam a uma sobrecarga energética e exaustão dos sistemas, podendo assim, causar-lhe danos irreparáveis, com surgimento de doenças e até levar a morte (RODRIGUES, 2005).

A proposta de Selye estipulava que o estresse estava presente em um indivíduo durante todo o período de exposição a uma demanda não específica, sendo ele causado por algum agente estressor de forma aguda (único, intermitente, exposição em tempo limitado) ou crônica (exposição intermitente mais prolongada ou contínua), que pode ocorrer apenas uma vez, de maneira repetitiva ou antecipada ou o estresse pode ser imprevisível e incontrollável, leve ou grave, e ocorrer dentro ou fora do contexto, por exemplo, de uma experiência de aprendizagem (PACÁK; PALKOVITS, 2001; RJIA et al., 2010; KOOLHAAS et al., 2011). Portanto, a forma como a resposta ao estresse é realmente sinalizada, varia de um indivíduo para outro, assim como a persistência de suas consequências e sua resposta ao agente estressor, pois depende de um conjunto de fatores e eventos, como por exemplo, ambientais, genéticos, entre outros. Desse modo, a reação ao agente estressor compreende aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos, com repercussões no sistema imune, que o

organismo desenvolve diante de um desafio (agente estressor) de natureza física ou psicossocial (positivo ou negativo), que rompe a homeostase do organismo e exige assim um esforço de adaptação, que é denominado de alostasia. (KRETZ et al., 1999; RODRIGUES, 2005; LUCASSEN, 2014).

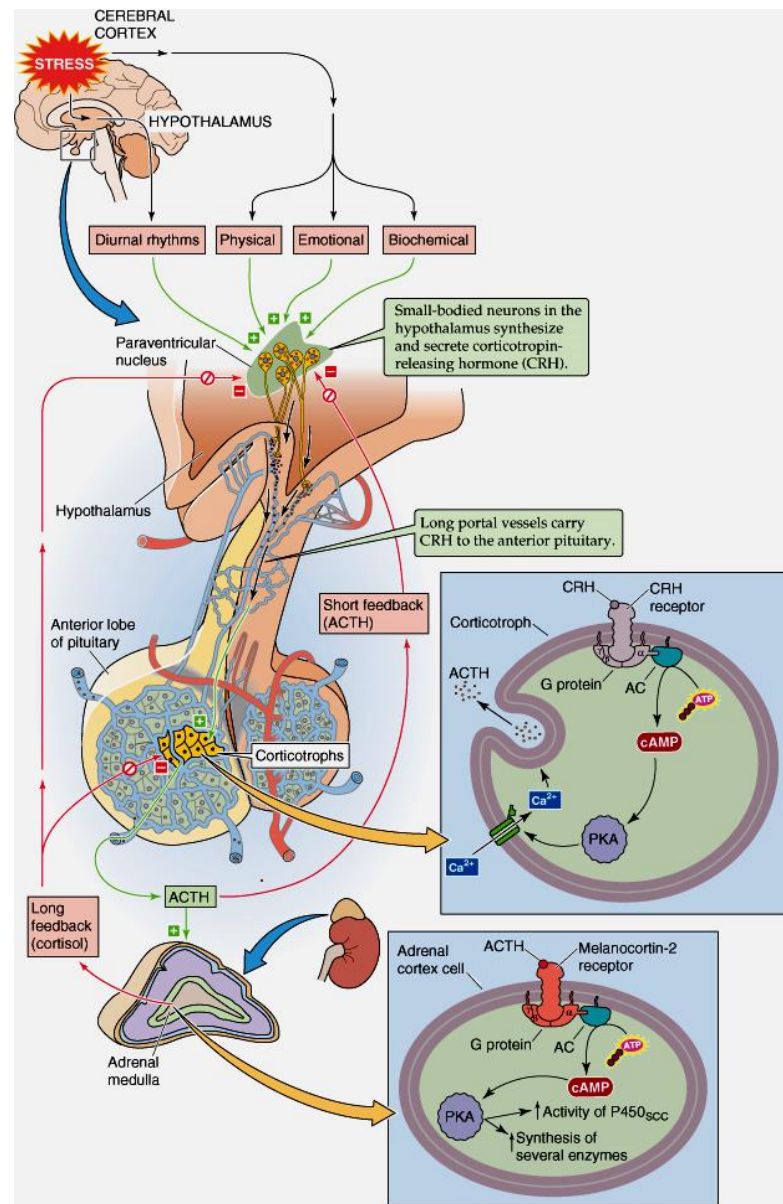
O termo Alostasia, de acordo com McEWEN, (1998) é definido como um processo de resposta fisiológica do indivíduo frente a uma situação de estresse, e é um essencial para a manutenção do equilíbrio do organismo, a adaptação a essa adversidade tem consequências para o corpo que pode ser definido como sendo carga alostática.

Portanto, a carga alostática é a resposta do corpo e do cérebro resultado da hiperatividade ou ainda da inatividade crônica dos sistemas fisiológicos envolvidos na resposta ao estresse. As respostas alostáticas mais comuns envolvem o SNAs e o eixo HPA. A ativação do SNAs representa uma resposta rápida ao estresse com liberação de adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea. Já a resposta a longo prazo é representada pela ativação do eixo HPA resultando na liberação de glicocorticoides pelo córtex da adrenal (Figura 1). Sendo essas respostas resultantes de ajustes do organismo e mecanismos de controle para restabelecimento da homeostase frente à um agente estressor e desvios da homeostase física e emocional que podem ocorrer sob condições de estresse agudo ou crônico, traumático ou não-traumático provocando alterações que resultam em desordens psiquiátricas e psicossomáticas (LEE; KIM; CHOI, 2015).

A sobreposição destes três níveis (fisiológico, cognitivo e comportamental) é eficaz até certo limite, o qual uma vez ultrapassado, poderá desencadear um efeito desorganizado. Assim, se diferentes situações estressoras ocorrem ao longo dos anos, e as respostas a elas variam entre os indivíduos na sua forma de apresentação, podendo ocorrer manifestações psicopatológicas diversas como sintomas inespecíficos de depressão ou ansiedade, ou transtornos psiquiátricos definidos, como por exemplo o TEPT (MARGIS et al, 2003).

O desenvolvimento de um transtorno está diretamente relacionado à frequência e duração da cascata de respostas de ativação provocadas por situações estressoras, como mencionados anteriormente. Deste modo, pesquisadores sugerem que mais estudos de enfoque etiológico sejam realizados, avaliando a relação entre a exposição a diferentes eventos estressores e o surgimento de sintomas e patologias relacionadas ao estresse. Além disso, a importância da compreensão desta relação permite implicações práticas relevantes como a prevenção de doenças e o estabelecimento nas estratégias de tratamento (LUCASSEN et. al, 2014).

Figura 1 - Resposta a Curto-prazo e a Longo-prazo ao estímulo estressor



Fonte: BORON; BOULPAEP, 2008.

Nota: O eixo HPA regulado por mecanismos centrais que envolvem o sistema límbico e o hipotálamo. → Os sinais atingem o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo das estruturas límbicas. → A secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e da arginina vasopressina dos neurônios do PVN desencadeia a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise anterior. → Além do CRH, o ACTH, o cortisol e vários outros mensageiros estão envolvidos no eixo HPA → Por exemplo, pró-opiomelanocortina (POMC), um pró-hormônio, é o precursor de muitos peptídeos bioativos, incluindo o ACTH. O ACTH é derivado do POMC na hipófise anterior, é liberado no sangue e estimula a glândula adrenal.



## 1.2 TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstrou em suas pesquisas dos últimos dez anos, que o número de pessoas com depressão cresceu 18,4%, isso corresponde a 322 milhões de indivíduos. No Brasil, 5,8% dos habitantes sofrem com essa doença, sendo considerado uma das maiores taxas da América Latina. O país também lidera com 9,3 % da população que sofre com sintomas relacionados a ansiedade, que podem contribuir para o surgimento de doenças, como, ataques de pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, fobias, estresse pós-traumático, entre outras. Além disso, o país é considerado o mais ansioso e estressado da América Latina e a OMS estima que desordens relacionadas ao estresse sejam a segunda maior causa de incapacidades até 2020 (OMS, 2019).

O TEPT é uma alteração psiquiátrica desencadeada após uma experiência ou evento traumático. O transtorno é considerado um distúrbio comum, crônico, incapacitante e apresenta manifestações concomitantes de três sintomas: a reexposição ao trauma causando o estresse, a fuga de situações parecidas as anteriores que levaram ao desenvolvimento do transtorno e o estado de hipervigilância (BERARDI et al., 2014; WINGENFELD et al., 2016).

Um modelo experimental em roedores que induz o estresse pós-traumático é a exposição ao choque elétrico inescapável seguida por isolamento social por um período normalmente superior a sete dias. Assim, para que seja estabelecida a desordem é necessário que os animais sejam reexpostos ao local do trauma que levam alterações neurofisiológicas gerando o comportamento de *freezing* (paralisação ou congelamento dos movimentos) (BERADI et al 2014).

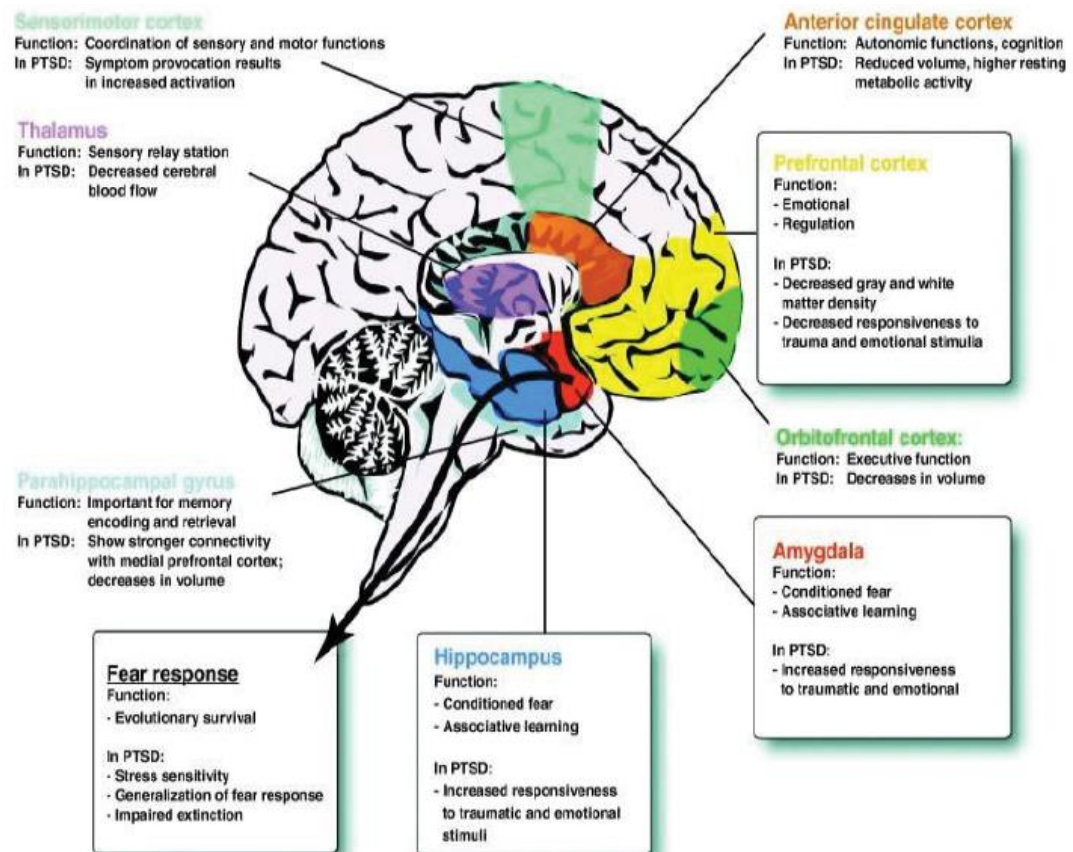
Os sintomas podem desenvolver-se imediatamente ou após algum tempo da exposição ao trauma. O TEPT é heterogêneo, a ocorrência dos sintomas não é previsível, podendo não apresentar da mesma maneira nos indivíduos que sofreram o trauma (KELMENDI et al., 2016). Os principais sintomas no TEPT são: episódios de pânico, distúrbios de humor, comportamento suicidas, depressão, ansiedade, medo, entre outros (JACOBSEN et al., 2001; BOSCARINO, 2004; JIN et al., 2009; SCOTT et al., 2008).

O medo é uma resposta natural que desencadeia muitas alterações fisiológicas no intuito de preparar o organismo para evitar o perigo, porém os indivíduos que sofrem com TEPT são incapazes de controlar o medo, devido ao fato da reação estar alterada ou danificada e durante o transtorno algumas reações estão associadas com a incapacidade de inibir respostas ao medo. Além do comportamento ansioso encontrado em indivíduos com o

transtorno, a patogênese da doença inclui também mudanças neuroendócrinas levando os prejuízos cognitivos, ao desenvolvimento de outras desordens emocionais, como a depressão, além de, redução da interação social e locomoção (Figura 2) (TREZZA; CAMPOLONGO, 2013; BERADI et al., 2014).

Além disso, estudos também tem demonstrado que o TEPT pode promover alterações no metabolismo. Pesquisas realizadas com veteranos de guerra e diagnosticados com TEPT demonstraram que esses veteranos se apresentaram obesos, com resistência à insulina, problemas cardiovasculares, entre outras alterações, e com o decorrer do tempo, essas alterações levavam esses veteranos a contrair doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes, hipertensão, dislipidemias e síndrome metabólica. (VIEWEG et al., 2006; HEPPNER et al., 2009; ROSENBAUM et al., 2015; GREEN et al., 2016, BLESSING et al., 2017).

Figura 2 - Esquema das áreas dos cérebros relacionados a funcionalidade e comprometimento de TEPT



Fonte: SAKELLARIOU; STEFANATO, 20017.

Nota: Neurotransmissores e TEPT: a desregulação dos neurotransmissores (catecolaminas, serotonina, aminoácidos, peptídeos e opioides) envolvidos com a função reguladora e integradora das respostas ao medo e estresse circuito cerebral da TEPT.

### 1.3 TEPT E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

Rosenbaum e colaboradores (2015) demonstrou em seu trabalho que o TEPT pode levar a distúrbios metabólicos, como a obesidade e diabetes mellitus (DM) tipo 2. Além do mais, outras pesquisas também evidenciam que indivíduos que possuem TEPT, com o decorrer do tempo, podem apresentar alguma alteração metabólica, como obesidade, diabetes e síndrome metabólica. (FARR et al., 2014; MICHPOULOS; VESTER; NEIGH, 2016).

Estudos revelaram que a relação do estresse com o metabolismo no TEPT provavelmente ocorre através da ativação do sistema nervoso simpático e da liberação de hormônios pelo eixo HPA, afetando processos metabólicos, com aumento do surgimento de doenças crônicas (hipertensão arterial, diabetes, síndrome metabólica, etc.) e que podem estar relacionados também com alterações cerebrais, como por exemplo, provocando retrações de processos dendrítico e inibição da neurogênese envolvidos com doenças neuropsiquiátricas (VANITALLIE, 2002; ULRICH-LAI & HERMAN, 2009; PECKETT, WRIGHT, RIDDELL, 2011; FARR, 2014).

Pesquisadores apontam que os sintomas do TEPT têm sido associados ao aumento dos níveis de glicocorticoides, que estimulam modificações nas cascatas de transcrições de genes que controlam ativações no eixo HPA, assim promovendo alterações no metabolismo, como por exemplo, o aumento do acúmulo do tecido adiposo podendo levar a obesidade (MEEWISSE et al., 2007; YEHUDA, 2005; ECKEL et al., 2010, PECKETT; WRIGHT; RIDDELL; 2006). Observa-se, então, que o TEPT pode modificar o metabolismo, porém, ainda não está esclarecido na literatura, se o metabolismo alterado pode modificar seu desenvolvimento.

Pesquisas demonstram uma alta incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (cardiovasculares, respiratórias, crônicas, cânceres, hipertensão, diabetes, síndrome metabólica) no mundo e sabe que essas doenças são responsáveis por cerca de 70% de todas as mortes no mundo, estimando-se 38 milhões de mortes anuais. Desses óbitos, 16 milhões ocorrem prematuramente (menores de 70 anos de idade) e quase 28 milhões, em países de baixa e média renda. O aumento da ocorrência dessas doenças tem sido impulsionado por cinco fatores de risco: tabagismo, sedentarismo, uso de álcool, dietas inadequadas e a poluição do ar. Além do mais, esses fatores também estão relacionados com problemas de saúde mental, que podem se originar desde cedo (metade dos os transtornos mentais começa aos 14 anos, mas a maioria dos casos não é detectada e tratada de forma oportuna) e levar a

consequências graves, como por exemplo, o suicídio, que é a segunda causa de morte entre adolescentes de 15 a 19 anos, embora, vários outros tipos de transtornos podem aparecer ao longo da vida. Nota-se, então, que o número da incidência de mortalidade relacionadas as alterações metabólicas são alto e relevante, e ao decorrer da vida, indivíduos que possuem DM e SM podem experimentar algum tipo de trauma (MALTA et al., 2017; OMS, 2019). Assim, nosso trabalho tem como um dos objetivos procurar compreender qual seria o desenvolvimento do TEPT em distúrbios metabólicos já instaurados, como por exemplo, na SM e DM.

#### 1.4 SÍNDROME METABÓLICA

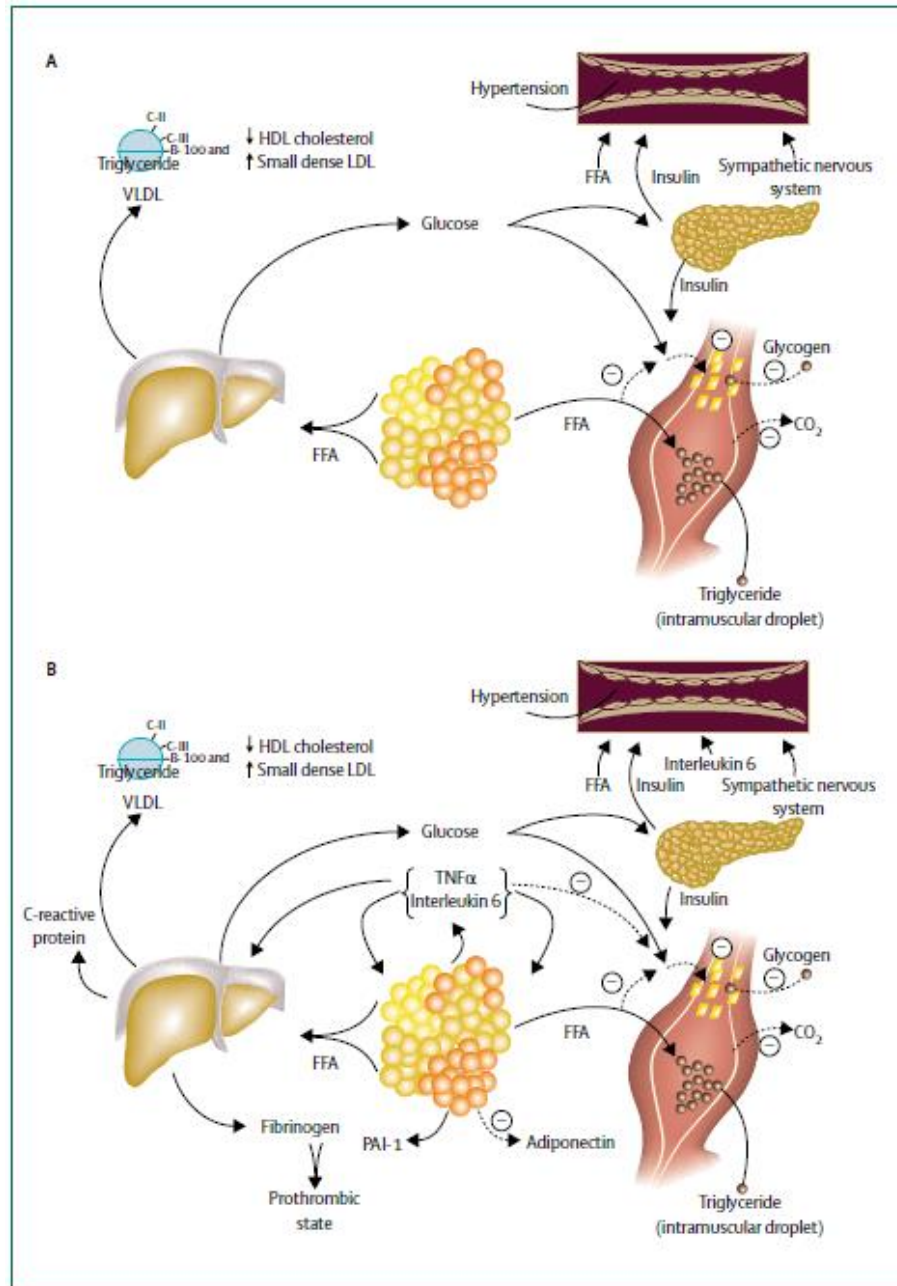
A SM é um distúrbio metabólico comum que resulta do aumento da prevalência da obesidade. A fisiopatologia tem como base a resistência à insulina associada a elevados níveis de ácidos graxos. Além do mais, aumento das citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), resistina, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e proteína C-reativa que refletem no aumento da massa de tecido adiposo (Figura 3). Evidências sugerem que macrófagos derivados de monócitos se ligam no tecido adiposo e podem ser fontes da liberação de citocinas pró-inflamatórias localmente e na circulação sistêmica. Há também relatos crescentes na literatura de que a resistência à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo não está associada apenas à abundância de citocinas pró-inflamatórias ou a deficiência de citocinas anti-inflamatórias, mas é um resultado direto dessa carga (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

A SM é caracterizada por um grupo de fatores de risco que sinalizam processos fisiopatológicos subjacentes anormais que aumentam o risco de morbidade (por exemplo, doença cardiovascular, diabetes de Tipo II, dislipidemia e hipertensão arterial) e mortalidade (RASMUSSEN et al., 2010). Segundo o *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III, 2002) referenciado mundialmente, inclusive pela Sociedade Brasileira de DM, a SM representa a combinação de pelo menos três componentes dos apresentados a seguir: obesidade (aumento da circunferência abdominal), aumento dos triglicérides, aumento da pressão arterial (hipertensão) e aumento da glicemia de jejum (resistência à insulina e DM).

Pesquisas sugerem que o aumento do consumo dietético de frutose na sociedade ocidental pode estar contribuindo para altas taxas crescentes de obesidade e síndrome metabólica. Esses

fatores estão intimamente associados à produção anormal de citocinas e à ativação de uma rede de vias de sinalização inflamatória (FORTINO et al., 2007; FERDER et al., 2010; ORLANDI et al., 2015).

Figura 3 - Fisiopatologia da resistência à insulina e síndrome metabólica



Fonte: ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005.

Nota: A- O aumento da adiposidade ocasionada pela hiperinsulinemia se dá por um processo complexo. Inicialmente, após a absorção dos carboidratos, o fígado é responsável por lançar a glicose na corrente sanguínea, esta será direcionada para os tecidos alvos, como o tecido muscular exemplificado na figura acima. A insulina é responsável pela entrada da glicose nas células deste tecido e após sua entrada, a glicose tem alguns destinos tais como a formação de ATP por meio da acetil-COA através do ciclo de Krebs, ou então seu armazenamento na forma de glicogênio. O

desequilíbrio ocorre quando há grande ingestão de carboidratos, pois o aumento no consumo desse macronutriente e a sua não utilização faz com que ocorra um aumento na formação de acetil-COA que não será convertida em energia (ATP), mas sim em Triacilglicerol (TAG) no fígado, sendo assim será convertido em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e posteriormente em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ocasionando a redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL), responsáveis por executar a desobstrução de vasos sanguíneos. Ainda neste sentido, o aumento do consumo de carboidratos, requer maior presença de insulina. A insulina, muito embora seja um hormônio antilipolítico (inibe a lipase hormônio sensível ativada por AMP cíclico - LHS), atua estimulando a lipase lipoproteica (LLP) que, por sua vez aumenta a presença de ácidos graxos livres (AGL). Estes AGL contribuem ainda mais para o aumento da adiposidade e para o aumento da concentração de glicose já que são utilizados para fazer neoglicogênese no fígado. Neste caso, a neoglicogênese ocorre devido à ingestão exacerbada de carboidratos e o aumento na presença de insulina no organismo (hiperinsulinemia) que o torna menos sensível a ela. Assim, as moléculas de glicose encontram certa dificuldade para adentrar as células, que permanecem mandando estímulos para que haja produção de glicose, então é realizada a neoglicogênese no fígado e todo o processo se repete, tornando-se um ciclo. Além disso, o aumento do VLDL e LDL e a redução do HDL citadas acima, caracterizam uma dislipidemia e, por sua vez, o aumento do LDL se torna responsável pela deposição de placas ateroscleróticas nos vasos sanguíneos que já não podem mais ser desobstruídos, pois o HDL não se faz presente. Essa situação, é responsável por causar o aumento da pressão arterial. Além do mais, a hiperinsulinemia é responsável pelo aumento da reabsorção de sódio e aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS), fatores que contribuem para a hipertensão.

B: Além do mecanismo exposto acima, o tecido adiposo é responsável por produzir uma série de substâncias de efeito parácrino e endócrino que consolidam um estado pró-inflamatório. Entre as substâncias produzidas está o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-6 (IL-6). O TNF- $\alpha$  é responsável por reduzir a ação da insulina. Enquanto isso, a IL-6 é responsável por aumentar a produção de glicose hepática e a produção de VLDL. Por outro lado, o aumento da adiposidade é responsável por inibir a adiponectina, hormônio responsável por aumentar a resistência à insulina. Não bastando, essas alterações contribuem ainda para que ocorra uma falha no sistema de coagulação e fibrinólise, em que ocorre um aumento dos níveis de fibrinogênio e elevação do PAI-1C (inibidor do ativador do plasminogênio, que é uma enzima fibrinolítica), ou seja, há um aumento na produção da rede de fibrina e uma inibição de fatores que seriam responsáveis por clivá-la. Isso faz com que ocorra grandes depósitos de fibrina no vaso, surgindo assim uma placa aterosclerótica.

Vários modelos experimentais são utilizados para verificar as desordens metabólicas, tais como os que envolvem a manipulação genética e a utilização de dietas (KENNEDY et al., 2010). Dentre esses modelos, as dietas ricas em frutose são amplamente empregadas para desencadear o aparecimento de sinais característicos da síndrome metabólica em animais, permitindo assim, avaliar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da mesma (HAVEL, 2005; HERNÁNDEZ-SALINAS et al., 2015; RICHARD; ROBERT, 2010; SIL et al., 2015; TRAN et al., 2009).

A frutose é um açúcar simples, do grupo das hexoses, que muito se assemelha a glicose, diferindo apenas pela posição do grupo carbonila, que na frutose (cetose) encontra-se

no carbono 2 e na glicose (aldose) no carbono 1 (LE; TAPPY, 2006). Ela está associada as alterações bioquímicas que promovem o desenvolvimento SM, doença hepática gordurosa não alcoólica e diabetes. É metabolizado pelo fígado, onde estimula lipogênese e a síntese de triglicerídeos que levam à resistência à insulina hepática e à dislipidemia (GUGLIUCCI, 2017).

Assim, no nosso estudo nós utilizamos como protocolo para indução da SM, a ingestão da dieta de frutose nos ratos *wistar* machos, por ser um modelo barato, acessível e bem estabelecido na literatura. Além disso, outro foco do trabalho, é desenvolvimento do TEPT na diabetes, como mencionado anteriormente, umas das principais alterações da SM é a resistência à insulina e também estudos em veteranos de guerra com TEPT demonstram um aumento a resistência à insulina ao longo da vida, podendo levar a doenças, como, a diabetes. Por isso, a importância de avaliar o desenvolvimento do TEPT em animais com diabetes.

## 1.5 DIABETES MELLITUS

A DM é uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo, com estimativas de mais de 425 milhões de pessoas com DM no mundo, metade delas não diagnosticadas e esse número pode chegar a 642 milhões de pessoas até o ano 2040. Sabe-se que a diabetes está frequentemente associado a complicações psiquiátricas, como transtorno de ansiedade e tem uma alta prevalência em indivíduos com TEPT. Como já mencionado, também foi relatado que o TEPT pode levar à susceptibilidade a outras doenças, incluindo as que estão relacionadas as alterações metabólicas (DEDERT et al., 2010; ZUNG et al., 2012; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; SMITH et al., 2013; DUARTE; MOHSIN, 2018; SOUZA et al., 2019).

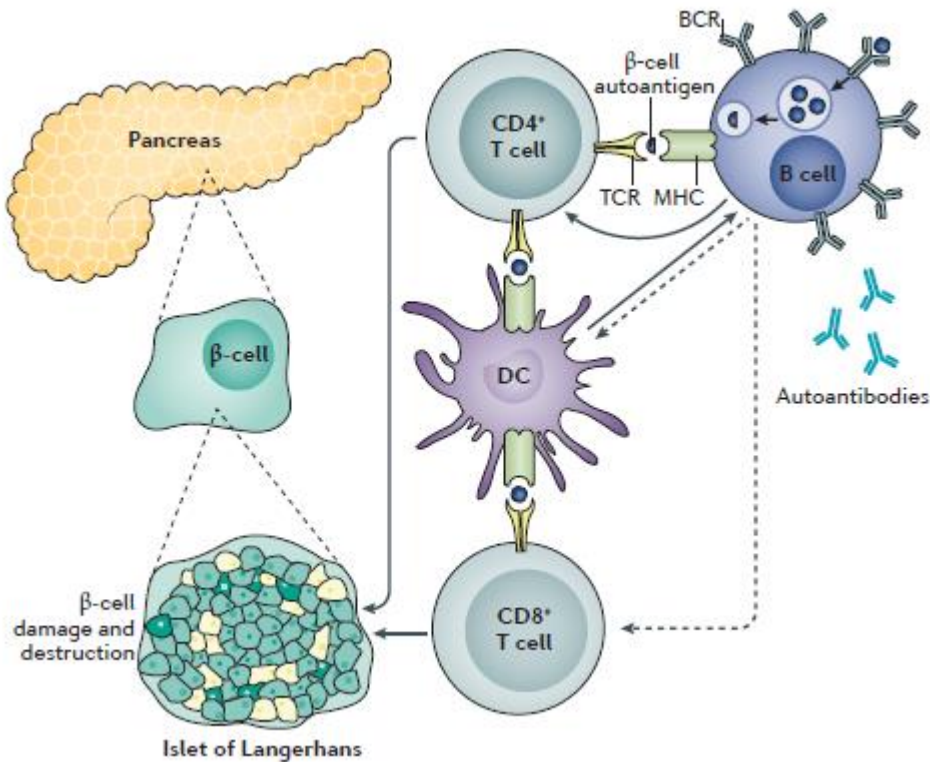
A DM é um conjunto de alterações metabólicas que são caracterizadas por deficiência de insulina e/ou resistência à insulina, hiperglicemia e metabolismo alterado de lipídios, carboidratos e proteínas. Além disso, a DM está associada com outras complicações e alterações no organismo, como, disfunções e insuficiência de vários órgãos (por exemplo: olhos, rins, nervos, cérebro, coração, vasos sanguíneos, etc.), que podem resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, como por exemplo, destruição das células beta do pâncreas, resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros (MCNEILL, 1999; BRASIL, 2006; OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2019/2020).

Alterações em relação aos níveis de glicose e insulina circulantes podem levar a diabetes que pode ser classificada em 2 tipos principais, tipo I e tipo II (ou gestacional). A DM tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune, poligênica, decorrente da destruição das células  $\beta$  pancreáticas, ocasionando deficiência completa na produção de insulina, aparece geralmente na infância ou adolescência, mas também pode ser diagnosticada em adultos (Figura 4). A DM tipo 2 (DM2) possui uma etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genéticos e ambientais, geralmente acomete indivíduos adultos, mas também pode ser diagnosticada na infância. Trata-se de doença poligênica, com forte herança familiar, ainda não completamente esclarecida, cuja ocorrência tem contribuição significativa de fatores ambientais. Dentre eles, hábitos dietéticos inadequados e sedentarismo, que contribuem para a obesidade, destacam-se como os principais fatores de risco. O desenvolvimento e a perpetuação da hiperglicemia ocorrem concomitantemente com hiper glucagonemia, resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina, aumento da produção hepática de glicose, disfunção incretínica, aumento de lipólise e conseqüente aumento de ácidos graxos livres circulantes, aumento da reabsorção renal de glicose e graus variados de deficiência na síntese e na secreção de insulina pela célula  $\beta$  pancreática. Sua fisiopatologia, diferentemente dos marcadores presentes no DM1, não apresenta indicadores específicos da doença (Figura 5). A DM gestacional, surge durante a gravidez, e também está relacionado a resistência insulina, uma vez que a placenta produz hormônios hiperglicemiantes e enzimas placentárias que degradam a insulina, com conseqüente aumento compensatório na produção de insulina e na resistência à insulina, podendo evoluir com disfunção das células  $\beta$  (OLIVEIRA; MONTENEGRO JUNIOR; VENCIO, 2019-2020).

Muitos trabalhos têm sido realizados para uma melhor compreensão da DM. Atualmente estão disponíveis modelos animais espontâneos (geneticamente modificados) e não-espontâneos (diabetes induzido experimentalmente). Os não-espontâneos são os mais utilizados, devido ao seu custo mais baixo, facilidade de manutenção e estreita relação com a diabetes humana. Nesse modelo a condição diabética pode ser induzida por dieta (por exemplo, alta sacarose e dieta com alto teor de gordura), farmacológico (estreptozotocina ou aloxana), cirúrgico (removendo órgãos como pâncreas), ou por qualquer combinação destes métodos (RESS; ALCOLADO, 2005; SRINIVASAN; RAMARAO, 2007; ZHANG et al., 2008; KUMAR et al., 2011;; DIAO et al., 2014).



Figura 4 - Patogênese da DM1

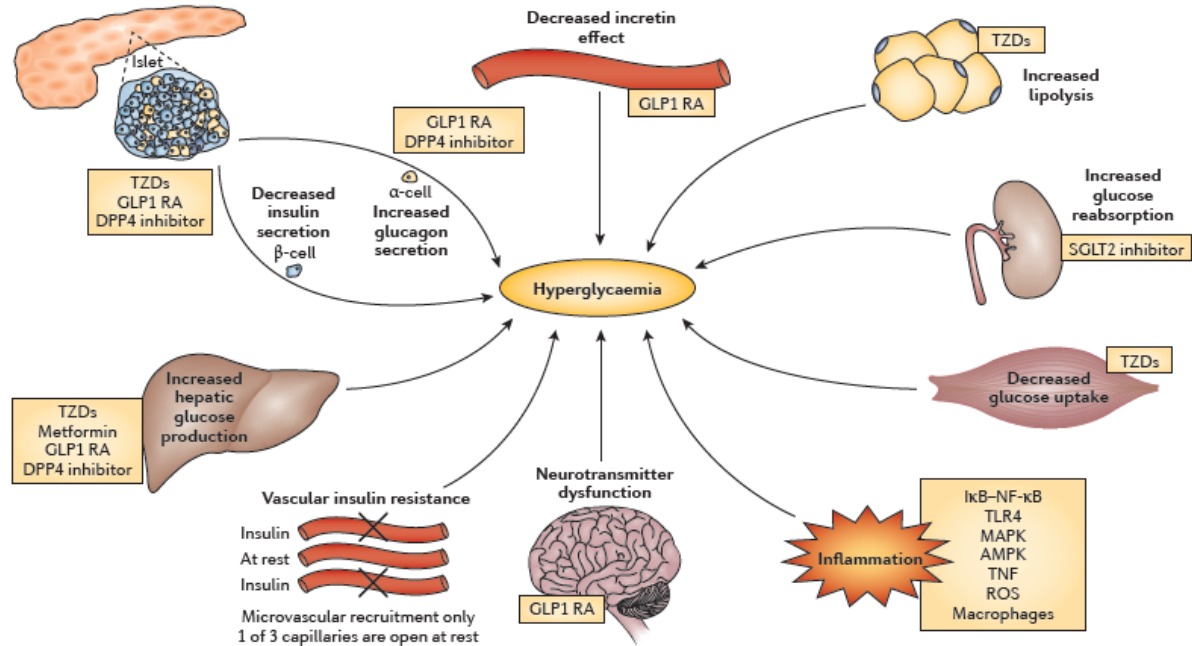


Fonte: KATSAROU et al., 2017.

Nota: A DM1 é uma doença autoimune em que se observa uma deficiência na produção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas ocasionando hiperglicemia. Como demonstrado na figura acima, as células  $\beta$  antigênicas são fagocitadas, processadas e apresentadas pelas células B (células apresentadoras de antígeno - APCS) aos linfócitos CD4+ por meio do MHC2. Os linfócitos CD4+ serão ativados e estimularão macrófagos e células natural killers (NK) para destruição das células  $\beta$  antigênicas nas ilhotas de langerhans. Além disso, no momento da ligação das células  $\beta$  antigênicas ao receptor BCR das células B, há uma grande produção de anticorpos que se ligarão às células  $\beta$  antigênicas, impedindo que as mesmas atuem. Neste sentido, as células dendríticas, que também são APCS, apresentaram as células  $\beta$  antigênicas aos linfócitos CD8+ que atuarão nas ilhotas de langerhans afim de destruir as células  $\beta$ , impedindo a síntese de insulina.

A aloxana tem como mecanismo de ação provocar um aumento súbito na secreção de insulina, provavelmente devido ao influxo de íons cálcio ao citosol das células  $\beta$ , porém, trata-se de uma liberação de curta duração, seguida por completa supressão da resposta das ilhotas pancreáticas à glicose em decorrência de necrose das células  $\beta$ . Assim, a ação da aloxana no pâncreas ocorre por sua rápida absorção e acúmulo nas células  $\beta$ , atribuída a uma elevada taxa de captação da droga por essa célula, através do transportador de glicose GLUT2 presente no plasma (SZKUDELSKI et al., 1998; LIMA et al., 2001; SZKUDELSKI, 2001; ZANOELLO et al., 2002; CAVALLI et al., 2007; LENZEN, 2008; SILVA; NOGUEIRA, 2015).

Figura 5 - Hiperglicemia na DM2



Fonte: DEFRONZO et al., 2015.

Nota: A hiperglicemia se dá principalmente pela redução da absorção de glicose pelos tecidos, devido à baixa sensibilidade à insulina e à sua baixa secreção (ocasionada também pela presença de fatores pró-inflamatórios). Além disso, a baixa absorção de glicose aumenta a liberação do hormônio glucagon que estimula a gliconeogênese no fígado, aumentando ainda mais a produção de glicose. O aumento da insulina, ativa ainda a lipase lipoproteica (LLP) que mobiliza ácidos graxos que irão aumentar a adiposidade e a resistência à insulina e, por consequência, aumentará a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Estas, aos poucos levarão ao mau funcionamento pancreático, reduzindo a secreção de insulina, piorando cada vez mais o quadro. Os rins aumentam sua reabsorção de glicose, mantendo a hiperglicemia. Além disso, o ganho de peso é favorecido já que os fatores que suprimem o apetite (insulina, leptina, GLP1, amilina, peptídeo YY, altos níveis de dopamina e serotonina no cérebro) não se fazem presentes.

Assim, no presente estudo foi definido como indução de diabetes o modelo utilizando a aloxana, por ser um protótipo tradicional, bem utilizado em vários delineamentos experimentais e que geraram nos animais sintomas encontrados da síndrome diabética em humanos como, perda de peso, hiperglicemia, glicosúria, polifagia, polidipsia, entre outros, além de ter um menor custo comparado a estreptozotocina (LERCO et al., 2003; CAVALLI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007; SILVA; NOGUEIRA, 2015).

## 1.6 ESTRESSE E ALTERAÇÕES METABÓLICAS ENVOLVIDOS COM A ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA

O SNC é composto basicamente por dois tipos celulares: os neurônios e as células da glia. As células gliais, junto com os neurônios, desempenham várias funções relevantes no

processamento das informações que garantem o desenvolvimento e funcionalidade do SNC (KIMELBERG; NOREMBERG, 1989; LENT, 2001; ROMÃO, 2007). As células gliais contribuem de diversas formas para a sustentação da homeostase tecidual e para a neuroinflamação, como, na monitoração do ambiente externo, respondendo aos sinais de desequilíbrio na homeostase (microglias) e participam de todas as funções essenciais do SNC, como metabolismo energético, defesa imunológica e neurotransmissão (astrócitos) (KREUTZBERG, 1996; OBERHEIM et al., 2012). Elas podem ser classificadas no SNC em dois grupos que se diferem de acordo com sua morfologia e funcionalidade: a microglia, de origem mesodermal, e a macroglia, de origem ectodermal (RANSOM; KETTENMANN, 1990; GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013).

A microglia tem como principal função a defesa imunológica do SNC, sendo em geral, recrutada após infecções, lesões ou doenças degenerativas (RANSOM; KETTENMANN, 2005; GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013). Dentre as proteínas estudadas na microglia e foco desse trabalho, se encontra a Molécula Adaptadora de Ligação de Cálcio ionizada 1 (Iba-1), que é uma proteína pequena 17 kDa, consistindo em 147 aminoácidos que funciona como uma molécula adaptadora que medeia os sinais de cálcio na linhagem monocítica, incluindo microglia. Estudos com indução do estresse crônico (estresse de contenção, estresse único prolongado, lesão cerebral leve e repetida e exposição ao choque) em roedores induziram um aumento de Iba-1 (imuno-histoquímica), indicando uma ativação de microglia em áreas do tálamo, mesencéfalo, córtex e hipocampo (BOLLINGER et al., 2016; YOSHII et al., 2017; BROUSSARD et al., 2018; SMITH et al., 2019).

Já a macroglia é dividida em 3 classes: oligodendrócitos (responsável pela mielinização dos axônios), ependimócitos (células que revestem os ventrículos encefálicos e o canal central da medula, as células epiteliais pigmentares da retina; e as células do plexo corioideo, presentes no interior dos ventrículos e que produzem o líquido cefalorraquidiano, líquido); astrócitos (principal fonte de fatores de crescimento para os neurônios e presentes em diversas regiões do SNC) (RANSOM; KETTENMANN, 2005; GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013).

Os astrócitos compreendem a população mais abundante da glia no cérebro de mamíferos e são fundamentais para a boa funcionalidade do SNC, uma vez que participam de eventos como migração neuronal, proteção contra o estresse oxidativo, composição da barreira hematoencefálica, transmissões sinápticas e resposta imune com secreção de citocinas pró-inflamatórias (VOLTERRA; MELDOLESI, 2005). A ativação dos astrócitos está

associada à expressão de uma proteína, chamada de Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP). A GFAP constitui o principal biomarcador de astrócitos, e é um tipo de filamento intermediário que compõe o citoesqueleto da célula astrocitária (RODNIGHT et al., 1997).

A capacidade de respostas dos astrócitos ao sistema nervoso comprometido (lesão, inflamação, drogas de abuso, doença neuropsiquiátrica) varia de astrocitopatia a astrogliose, incluindo expressão gênica e tamanho celular reduzidos, aumento da expressão de GFAP, tamanho celular e liberação moléculas pró- inflamatórias. Um grande número de pesquisas na literatura indica adaptações e alterações de células gliais, como, os astrócitos quando relacionadas as doenças e transtornos neuropsiquiátricos (SOFRONIEW; VINTERS, 2010; PEKNY et al., 2016, KIM et al., 2017). Assim, o foco na relação entre doenças neuropsiquiátricas e células glias são essenciais para fornecer informações necessárias sobre os mecanismos celulares que estão envolvidos nessa cascata de reações e que serão alvos importantes para futuros tratamentos terapêuticos, principalmente para indivíduos com TEPT.

Nos últimos anos, as células gliais estão cada vez mais sendo estudadas, desvendando novos paradigmas para o funcionamento do sistema nervoso, tais como a descoberta de que elas são excitáveis e se comunicam com outras células ou, ainda, se são células-tronco, podendo gerar diferentes tipos celulares, configurando-se um dos temas mais discutidos na neurociência atual. No entanto, vários questionamentos ainda não estão bem esclarecidos na literatura, e se tornam ainda mais complexos diante do cenário atual de que as células gliais são heterogêneas, tanto no que se refere à expressão de diferentes fatores de crescimento, receptores de neurotransmissores, marcadores moleculares, quanto no que se refere ao potencial da sinaptogênese e como progenitores neurais (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013).

De acordo com a literatura, as áreas cerebrais responsáveis pelas respostas ao medo e pela memória são o córtex pré-frontal e regiões do hipocampo (MILAD et al., 2006; LEHNER et al., 2015). Pesquisas relacionando o estresse crônico (exposição ao choque, estresse prolongando único) em roedores demonstraram que o estresse induz modificações morfológicas nas células da glia do hipocampo em ratos modelo de TEPT, com perda destas células e redução na expressão da proteína glial ácida fibrilar – GFAP (HAN; XIAO; WEN, 2015; SAUR et al., 2016). Porém, outros estudos após a indução do estresse crônico (lesão cerebral leve e repetida em camundongos, exposição ao choque em ratos, etc.) demonstram um aumento de GFAP em áreas cerebrais como córtex pré-frontal e hipocampo na avaliação

imuno-histoquímica (KAMNAKSH et al, 2011; BROUSSARD et al., 2018; JONES et al., 2018).

Assim, é importante compreender como ocorre a atuação das células gliais no hipocampo e córtex pré-frontal, pois além de estarem relacionados aos mecanismos de ativações gliais em doenças metabólicas e neuropsiquiátricas, desempenham papéis importantes, como, no metabolismo, comportamento cognitivo, aprendizado, memória, comportamento social, entre outros (DI BENEDETTO; RUPPRECHT, 2013)

O equilíbrio do metabolismo no organismo está relacionado a uma cascata de ações desencadeadas pelo sistema nervoso central (SNC) e pelo sistema endócrino. Uma das funções determinantes para o equilíbrio do metabolismo é assegurar o controle dos níveis de glicose no plasma. Assim, que ocorre um desequilíbrio da glicose no organismo, pode ocorrer por exemplo, um aumento da concentração de glicose no plasma, configurando-se como um quadro de hiperglicemia, que resultam em consequências neurológicas, apesar de não esclarecidas, podem influenciar no metabolismo cerebral (MELLO et al., 2012).

O SNC é considerado um sistema glicodependente, no qual, a glicose exerce papel essencial no seu funcionamento. O neurônio é conhecido como a unidade funcional do sistema nervoso, atua em conjunto, agrupando em circuitos ou redes neuronais, os quais são os responsáveis pelo funcionamento de nossas atividades diárias. Outro importante componente desse circuito é a glia, a qual possui atividade de grande relevância e influencia diretamente a atividade neuronal (JAQUES-SILVA; GEMELLI; CARVALHO, 2007; MELLO et al., 2012). O processo neurodegenerativo no hipocampo em roedores diabéticos é acompanhado por neuroinflamação e astrogliose. Denver e colaboradores mostraram astrogliose e microgliose no córtex e no giro dentado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 18 dias. (DENVER, GAULT, MCCLEAN, 2018; GARCIA-SERRANO; DUARTE, 2020)

Além disso, pesquisas demonstram que a obesidade pode promover uma resposta inflamatória crônica de baixo grau nos tecidos periféricos, incluindo o SNC. A inflamação em áreas cerebrais, como hipotálamo, é considerada um fator precoce e determinante para o aparecimento da obesidade, fato que ocorre mesmo antes do ganho de peso corporal. No trabalho de Buckman e Thompson, observou-se astrogliose em resposta à obesidade no hipotálamo de camundongos, com aumento da expressão GFAP, que pode ser identificada como sinal de neuroinflamação associada à microvasculatura. Devido à sua proximidade física aos vasos sanguíneos e sua função no transporte de nutrientes, os astrócitos são

diretamente afetados pelo excesso de nutrientes, levando à astrogliose no hipotálamo. Posteriormente, foi demonstrado que outras áreas do SNC apresentaram o mesmo tipo de resposta astrocitária, como o córtex parietal e frontal, o corpo caloso, o núcleo accumbens, a ponte e as camadas molecular e granular do cerebelo (HASLAM; JAMES, 2005; ARAÚJO; TORSONI; VELLOSO, 2010; THALER et al., 2012; BUCKMAN et al., 2013; GARCIA-CÁCERES; YI; TSCHÖP, 2013; BONDAN et al., 2018; BONDAN et al., 2019).

Portanto, diante do exposto observa-se que o TEPT pode promover alterações comportamentais (ansiedade, depressão, isolamento social e déficit de memória não relacionada ao trauma), bem como, o desenvolvimento de alterações metabólicas (diabetes, obesidade, síndrome metabólica, etc.). No entanto, ainda não é esclarecido, como ocorre o desenvolvimento do TEPT em indivíduos com alguma alteração metabólica, e como já mencionado anteriormente, há uma alta incidência de mortalidade de indivíduos que possui alterações metabólicas e também um aumento no número de pessoas que desenvolveram o TEPT em alguma fase da vida. Assim, esse estudo tem como um dos objetivos, avaliar o desenvolvimento do TEPT em roedores com diabetes e síndrome metabólica. Além disso, o outro foco deste trabalho, foi verificar a ativação das células da glia no desenvolvimento do TEPT em roedores com as alterações metabólicas já instauradas, no intuito de abrir um novo caminho para compreender os mecanismos envolvidos e conceber novas abordagens terapêuticas.

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos realizados nos últimos anos demonstraram um aumento na prevalência de doenças neuropsiquiátricas (TEPT, ansiedade, depressão, Síndrome do Pânico, etc.), e segundo a OMS, será a segunda maior causa de incapacidades até 2020. Além disso, pesquisas também apresentam que alterações metabólicas (Obesidade, DM, SM, etc.) estão aumentando globalmente e que suas taxas de mortalidade são responsáveis por cerca de 70% de todas as mortes no mundo, estimando-se 38 milhões de mortes anuais. Sabe-se que o TEPT pode modificar o metabolismo, levando a distúrbios metabólicos, como a SM e DM, no entanto ainda não é esclarecido se o distúrbio metabólico preexistente aumenta o risco do desenvolvimento do TEPT. Assim, estudos são importantes para elucidar os mecanismos que associem essas patologias, que nos últimos anos acometem várias pessoas, para que sejam determinadas intervenções terapêuticas que contribuam para a eficácia no tratamento dos distúrbios metabólicos quando associado com o transtorno. Portanto, o presente trabalho verificou as influências de distúrbios metabólicos, já instaurados, SM e a DM, no desenvolvimento do TEPT. Além disso, outro foco da pesquisa, avaliou a ativação das células gliais, que vinculam a exposição à adversidade ao desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos associados a SM e DM preexistente, através da quantificação da expressão das proteínas GFAP e Iba-1 no córtex pré-frontal e no hipocampo dos animais experimentais.

### 3 OBJETIVOS

A seguir serão apresentados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho:

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as influências de alterações metabólicas no desenvolvimento do transtorno do estresse pós-traumático (TEPT).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São os objetivos específicos:

- a) investigar a caracterização da síndrome metabólica induzida por frutose;
- b) investigar a caracterização da diabetes induzida por aloxana;
- c) investigar o desenvolvimento do TEPT nos animais com SM ou diabetes nas avaliações comportamentais: aparato do campo aberto para avaliar a locomoção, teste de interação social para avaliar a comportamento semelhante a interação social, nado forçado para avaliar comportamento semelhante a depressão, aparato em labirinto em cruz elevado para avaliar comportamento semelhante a ansiedade e o reconhecimento de objetos para avaliar memória não relacionada ao trauma;
- d) Quantificar a expressão das proteínas GFAP e Iba-1 no hipocampo e córtex pré-frontal por *Western Blotting* para avaliar a ativação glial no grupo de animais SM;
- e) Quantificar a expressão da proteína GFAP no hipocampo e córtex pré-frontal por *Western Blotting* para avaliar a ativação glial no grupo de animais diabetes.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir serão apresentados o material e métodos do presente trabalho:

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 100 ratos machos Wistar, com peso aproximado 80 a 100 gramas e idade de 3 semanas no protocolo de Protocolo I (SM induzida por frutose) e 64 ratos com peso aproximado 250 gramas e idade de 7 semanas no Protocolo II (DM induzida por aloxana), provenientes do Biotério Central da UNIFAL-MG. Os ratos foram alojados no biotério do laboratório de Fisiologia na UNIFAL-MG, campus Alfenas. Após a chegada do biotério, os animais passaram por um período de ambientação ao novo ambiente por 7 dias em caixas de polipropileno, adequadas à sua manutenção em sala climatizada a  $21 \pm 2$  °C em ciclo 12 horas claro-escuro e tratados com ração comercial (Nuvilab®/ composição de calorias em 100 g - Carboidrato = 53 Kcal, Proteínas = 20 Kcal e Lipídeos = 4,5 Kcal) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela comissão de ética em experimentação animal (CEUA) da Unifal-MG com protocolo 24/2017.

### 4.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Nos procedimentos experimentais foram realizados testes comportamentais referentes ao protocolo I e II.

#### 4.2.1. Protocolo I: Síndrome metabólica induzida por frutose

Os ratos foram randomizados e divididos por grupos que receberam, água (controle) ou solução de frutose 10% *Labsynth*®, por 5 semanas e ambos grupos também receberam ração comercial padrão “*ad libitum*” (ROGLANS et al., 2007) para caracterização da síndrome metabólica. Além disso, nos outros grupos experimentais para avaliação nos testes comportamentais vale ressaltar que os animais receberam a solução de frutose 10% por 8 semanas.

#### 4.2.2. Protocolo II: Diabetes Mellitus induzida por aloxana

Os ratos foram randomizados, divididos por grupos, tiveram livre acesso a água e ração comercial padrão. Na indução de diabetes, os animais foram pesados e permaneceram em jejum por 12 horas antes da administração por via intraperitoneal da aloxana (*Sigma*®). A aloxana foi dissolvida em solução de salina 0,9% (pH 4,5) e foi administrada uma dose de 150 mg/Kg de peso corporal do animal. Os outros grupos de animais receberam uma injeção por via intraperitoneal de veículo (solução de salina) com volume equivalente ao seu peso. As confirmações do diabetes nos ratos foram avaliadas no período 48 horas após a administração, sendo considerados diabéticos apenas aqueles que apresentarem glicemia igual ou superior a 200 mg/dL (ABUELGASSIM, 2013; BARAGOB et al., 2014).

#### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

##### **4.3.1 Delineamento experimental Protocolo I: Síndrome metabólica induzida por frutose**

Na primeira etapa experimental os animais foram divididos em dois grupos para caracterização da síndrome metabólica (n = 8 animais por grupo), o grupo controle foram os animais que não receberam frutose e o grupo tratamento foram os animais que receberam a solução de frutose 10% durante 5 semanas.

Na segunda etapa experimental os animais foram divididos em quatro grupos após 5 semanas recebendo ou não a solução de frutose 10%:

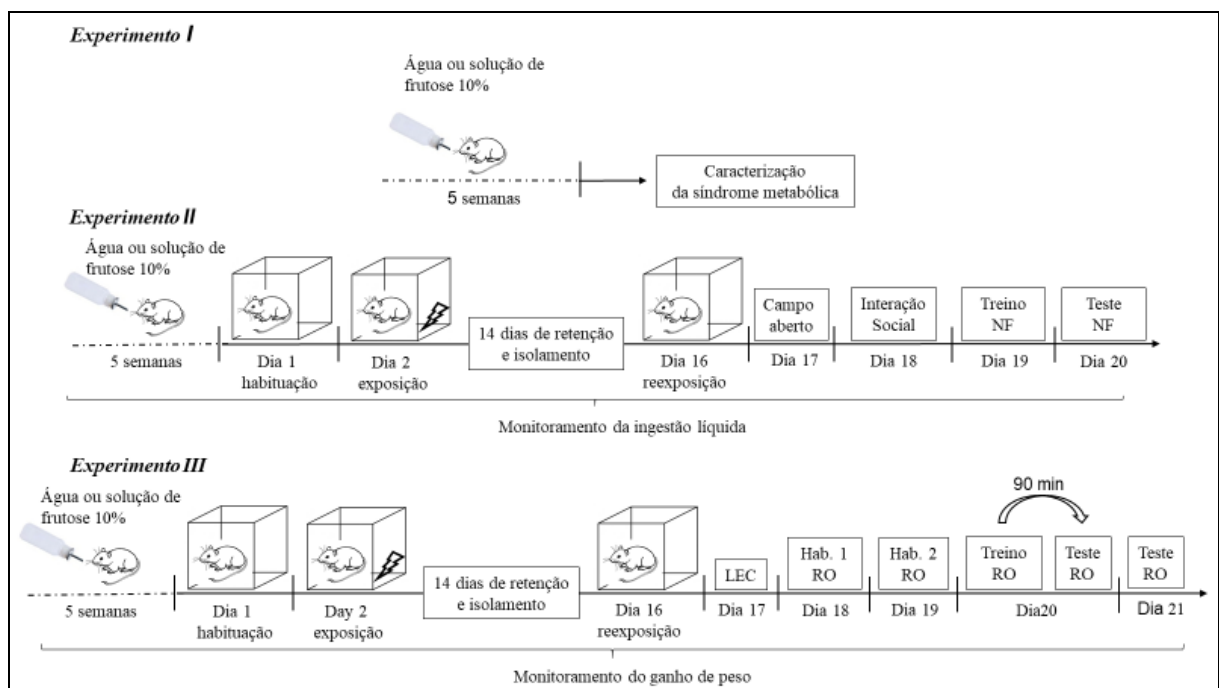
- 1) Grupo de animais que não receberam o choque e sem a síndrome metabólica (Controle Não Choque);
- 2) Grupos de animais que não receberam o choque e com a síndrome metabólica induzida por frutose (Síndrome Metabólica Não Choque);
- 3) Grupo de animais que receberam o choque e sem a síndrome metabólica (Controle Choque),
- 4) Grupo de animais que receberam o choque e com a síndrome metabólica induzida por frutose (Síndrome Metabólica Choque);

Após 5 semanas os animais foram habituados no aparato de choque, no dia seguinte os animais receberam ou não o choque, permaneceram 14 dias de retenção e isolamento (Berardi et al., 2014) e foram avaliados nos seguintes testes comportamentais:

- a) 1º conjunto de animais (n = 10 por grupo): avaliação do congelamento, teste no aparato de campo aberto, interação social e nado forçado;
- b) 2º conjunto de animais (n = 10 por grupo): avaliação do congelamento, labirinto em cruz elevado e reconhecimento de objetos.

Após o último teste, esses animais foram decapitados e as estruturas encefálicas, hipocampo e córtex pré-frontal, foram coletadas e estão sendo utilizadas para quantificação de proteínas pela técnica de Western Blotting (Figura7).

Figura 6 - Delineamento experimental do Protocolo I



Fonte: DA AUTORA.

Nota: Representação Esquemática dos experimentos (I, II e III) do protocolo I. NF = Nado Forçado, LEC= labirinto em cruz elevado, RO = Teste de reconhecimento de objetos.

#### 4.3.2 Delineamento experimental do Protocolo II: Diabetes Mellitus induzida por aloxana

Após 48 horas a aplicação da aloxana ou salina os animais foram divididos em quatro grupos:

- 1) Grupo de animais que não receberam o choque e sem a diabetes (Controle Não Choque);
- 2) Grupo de animais que não receberam o choque com a diabetes induzida por aloxana (Diabetes Não choque);

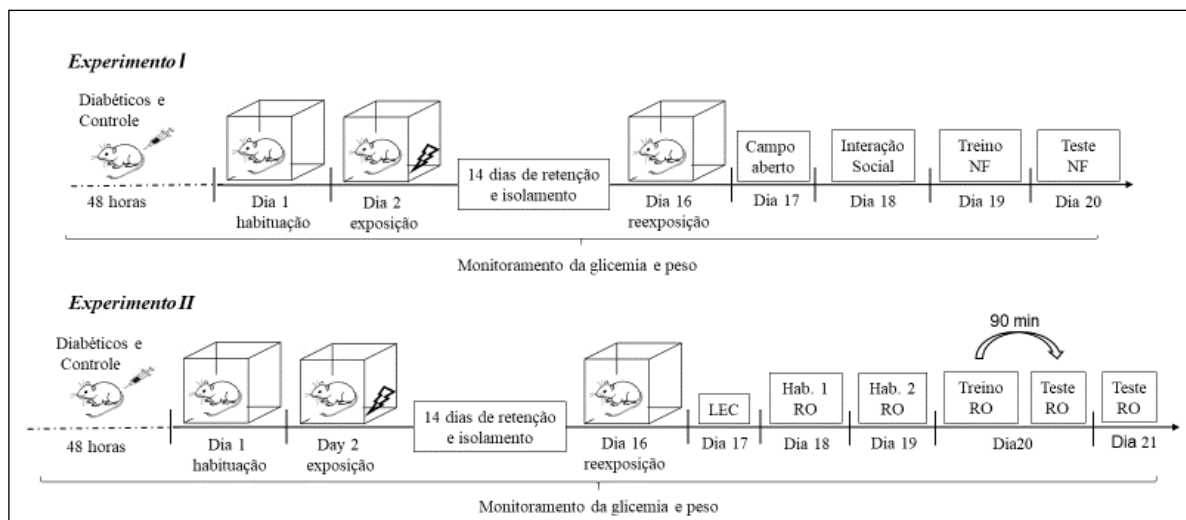
- 3) Grupo de animais que receberam o choque sem a diabetes (Controle Choque),
- 4) Grupo de animais que receberam o choque com a diabetes induzida por aloxana (Diabetes Choque);

Após a detecção da diabetes os animais foram habituados no aparato de choque, no dia seguinte os animais receberam ou não o choque, permaneceram 14 dias de retenção e isolamento (Berardi et al., 2014) e foram avaliados nos seguintes testes comportamentais:

- a) 1º conjunto de animais (n = 8 por grupo): avaliação do congelamento, teste no aparato de campo aberto, interação social e nado forçado;
- b) 2º conjunto de animais (n = 8 por grupo): avaliação do congelamento, labirinto em cruz elevado e reconhecimento de objetos.

Após o último teste, esses animais permaneceram em jejum por 12 horas, depois foram decapitados e o sangue foi coletado para comprovação da diabetes pela dosagem bioquímica pelo kit de glicemia (In vitro). As estruturas encefálicas (córtex pré-frontal e hipocampo) foram coletadas e estão sendo utilizadas para quantificação de proteínas pela técnica de Western Blotting (Figura 8).

Figura 7 - Delineamento experimental do Protocolo II



Fonte: DA AUTORA.

Nota: Representação Esquemática dos experimentos (I e II) do protocolo II. NF = Nado Forçado, LEC= labirinto em cruz elevado, RO = Teste de reconhecimento de objetos.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DA SÍNDROME METABÓLICA

A caracterização da síndrome metabólica dos animais do protocolo I foram com base na avaliação: do peso corpóreo, índice de Lee, quantificação da adiposidade abdominal,

avaliação do perfil bioquímico (glicose, triglicérides, colesterol total, HDL, LDL e VLDL) e dosagens hormonais para (leptina). Sangue, órgãos e estruturas dos animais foram coletados seguindo todos os procedimentos experimentais abaixo.

#### **4.4.1 Ganho de peso corpóreo e Índice de Lee**

Os animais foram pesados semanalmente, do início do experimento e até o final dos testes comportamentais, para determinação do peso corporal total inicial e final. O peso e o comprimento nasoanal (CNA) dos animais foram registrados no final do experimento para o cálculo do índice de Lee, que é a relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nasoanal do animal [ $3\sqrt{\text{Peso (g)}/\text{CNA(cm)}}$ ] (DE MOURA et al., 2009).

#### **4.4.2 Quantificação da adiposidade abdominal**

A quantificação da adiposidade abdominal foi realizada nos animais, por meio de dissecação dos depósitos de gordura epididimal e retroperitoneal imediatamente pesadas. O resultado foi expresso em g/100g de peso corporal (FERNANDEZ et al., 2009; HIGA et al., 2014).

#### **4.4.3 Dosagens bioquímicas**

Após jejum prévio de 12 horas (HOU et al.; 2011), os animais foram decapitados, o sangue foi coletado do tronco encefálico (0,5-1 mL) em tubos plásticos contendo heparina e mantidos sob gelo. O plasma foi separado por centrifugação (3500 rpm, 4°C, 15 min.) e as alíquotas mantidas a - 80°C até o momento das dosagens bioquímicas. Com essas amostras foram realizadas as análises de glicose, triglicérides, colesterol total, HDL através de kits Invitro® e por fórmulas VLDL e LDL indicadas no Kit.

#### **4.4.4 Dosagem hormonal de leptina**

Após o jejum prévio de 12 horas, um grupo de animais foram decapitados, o sangue coletado do tronco (0,5 -1 mL) em tubos plásticos contendo heparina e mantidos sob gelo. O plasma foi separado por centrifugação (3500 rpm, 4°C, 15 min.) e as alíquotas mantidas a -

80°C até o momento das dosagens hormonais, que foram realizadas em um único ensaio. Com essas amostras foram realizadas análises dos hormônios leptina que foram quantificados pelo método de teste imunoenzimático ELISA (Enzo *Life Sciences*®). A leptina total será medida com uma sensibilidade do ensaio de 0,5 ng/ml e uma variação intra-ensaios de 7,1% (RODRIGUES et al., 2011).

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DA DIABETES MELLITUS

A caracterização da diabetes dos animais do protocolo II foi com base na avaliação: do peso corpóreo e avaliação do perfil bioquímico (glicose) (ABUELGASSIM, 2013; BARAGOB et al., 2014).

##### 4.5.1 Peso corpóreo

Os animais foram pesados 48 horas, 14 dias e 21 dias após a aplicação da injeção intraperitoneal para determinação do peso corporal (ABUELGASSIM, 2013; BARAGOB et al., 2014).

##### 4.5.2 Avaliação da Glicemia pelo Kit Glicosímetro

Na avaliação da glicemia durante o tratamento, foram coletadas 3 amostras de sangue obtidas da ponta da cauda dos animais (após a aplicação da aloxana via intraperitoneal, antes dos testes comportamentais e após os testes comportamentais). Esse sangue foi colocado em glicofitas da marca Accu-Chek® e a leitura foi realizado de imediato por meio do glicosímetro Accu-Chek® para determinação da glicose sanguínea (ABUELGASSIM, 2013; BARAGOB et al., 2014).

##### 4.5.3 Dosagem bioquímica de glicemia

As dosagens bioquímicas de glicemia neste protocolo experimental II foram realizadas de acordo com o mesmo procedimento experimental descrito anteriormente na caracterização da síndrome metabólica do protocolo I (HOU et al.; 2011; ABUELGASSIM, 2013; BARAGOB et al., 2014).

#### 4.6 EXPOSIÇÃO AO CHOQUE E INDUÇÃO DO TEPT

Para indução do estresse pós-traumático, foi seguido o protocolo de Berardi et al. (2014). Após o tratamento, de acordo com cada protocolo citado acima, os animais foram colocados individualmente na caixa de choque por 5 minutos um dia antes do teste, para habituação. No dia seguinte os animais que receberam choque foram colocados na caixa indutora por 6 minutos, nos primeiros dois minutos os animais não receberam choque, durante os três minutos intermediários, os animais receberam cinco choques aleatórios de 0,8 mA e 2 segundos de duração e no último minuto os animais não receberam choque. Os animais não expostos ao choque permaneceram 6 minutos na caixa indutora e não receberam choque. Ao final do processo experimental os animais foram isolados em caixas individuais. E para confirmar a indução do estresse pós-traumático, os animais permaneceram nas caixas isoladas e após 14 dias foram avaliados quanto ao tempo em que permaneceram no comportamento de congelamento dentro da caixa de indução, sendo reexpostos a mesma situação traumática, por 10 minutos. Vale ressaltar que os grupos dos animais do protocolo I receberam a solução de frutose até o final das avaliações comportamentais. E o grupo dos animais tratados com aloxana somente foram expostos ao choque, assim que foram detectados se realmente estavam com diabetes (glicemia > 200 mg/dl).

#### 4.7 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

##### 4.7.1 Campo aberto

O campo aberto, além de ser um modelo preditivo de parâmetros de ansiedade, é um teste útil para análise da atividade locomotora do animal, pois permite a quantificar a atividade motora espontânea (VILELA, 2009). A atividade locomotora foi avaliada no aparato do campo aberto que consiste em uma caixa quadrada de acrílico (60 cm x 60 cm x 60 cm), onde os ratos foram colocados no centro da arena e filmados por cinco minutos. Após cada teste, o campo aberto foi limpo com álcool 5%. A análise foi realizada utilizando o programa *EthoVision XT 9.0*, que é um sistema de observação computadorizado que é capaz de realizar rastreamento, análise e reconhecimento comportamental por meio de vídeos, em que foram avaliados o tempo de imobilidade e a distância percorrida no aparato durante os cinco minutos

(NOLDUS; SPINK; TEGELENBOSCH, 2001). Esse teste foi realizado um dia após a reexposição ao comportamento de congelamento em todos grupos experimentais.

#### **4.7.2 Teste de Interação Social**

O teste de interação social consistiu no confronto entre dois animais do mesmo grupo de tratamento. Para tanto os animais foram colocados na arena de campo aberto e a interação entre eles foram registradas por uma câmera filmadora, durante 10 minutos. Para evitar que o comportamento exploratório atrapalhe a exibição do comportamento de interação social, os animais foram ambientados à arena do campo aberto 1 dia anterior ao teste, por um período de 10 minutos.

Os parâmetros analisados foram: seguir e cheirar e não interação. Os vídeos foram analisados e o tempo total de interação entre os animais foram contabilizados (DER-AVAKIAN; MARKOU, 2014). Esse teste foi realizado 24 horas após o campo aberto em todos os grupos experimentais.

#### **4.7.3 Nado Forçado**

O teste do nado forçado é um modelo preditivo de parâmetros tipo depressivo, desenvolvido de acordo com o método descrito por Porsolt e colaboradores (1978). Utiliza-se um cilindro de acrílico, com dimensões de 24 cm de diâmetro e 60 cm de altura, preenchido com água à  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  até a altura de 40 cm. O volume de água permite que o animal nada ou boie (*float*) sem encostar as patas ou a cauda no fundo do recipiente. Um dia antes do teste os animais foram ambientados por 15 minutos, após a sessão de natação eles foram secos com toalhas. No dia do teste (24 horas após a ambientação), os ratos foram colocados no cilindro por 5 minutos e foi avaliado o tempo de imobilidade cronometrado durante a respectiva sessão. A análise foi realizada através da observação dos vídeos obtidos por filmagem dos cinco minutos do dia teste (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2005; KIRKEDAL et al., 2017).

#### **4.7.4 Labirinto em Cruz Elevado**

O labirinto em cruz elevado é um aparato que possui dois braços abertos e dois braços fechados, sendo ligados por uma plataforma central. Os animais foram colocados no centro do aparato, de frente para um dos braços fechados. O comportamento do animal foi filmado



durante 5 minutos e foi avaliado o tempo gasto nos braços abertos e fechados. Tal teste foi realizado após reexposição ao comportamento de congelamento em outro conjunto de animais e em todos grupos experimentais. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5% (BISON et al., 2009).

#### 4.7.5 Teste de reconhecimento de objeto

O teste de reconhecimento de objetos foi avaliado utilizando-se o mesmo aparato do teste de Campo Aberto. No dia anterior ao teste os animais passaram por sessão de habituação à arena, por 10 minutos. No dia do teste foram apresentados ao animal 2 objetos de formas idênticas (A e B), aguardando-se a exploração dos mesmos, por 10 minutos. A memória de curta duração (MCD) foi verificada após 1 hora e 30 minutos, quando se apresentou ao animal um dos objetos do treino (A) e um novo objeto, de forma diferente (C). A memória de longa duração (MLD) foi verificada 24 horas após, quando se apresentou ao animal um dos objetos do treino (A) e outro novo objeto, de forma diferente (D). Os animais foram filmados durante 10 minutos para análise posterior. Foi considerado como parâmetro de avaliação o índice de reconhecimento (IR), calculado de acordo com a equação  $IR = \frac{\text{Tempo de Exploração do Objeto C}}{\text{Tempo de Exploração do Objeto A} + \text{Tempo de Exploração do Objeto C}}$  para MCD e  $IR = \frac{\text{Tempo de Exploração do objeto D}}{\text{Tempo de Exploração do objeto A} + \text{Tempo de Exploração do objeto D}}$  para MLD (HABA et al., 2012; SIOPI et al., 2012).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE GFAP E IBA-1 POR WESTERN BLOTTING

Um grupo de animais, após os testes comportamentais, foram utilizados para a análise da expressão de GFAP e Iba-1 por *Western Blotting*. Para isso, os animais foram decapitados e imediatamente depois o hipocampo e córtex pré-frontal foram dissecados e armazenado em -80°C até o momento da realização do teste de Bradford. No teste de Bradford as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise com um coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Em seguida as amostras foram centrifugadas (9200 rpm, 15 minutos, 4°C) e a concentração de proteínas no sobrenadante foi quantificada pelo teste de Bradford.

Após quantificadas e padronizadas as proteínas, foi adicionado nas amostras tampão de lise juntamente com *Laemmli*, depois essas amostras foram fervidas e submetidas a análise

de *Western blotting*. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 12% (electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) e em seguida transferidas para membranas de nitrocelulose com um sistema electroforético semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA). A membrana foi lavada 3 vezes em PBS contendo 0,05% de Tween 20, bloqueada com 5% de leite desnatado em PBS durante 2 h à temperatura ambiente e depois incubadas *overnight*, a 4°C com um anticorpo anti-GFAP (1:1000, Santa Cruz-sc 33673) ou anti-Iba-1 (1:1000, WAKO). No dia seguinte, após 3 lavagens em PBS contendo 0,05% de Tween 20, as membranas foram incubadas em temperatura ambiente durante 2 horas com anticorpo secundário específico para GFAP ou Iba-1. Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05% e depois aplicou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA) e as intensidades de banda foram quantificadas utilizando um software específico da BioRad. A intensidade de cada banda foi expressa em relação à da  $\beta$ -actina e os dados foram expressos normalizados para o controle. Posteriormente, as membranas passaram pelo processo de *stripping* seguido do bloqueio em 5% de leite desnatado em PBS durante 2 h. Após o bloqueio as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 seguidas da incubação *overnight*, a 4 ° C com anticorpo anti-actina (1:5000, sigma aldrich 4700). No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, e as membranas foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário (1:2000, Abcam-ab 6789). Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo Tween 20 a 0,05%, em seguida aplicou-se um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA) e as intensidades de banda foram quantificadas utilizando um software específico da Bio-Rad.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graph Pad Prism versão 7.0 e os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os resultados foram analisados pelo Teste t Student para comparação de 2 grupos ou Two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparação de 2 fatores. Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados em que  $p < 0.05$ .

## 6 RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados do presente trabalho:

### 6.1 PROTOCOLO I: SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR FRUTOSE

A seguir serão apresentados os resultados do Protocolo I:

#### 6.1.1 Caracterização da síndrome metabólica

A tabela 1 demonstra os resultados dos parâmetros analisados para a caracterização da síndrome metabólica após o tratamento de 5 semanas com a solução de frutose 10% na água ou água normal (controle) dos grupos controle e frutose.

A análise através do teste *t Student* demonstrou que os animais do grupo frutose apresentaram um aumento no tecido adiposo epididimal ( $p < 0,001$ ); tecido adiposo retroperitoneal ( $p < 0,001$ ); ganho de peso ( $p < 0,05$ ); índice de Lee ( $p < 0,001$ ); dosagens bioquímicas: glicose ( $p < 0,001$ ), triglicerídeos ( $p < 0,001$ ), colesterol total ( $p < 0,01$ ), HDL ( $p < 0,05$ ), VLDL ( $p < 0,01$ ) e LDL ( $p < 0,001$ ) e dosagem hormonal: leptina ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao controle.

Tabela 1 - Tecido adiposo, dosagens bioquímicas e hormonal dos ratos pré- tratados com 10 % frutose na água ou água normal (controle) por 5 semanas (n = 10 por grupo)

<i>Parâmetros</i>	<i>Grupo Controle</i>	<i>Grupo Frutose</i>
<i>Tecido adiposo (g/100 g)</i>		
Epididimal	0.65 ± 0.02	1.04 ± 0.02***
Retroperitoneal	0.82 ± 0.03	1.54 ± 0.09***
Ganho de peso (g)	174.90 ± 2.65	181.90 ± 5.83*
Índice de Lee	32.11 ± 0.18	34.79 ± 0.37***
<i>Dosagens Bioquímicas</i>		
Glicose (mg/dL)	99.52 ± 2.53	132.10 ± 2.74***
Triglicérides (mg/dL)	88.78 ± 5.26	176.50 ± 11.92***
Colesterol total (mg/dL)	71.63 ± 1.62	127.70 ± 15.25**
HDL (mg/dL)	16.11 ± 2.01	21.42 ± 1.13*
VLDL (mg/dL)	24.91 ± 0.99	31.24 ± 1.60**
LDL (mg/dL)	40.96 ± 16.00	56.27 ± 3.52***
<i>Dosagens Hormonais</i>		
Leptina (ng/dl)	7.25 ± 0.47	9.06 ± 0.60*

Fonte: DA AUTORA.

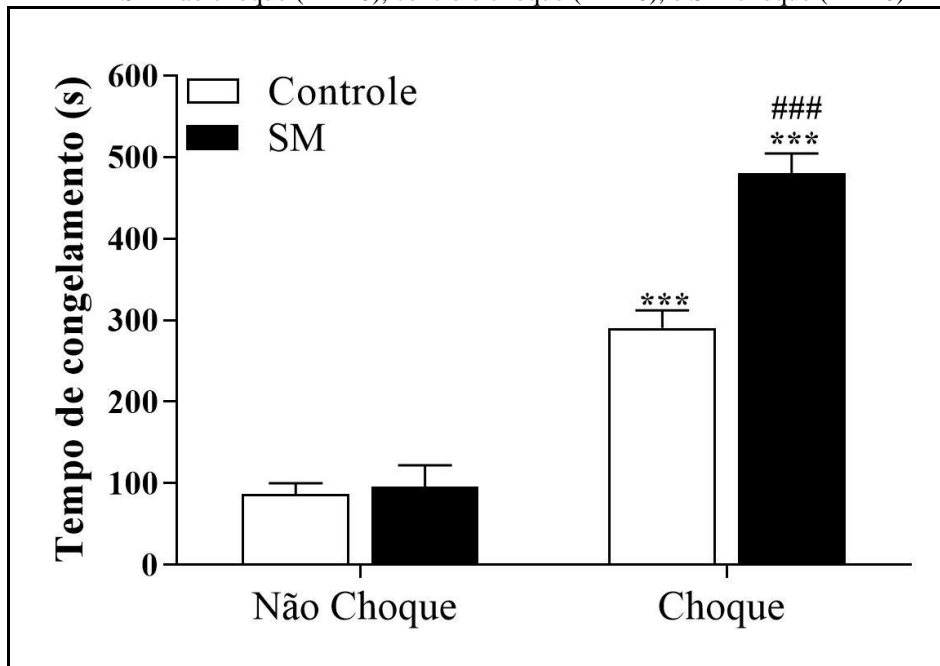
Legenda: Valores ± SEM (Teste T Student). \*p < 0,05, \*\*p < 0.01 e \*\*\*p < 0.001 comparado com controle.

### 6.1.2 Avaliação do comportamento de congelamento

A figura 8 mostra a avaliação do comportamento de congelamento dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 8, pode-se observar que houve um aumento no tempo de congelamento dos grupos controle choque (p < 0,001) e SM choque (p < 0,001) quando comparados aos seus respectivos controles (controle não choque e SM não choque). Além disso, esse aumento foi mais acentuado no grupo SM choque (p < 0,001) quando comparado ao grupo controle choque (fator tratamento:  $F_{1,36} = 20,44$ , p < 0,001; fator choque:  $F_{1, 36} = 177,60$ , p < 0,001; interação entre os dois fatores:  $F_{1, 36} = 16,66$  e p < 0,001).

Figura 8 - Tempo de Congelamento (s) dos grupos controle não choque (n = 10)  
SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10), e SM choque (n = 10)



Fonte: DA AUTORA.

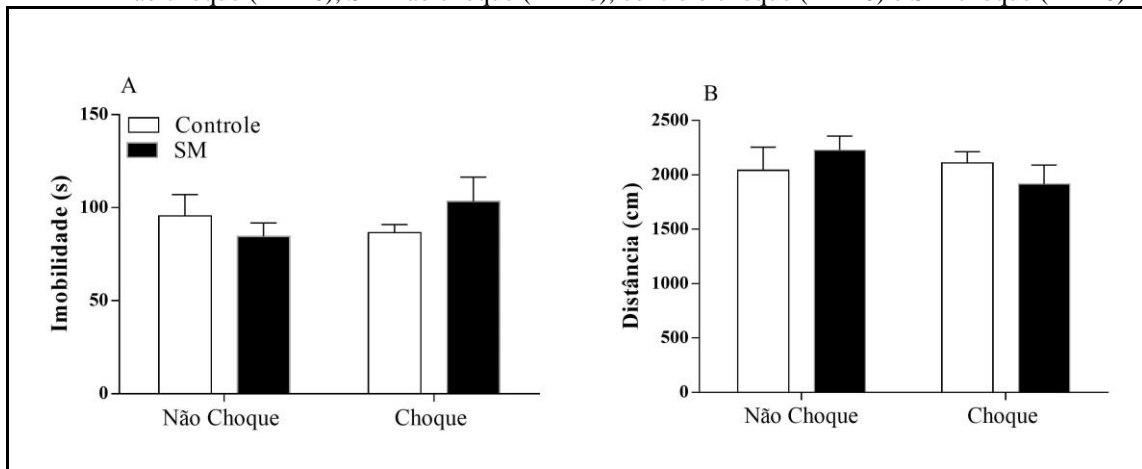
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\*\*p < 0,001 quando comparado ao grupo controle e SM não choque, respectivamente e ###p < 0,001 quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste Bonferroni).

### 6.1.3 Avaliação do teste de campo aberto

A figura 9 mostra a avaliação do teste de campo aberto dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 9, pode-se observar que não houve diferença no tempo de imobilidade, como demonstrado no Gráfico A (no fator tratamento:  $F_{1,36} = 0,09$  e  $p = 0,75$ ; fator choque:  $F_{1,36} = 0,26$  e  $p = 0,61$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,36} = 2,12$  e  $p = 0,15$ ), e na distância percorrida, como demonstrado no gráfico B (fator tratamento:  $F_{1,36} = 0,0007$   $p = 0,97$ ; fator choque:  $F_{1,36} = 0,58$  e  $p = 0,44$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,36} = 1,39$  e  $p = 0,24$ ), entre grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

Figura 9 - Tempo de imobilidade (s) - Gráfico A e distância em (cm) - Gráfico B dos grupos controle não choque (n = 10), SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10)



Fonte: DA AUTORA.

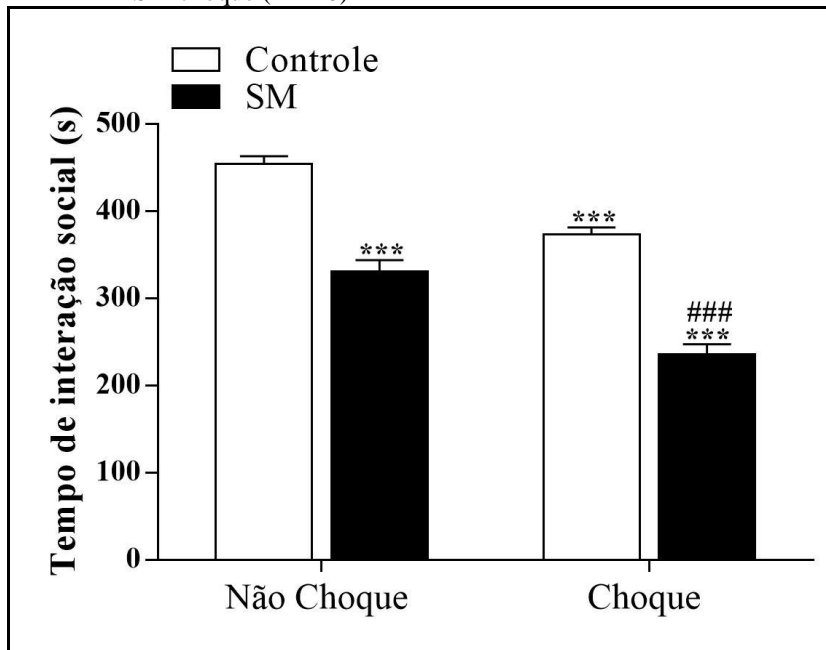
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM (ANOVA *Two-Way* seguido do pós- teste *Bonferroni*).

#### 6.1.4 Avaliação no teste de interação social

A figura 10 mostra a avaliação do teste de interação social dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 10, pode-se observar que houve redução da interação social dos grupos SM não choque ( $p < 0,001$ ), controle choque ( $p < 0,001$ ) e SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao controle não choque. Além disso, a redução do grupo SM choque ( $p < 0,001$ ) foi ainda mais acentuada quando comparado ao controle choque (fator tratamento:  $F_{1, 36} = 144,7$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1, 36} = 65,87$   $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores: FT x FC:  $F_{1,36} = 0,40$  e  $p = 0,53$ ).

Figura 10 - Tempo de interação social (s) dos grupos controle não choque (n = 10), SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10)



Fonte: DA AUTORA.

Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle não choque e ###  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste *Bonferroni*).

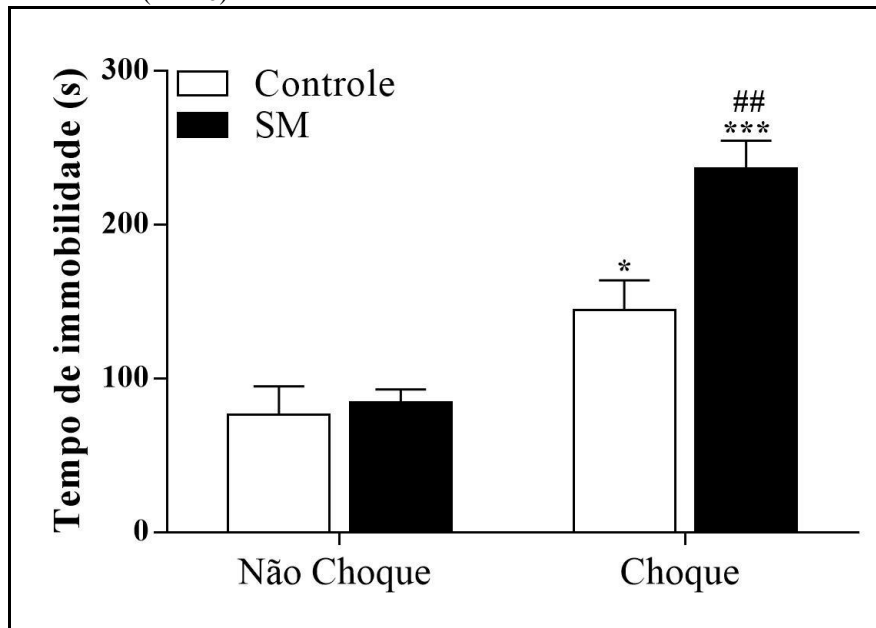
### 6.1.5 Avaliação no teste do nado forçado

A figura 11 mostra a avaliação no teste do nado forçado dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 11, pode-se observar que houve aumento do tempo de imobilidade dos grupos controle choque ( $p < 0,05$ ) e SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com os seus respectivos controles (controle e SM não choque). Além disso, esse aumento foi mais acentuado no grupo SM choque ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo controle choque (fator tratamento:  $F_{1,36} = 9,06$  e  $p < 0,01$ ; fator choque:  $F_{1,36} = 43,97$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,36} = 6,42$  e  $p < 0,05$ ).



Figura 11 - Tempo de imobilidade (s) dos grupos controle não choque (n = 10) SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10)



Fonte: DA AUTORA.

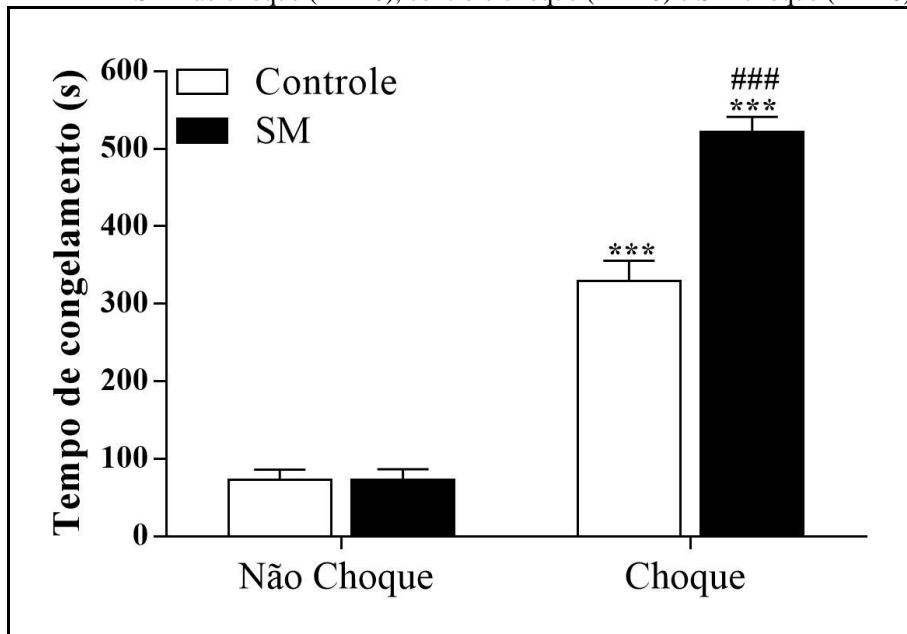
Legenda: Valores expressos como média ± SEM \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle e SM não choque, respectivamente e ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA Two - Way seguido do pós-teste *Bonferroni*).

### 6.1.6 Avaliação do comportamento de congelamento

A figura 12 mostra a avaliação do comportamento de congelamento dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 12, pode-se observar que houve um aumento no tempo de congelamento dos grupos controle choque ( $p < 0,001$ ) e SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados aos seus respectivos controles (controle não choque e SM não choque). Além disso, esse aumento foi mais acentuado no grupo SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle choque (fator tratamento:  $F_{1,36} = 26,37$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,36} = 357,3$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,36} = 26,59$  e  $p < 0,001$ ).

Figura 12 - Tempo de Congelamento (s) dos grupos controle não choque (n = 10)  
SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10)



Fonte: DA AUTORA.

Legenda: Valores expressos como média ± SEM \*\*\*p < 0,001 quando comparado ao grupo controle e SM não choque, respectivamente e ###p < 0,001 quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste Bonferroni).

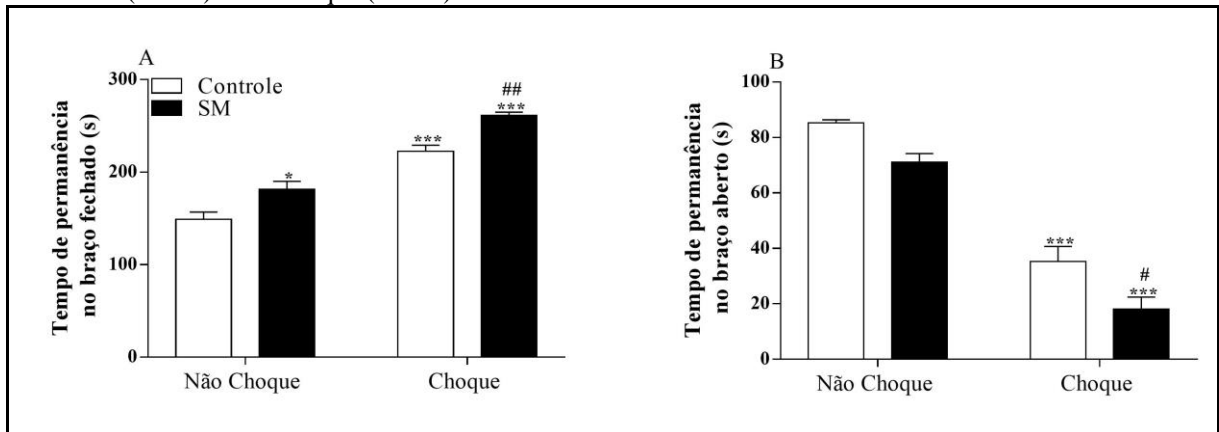
### 6.1.7 Avaliação no teste de labirinto em cruz elevado

A figura 13 mostra a avaliação do teste de labirinto em cruz elevado dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 13, pode-se observar que houve um aumento no tempo de permanência nos braços fechados (Gráfico A) dos grupos SM não choque ( $p < 0,05$ ), controle choque ( $p < 0,001$ ) e SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparado com o grupo controle não choque (fator tratamento:  $F_{1, 36} = 25,1$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1, 36} = 117,7$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1, 36} = 0,19$  e  $p = 0,65$ ) e uma redução no tempo de permanência nos braços abertos (Gráfico B) dos grupos controle choque ( $p < 0,001$ ) e SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados aos seus respectivos controles, controle não choque e SM não choque, (fator tratamento:  $F_{1,36} = 16,39$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1, 36} = 174,10$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1, 36} = 0,14$  e  $p = 0,70$ ). Além disso, observa-se que houve um aumento mais acentuado no tempo de permanência nos braços fechados e uma redução mais acentuada no tempo de permanência nos braços abertos do grupo SM choque ( $p$

< 0,001 e  $p < 0,05$ , respectivamente gráficos A e B) quando comparado com o grupo controle choque.

Figura 13 - Tempo de permanência no braço fechado (s) - Gráfico A e tempo de permanência no braço aberto (s) Gráfico B dos grupos controle não choque (n = 10), SM não choque (n = 10), controle choque (n = 10) e SM choque (n = 10)



Fonte: DA AUTORA.

Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com controle não choque e ##  $p < 0,01$  quando comparado com o controle choque - gráfico A e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com controle e SM não choque, respectivamente e #  $p < 0,05$  quando comparado com controle choque - gráfico B (ANOVA Two-Way seguido do pós- teste Bonferroni).

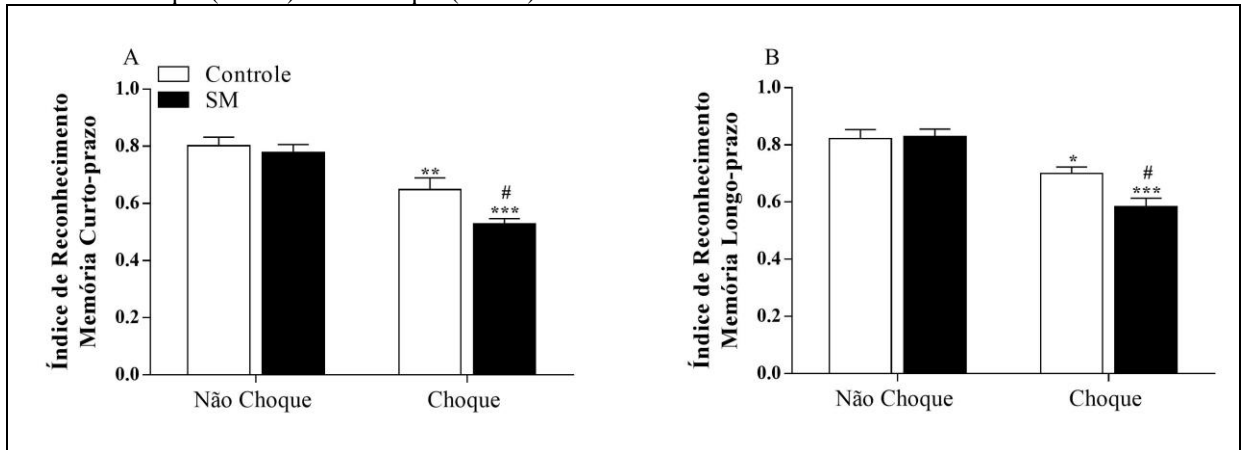
### 6.1.8 Avaliação no teste de reconhecimento de objetos

A figura 14 mostra a avaliação do teste de reconhecimentos de objetos na memória de curto-prazo (Gráfico A) e longo-prazo (Gráfico B) dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 14, pode-se observar que houve uma redução no índice de reconhecimento da memória curto-prazo (Gráfico A) nos grupos controle choque ( $p < 0,01$ ) e SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com os seus respectivos controles, controle não choque e SM não choque (fator tratamento:  $F_{1,36} = 5,62$  e  $p < 0,05$ ; fator choque:  $F_{1,36} = 44,52$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,36} = 2,53$  e  $p = 0,12$ ), além disso, foi observado que o SM choque ( $p < 0,05$ ) apresentou uma redução mais acentuada quando comparado com controle choque. Na figura 7, pode-se observar que houve uma redução no índice de reconhecimento da memória longo-prazo (Gráfico B) nos grupos controle choque ( $p < 0,05$ ) e SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com os seus respectivos controles, controle não choque e SM não choque (fator tratamento:  $F_{1,36} = 3,92$  e  $p = 0,055$ ; fator choque:  $F_{1,36} = 44,11$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,36} = 5,019$  e  $p < 0,05$ ), além disso, foi

observado que o SM choque ( $p < 0,05$ ) apresentou uma redução mais acentuada quando comparado com controle choque.

Figura 14 - Índice de Reconhecimento Memória Curto-prazo - Gráfico A e Índice de Reconhecimento Memória Longo-prazo - Gráfico B dos grupos controle não choque ( $n = 10$ ), SM não choque ( $n = 10$ ), controle choque ( $n = 10$ ) e SM choque ( $n = 10$ )



Fonte: DA AUTORA.

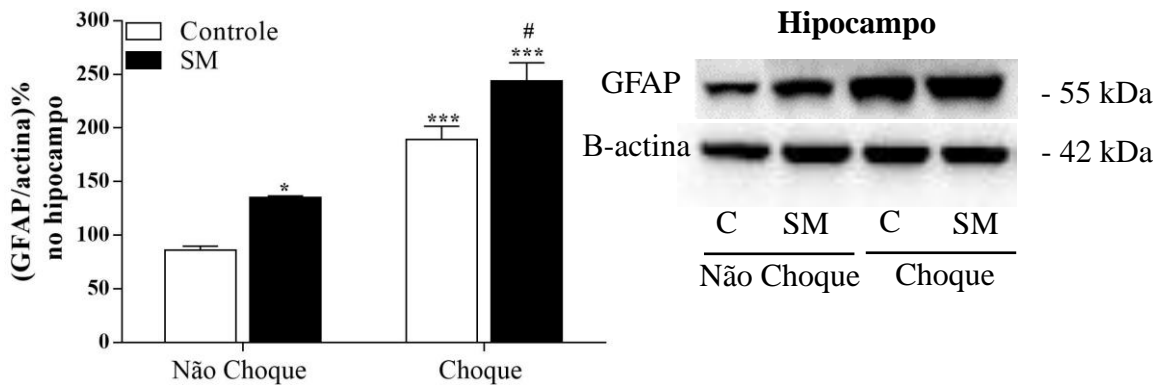
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com controle e SM não choque, respectivamente e #  $p < 0,05$  quando comparado com o controle choque - gráfico A e \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com controle e SM não choque, respectivamente e # $p < 0,05$  quando comparado controle choque - gráfico B (ANOVA *Two-Way* seguido do pós-teste Bonferroni).

### 6.1.9 Avaliação da expressão da proteína GFAP por *Western blotting* no Hipocampo

A figura 15 mostra a avaliação da porcentagem da expressão da proteína GFAP/actina no Hipocampo dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 15, pode-se observar que houve um aumento da % de GFAP/Actina no hipocampo dos grupos SM não choque ( $p < 0,05$ ), controle choque ( $p < 0,001$ ) e SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com o controle não choque, além disso, foi observado que o SM choque ( $p < 0,05$ ) apresentou um aumento mais acentuada quando comparado com controle choque (fator tratamento:  $F_{1,20} = 23,59$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,20} = 98,97$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,20} = 0,07$  e  $p = 0,78$ ).

Figura 15 - (GFAP/actina) % no hipocampo dos grupos controle não choque (n = 6), SM não choque (n = 6), controle choque (n = 6) e SM choque (n = 6)



Fonte: DA AUTORA.

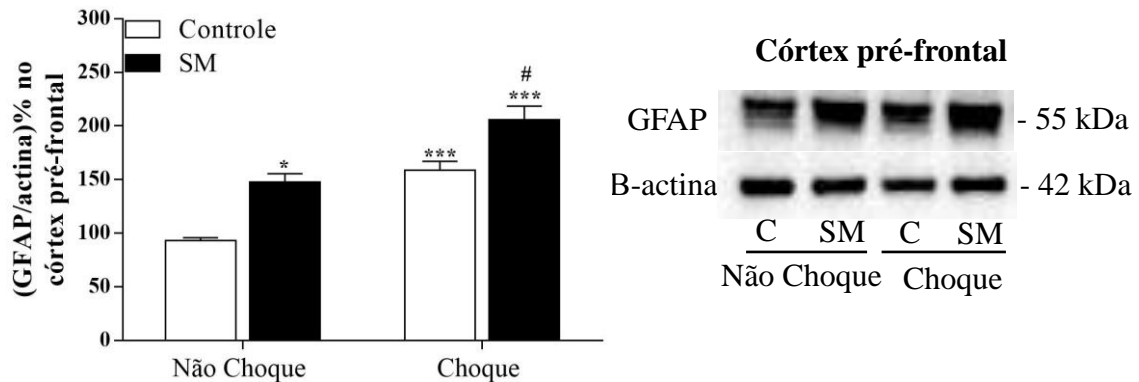
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle não choque, # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA *Two-Way* seguido do pós-teste *Bonferroni*).

### 6.1.10 Avaliação da expressão da proteína GFAP por *Western blotting* no Córtex pré-frontal

A figura 16 mostra a avaliação da porcentagem da expressão da proteína GFAP/actina no Córtex pré-frontal dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 16, pode-se observar que houve um aumento da % de GFAP/Actina no córtex dos grupo SM não choque ( $p < 0,05$ ), controle choque ( $p < 0,001$ ) e SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com o controle não choque, além disso, foi observado que o SM choque ( $p < 0,05$ ) apresentou um aumento mais acentuada quando comparado com controle choque (fator tratamento:  $F_{1,20} = 34,75$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,20} = 51,71$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,20} = 0,18$  e  $p = 0,67$ ).

Figura 16 - (GFAP/actina) % no córtex pré-frontal dos grupos controle não choque (n = 6), SM não choque (n = 6), controle choque (n = 6) e SM choque (n = 6)



Fonte: DA AUTORA.

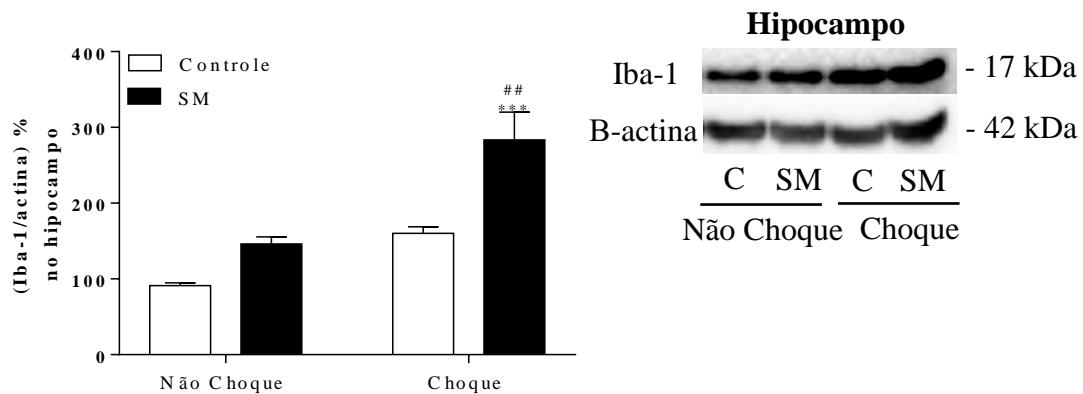
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle não choque, #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA *Two-Way* seguido do pós-teste *Bonferroni*).

### 6.1.11 Avaliação da expressão da proteína Iba-1 por *Western blotting* no Hipocampo

A figura 17 mostra a avaliação da porcentagem da expressão da proteína Iba-1/actina no Hipocampo dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 17, pode-se observar que houve um aumento da % de Iba-1/Actina no hipocampo dos grupos SM choque ( $p < 0,001$ ) quando comparado com o SM não choque, além disso, foi observado que o SM choque ( $p < 0,01$ ) apresentou um aumento mais acentuada quando comparado com controle choque (fator tratamento:  $F_{1,20} = 20,74$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,20} = 27,91$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,20} = 3,06$  e  $p = 0,0956$ ).

Figura 17 - (Iba-1/actina) % no hipocampo dos grupos controle não choque (n = 6), SM não choque (n = 6), controle choque (n = 6) e SM choque (n = 6)



Fonte: DA AUTORA.

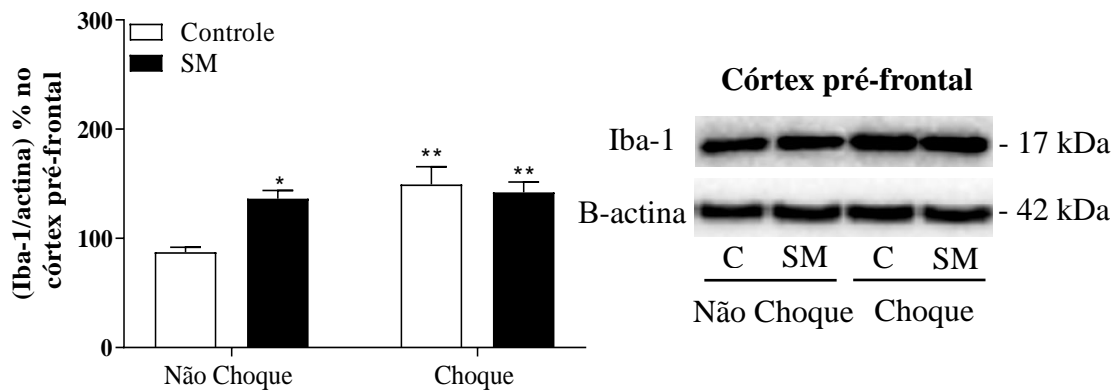
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo controle não choque, ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste Bonferroni).

### 6.1.12 Avaliação da expressão da proteína Iba-1 por *Western blotting* no Córtex pré-frontal

A figura 18 mostra a avaliação da porcentagem da expressão da proteína Iba-1/actina no Córtex pré-frontal dos grupos controle não choque, SM não choque, controle choque e SM choque.

De acordo com a figura 18, pode-se observar que houve um aumento da % de Iba-1/actina no córtex dos grupo SM não choque ( $p < 0,05$ ), controle choque ( $p < 0,01$ ) e SM choque ( $p < 0,01$ ) quando comparados com o controle não choque (fator tratamento:  $F_{1,20} = 4,109$  e  $p = 0,0562$ ; fator choque:  $F_{1,20} = 10,62$  e  $p < 0,01$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,20} = 7,312$  e  $p < 0,05$ ).

Figura 18 - (Iba-1/actina) % no Córtex pré-frontal dos grupos controle não choque (n = 6), SM não choque (n = 6), controle choque (n = 6) e SM choque (n = 6)



Fonte: DA AUTORA.

Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo controle não choque (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste Bonferroni).

## 6.2 PROTOCOLO II: DIABETES MELLITUS INDUZIDA POR ALOXANA

A seguir serão apresentados os resultados do Protocolo II:

### 6.2.1 Caracterização da Diabetes

A tabela 2 demonstra os resultados dos parâmetros analisados para a caracterização da diabetes peso(g), média da glicemia (mg/dl) coletada pelo kit de glicosímetro (mg/dl) e dosagem bioquímica de glicemia (mg/dl) dos grupos controle e aloxana.

A análise através do teste *t Student* demonstrou que os animais do grupo aloxana apresentaram uma redução na variação da perda de peso ( $p < 0,001$ ) e aumento da média da glicemia (mg/dl) ( $p < 0,001$ ) coletada pelo kit glicosímetro e da glicemia (mg/dl) ( $p < 0,001$ ) coletada pela dosagem bioquímica quando comparado ao controle.



Tabela 2 - Glicemia (mg/dl) e variação da perda peso (g) dos ratos pré-tratados ou não com aloxana na dose 150 mg/kg (n = 8 por grupo)

<i>Parâmetros</i>	<i>Controle</i>	<i>Aloxana</i>
<b>Kit Glicosímetro</b>		
- 1° Glicemia (mg/dl) – 48 horas após aplicação do aloxana	105 ± 6	499 ± 47***
- 2° Glicemia (mg/dl) – 14 dias após a indução do TEPT	110 ± 3	576 ± 15***
- 3° Glicemia (mg/dl) – 21 dias após a indução do TEPT	102 ± 4	580 ± 7***
<b>Dosagem Bioquímica</b>		
- Glicemia (mg/dl) - no final dos experimentos	73 ± 16	435 ± 48***
<b>Variação do peso (g)</b>	<b>307 ± 27</b>	<b>227 ± 26***</b>

Fonte: DA AUTORA.

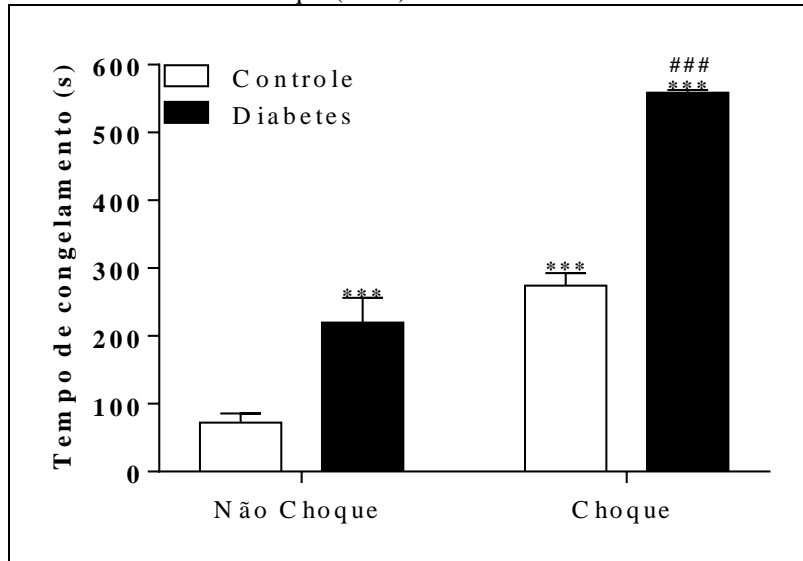
Legenda: Valores ± SEM (Teste T Student). \*\*\*p < 0,001 comparado com controle.

### 6.2.2 Avaliação do comportamento de congelamento

A figura 19 mostra a avaliação do comportamento de congelamento dos grupos controle não choque, diabetes não choque, controle choque e diabetes choque.

De acordo com a figura 19, pode-se observar que houve um aumento no tempo de congelamento dos grupos diabetes não choque ( $p < 0,001$ ), controle choque ( $p < 0,001$ ) e diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao controle não choque. Além disso, esse aumento foi mais acentuado no grupo diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle choque (fator tratamento:  $F_{1,28} = 98,17$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,28} = 153,9$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,28} = 9,88$  e  $p < 0,01$ ).

Figura 19 - Tempo de Congelamento (s) dos grupos controle não choque (n = 8), diabetes não choque (n = 8), controle choque (n = 8) e diabetes choque (n = 8)



Fonte: DA AUTORA.

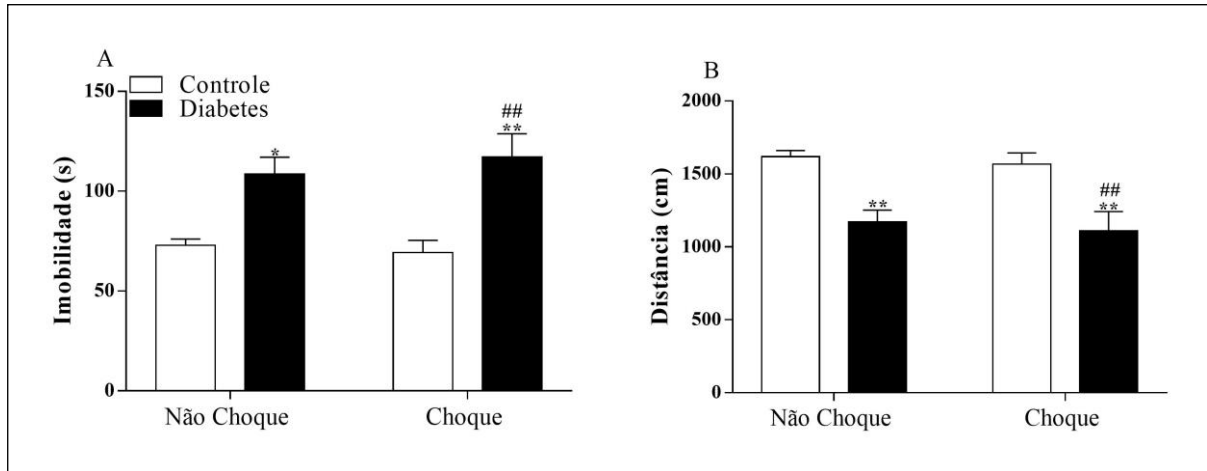
Legenda: Valores expressos como média ± SEM \*\*\*p < 0,001 quando comparado ao grupo controle não choque e ###p < 0,001 quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste Bonferroni).

### 6.2.3 Avaliação do teste de campo aberto

A figura 20 mostra a avaliação do teste de campo aberto dos grupos controle não choque, diabetes não choque, controle choque e diabetes choque.

De acordo com a figura 20, pode-se observar que houve um aumento no tempo de imobilidade (s), como demonstrado no gráfico A, dos grupos diabetes não choque ( $p < 0,05$ ) e diabetes choque ( $p < 0,01$ ) quando comparado com o controle não choque (fator tratamento:  $F_{1,28} = 27,25$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,28} = 0,09$  e  $p = 0,76$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,28} = 0,58$  e  $p = 0,45$ ) e uma redução da distância percorrida (cm), como demonstrado no gráfico B, dos grupos diabetes não choque ( $p < 0,05$ ) e diabetes choque ( $p < 0,01$ ) quando comparado com o controle não choque (fator tratamento:  $F_{1,28} = 26,1$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,28} = 0,42$  e  $p = 0,52$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,28} = 0,004$  e  $p = 0,94$ ).

Figura 20 - Tempo de imobilidade (s) - Gráfico A e distância em (cm) - Gráfico B dos grupos controle não choque (n = 8), diabetes não choque (n = 8), controle choque (n = 8) e diabetes choque (n = 8)



Fonte: DA AUTORA.

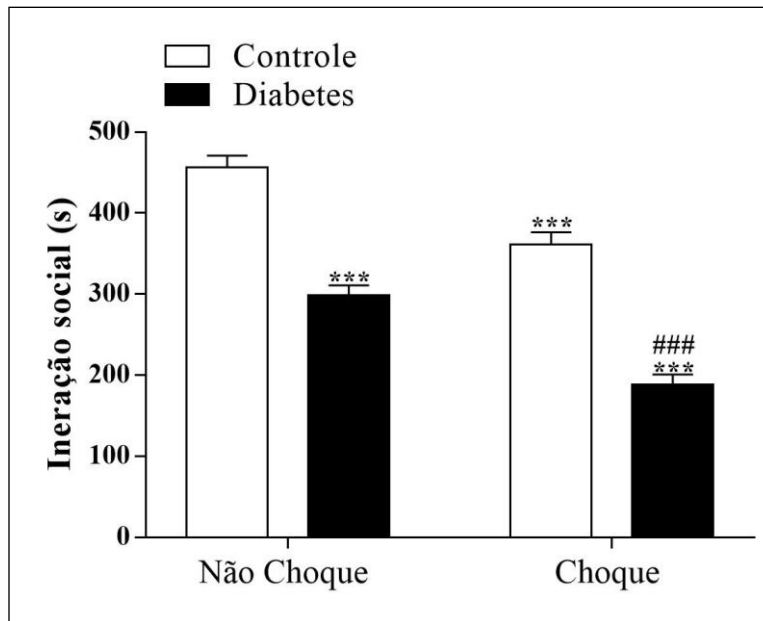
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle não choque e \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle choque – Gráfico A e ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle não choque e ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA *Two-Way* seguido do pós- teste *Bonferroni*).

#### 6.2.4 Avaliação no teste de interação social

A figura 21 mostra a avaliação do teste de interação social dos grupos controle não choque, diabetes não choque, controle choque e diabetes choque.

De acordo com a figura 21, pode-se observar que houve redução da interação social dos grupos diabetes não choque ( $p < 0,001$ ), controle choque ( $p < 0,001$ ) e diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao controle não choque. Além disso, a redução do grupo diabetes choque ( $p < 0,001$ ) foi ainda mais acentuada quando comparado ao controle choque (fator tratamento:  $F_{1, 28} = 146,7$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1, 28} = 56,5$   $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1, 28} = 0,26$  e  $p = 0,62$ ).

Figura 21 - Tempo de interação social (s) dos grupos controle não choque (n = 8), diabetes não choque (n = 8), controle choque (n = 8) e diabetes choque (n = 8)



Fonte: DA AUTORA.

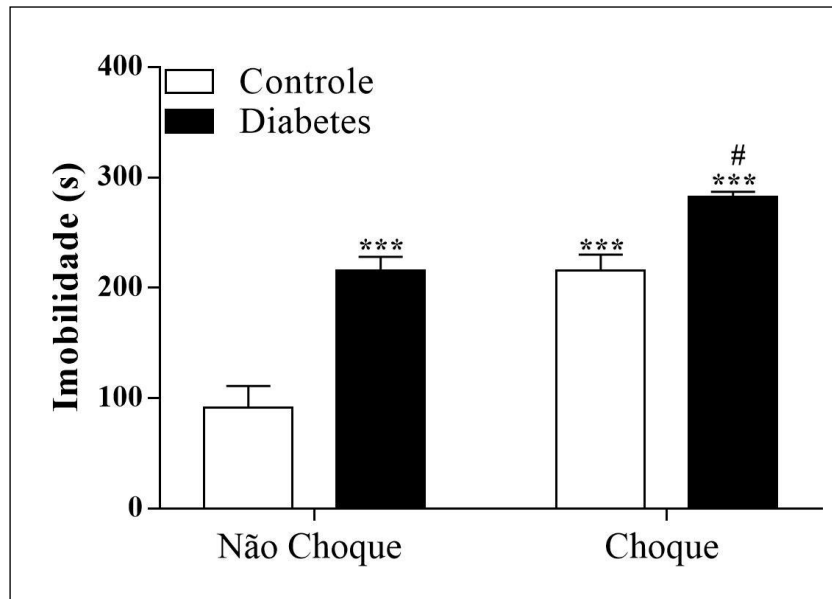
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle não choque e ### $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste *Bonferroni*).

### 6.2.5 Avaliação no teste do nado forçado

A figura 22 mostra a avaliação no teste do nado forçado dos grupos controle não choque, diabetes não choque, controle choque e diabetes choque.

De acordo com a figura 22, pode-se observar que houve aumento do tempo de imobilidade dos grupos diabetes não choque ( $p < 0,001$ ), controle choque ( $p < 0,001$ ) e diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com o controle não choque. Além disso, esse aumento foi mais acentuado no grupo diabetes choque ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle choque (fator tratamento:  $F_{1,28} = 47,65$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,28} = 43,53$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,28} = 4,345$  e  $p < 0,05$ ).

Figura 22 - Tempo de imobilidade (s) dos grupos controle não choque (n = 8), diabetes não choque (n = 8), controle choque (n = 8) e diabetes choque (n = 8)



Fonte: DA AUTORA.

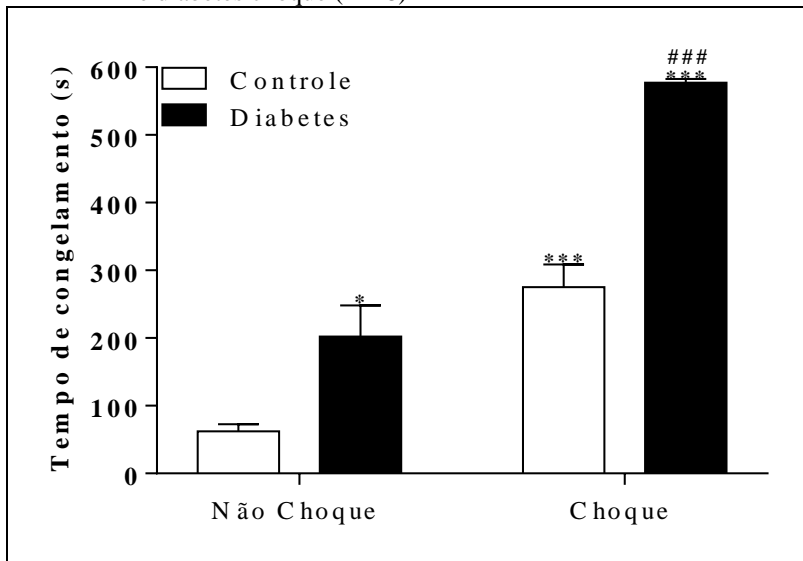
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle não choque, respectivamente e ## $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste Bonferroni).

### 6.2.6 Avaliação do comportamento de congelamento

A figura 23 mostra a avaliação do comportamento de congelamento dos grupos controle não choque, diabetes não choque, controle choque e diabetes choque.

De acordo com a figura 23, pode-se observar que houve um aumento no tempo de congelamento dos grupos diabetes não choque ( $p < 0,05$ ), controle choque ( $p < 0,001$ ) e diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao controle não choque. Além disso, esse aumento foi mais acentuado no grupo diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle choque (fator tratamento:  $F_{1,28} = 57,66$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,28} = 102,1$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,28} = 7,76$  e  $p < 0,01$ ).

Figura 23 - Tempo de Congelamento (s) dos grupos controle não choque (n = 8), diabetes não choque (n = 8), controle choque (n = 8) e diabetes choque (n = 8)



Fonte: DA AUTORA.

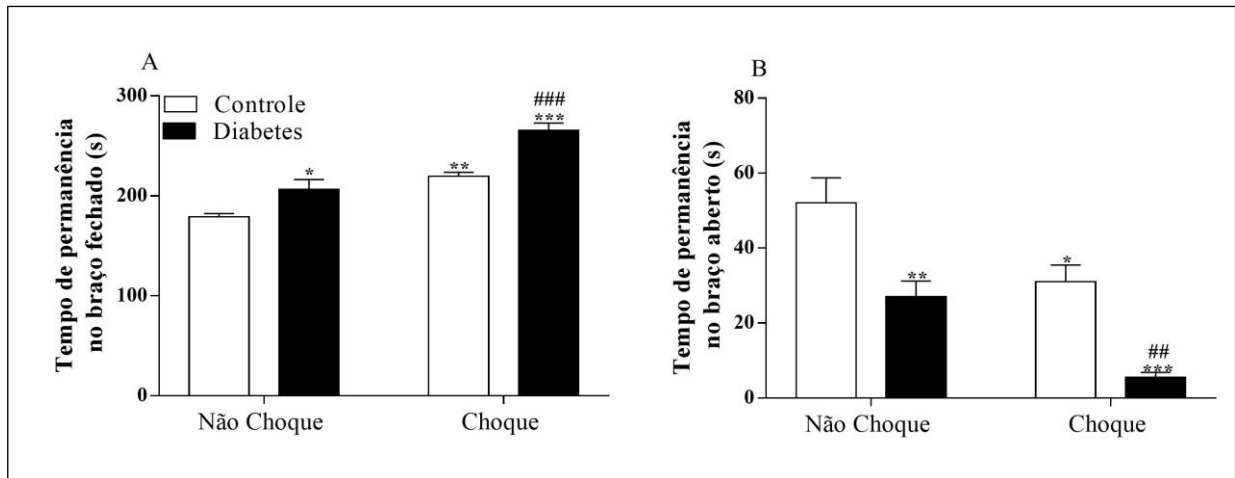
Legenda: Valores expressos como média ± SEM \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle não choque e ### $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle choque (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste Bonferroni).

### 6.2.7 Avaliação no teste de labirinto em cruz elevado

A figura 24 mostra a avaliação do teste de labirinto em cruz elevado dos grupos controle não choque, diabetes não choque, controle choque e diabetes choque.

De acordo com a figura 24, pode-se observar que houve um aumento no tempo de permanência nos braços fechados (Gráfico A) dos grupos diabetes não choque ( $p < 0,05$ ), controle choque ( $p < 0,01$ ) e diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com o grupo controle não choque (no fator tratamento:  $F_{1,28} = 30,14$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,28} = 55,56$  e  $p < 0,001$ ); interação entre os dois fatores:  $F_{1,28} = 1,94$  e  $p = 0,17$ ) e uma redução no tempo de permanência nos braços abertos (Gráfico B) dos grupos diabetes não choque ( $p < 0,01$ ), controle choque ( $p < 0,05$ ) e diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com o controle não choque (fator tratamento:  $F_{1,28} = 34,44$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,28} = 21,58$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,28} = 0,002$  e  $p = 0,97$ ). Além disso, observa-se que houve um aumento mais acentuado no tempo de permanência nos braços fechados e uma redução mais acentuada no tempo de permanência nos braços abertos do grupo diabetes choque ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente gráficos A e B) quando comparado com o grupo controle choque.

Figura 24 - Tempo de permanência no braço fechado (s) - Gráfico A e tempo de permanência no braço aberto (s) - Gráfico B dos grupos controle não choque (n = 8), diabetes não choque (n = 8), controle choque (n = 8) e diabetes choque (n = 8)



Fonte: DA AUTORA.

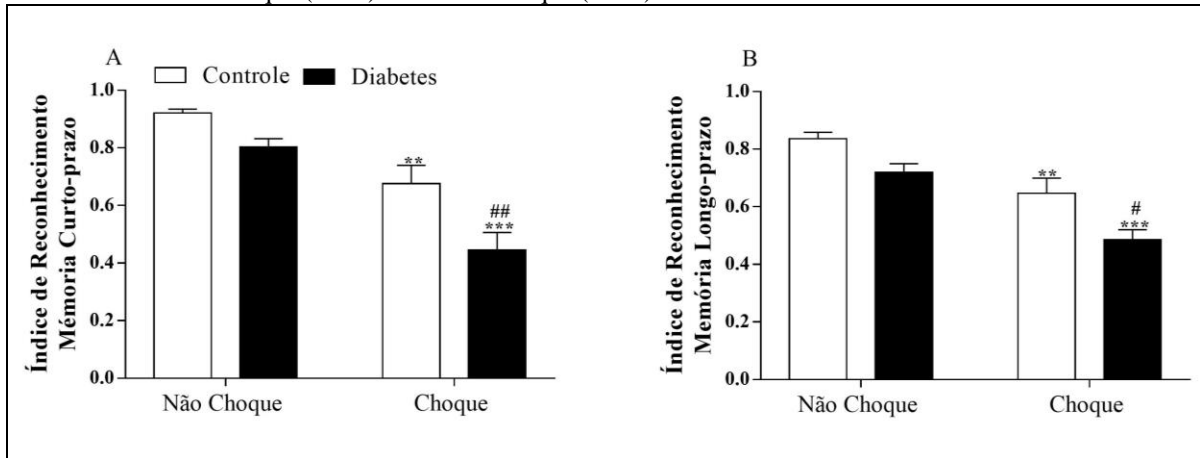
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com controle não choque e ### $p < 0,001$  quando comparado com o controle choque - gráfico A e \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com controle não choque ## $p < 0,01$  quando comparado com controle choque – gráfico B (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste Bonferroni).

### 6.2.8 Avaliação no teste de reconhecimento de objetos

A figura 25 mostra a avaliação do teste de reconhecimentos de objetos na memória de curto-prazo (Gráfico A) e longo-prazo (Gráfico B) dos grupos controle não choque, diabetes não choque, controle choque e diabetes choque.

De acordo com a figura 25, pode-se observar que houve uma redução no índice de reconhecimento da memória curto-prazo (Gráfico A) nos grupos controle choque ( $p < 0,01$ ) e diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com os seus respectivos controles, controle não choque e diabetes não choque (fator tratamento:  $F_{1,28} = 14$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,28} = 42,01$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,28} = 1,48$  e  $p = 0,23$ ), além disso, foi observado que o diabetes choque ( $p < 0,01$ ) apresentou uma redução mais acentuada quando comparado com controle choque. Na figura 16, pode-se observar também que houve uma redução no índice de reconhecimento da memória longo-prazo (Gráfico B) nos grupos controle choque ( $p < 0,01$ ) e diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com os seus respectivos controles, controle não choque e diabetes não choque (fator tratamento:  $F_{1,28} = 14,28$  e  $p < 0,001$ ; fator choque:  $F_{1,28} = 33,43$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,28} = 0,38$  e  $p = 54,04$ ), além disso, foi observado que o diabetes choque ( $p < 0,05$ ) apresentou uma redução mais acentuada quando comparado com controle choque.

Figura 25 - Índice de Reconhecimento Memória Curto-prazo - Gráfico A e Índice de Reconhecimento Memória Longo-prazo - Gráfico B dos grupos controle não choque (n = 8), diabetes não choque (n = 8), controle choque (n = 8) e diabetes choque (n = 8)



Fonte: DA AUTORA.

Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com controle e diabetes não choque, respectivamente e ## $p < 0,01$  quando comparado com o controle choque - gráfico A e \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com controle e diabetes não choque, respectivamente e # $p < 0,05$  quando comparado controle choque - gráfico B (ANOVA *Two-Way* seguido do pós- teste *Bonferroni*).

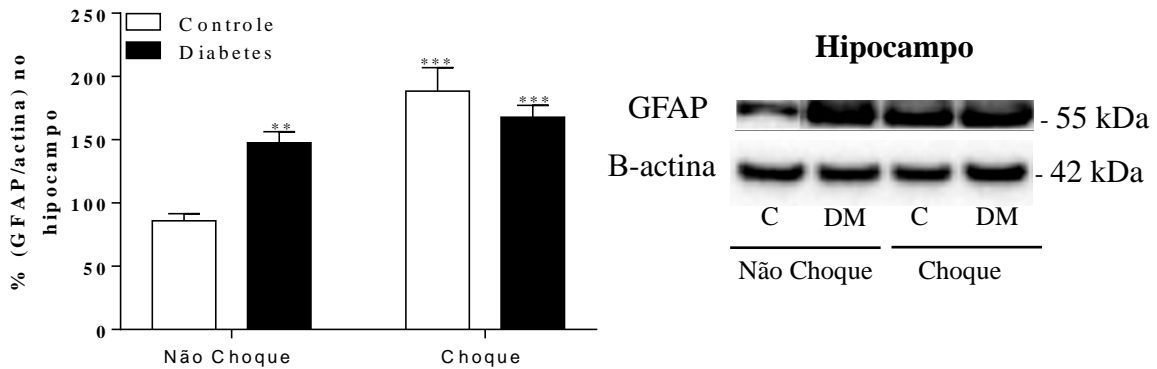
### 6.2.9 Avaliação da expressão da proteína GFAP por *Western blotting* no Hipocampo

A figura 26 mostra a avaliação da porcentagem da expressão da % da proteína GFAP/actina no Hipocampo dos grupos controle não choque, diabetes não choque, controle choque e diabetes choque.

De acordo com a figura 26, pode-se observar que houve um aumento da % de GFAP/Actina no hipocampo dos grupos diabetes não choque ( $p < 0,01$ ), controle choque ( $p < 0,001$ ) e diabetes choque ( $p < 0,001$ ) quando comparados com o controle não choque (fator tratamento:  $F_{1,20} = 3,072$  e  $p = 0,09$ ; fator choque:  $F_{1,20} = 27,84$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,20} = 12,54$  e  $p < 0,01$ ).



Figura 26 - (GFAP/actina) % no hipocampo dos grupos controle não choque (n = 6), diabetes não choque (n = 6), controle choque (n = 6) e diabetes choque (n = 6)



Fonte: DA AUTORA.

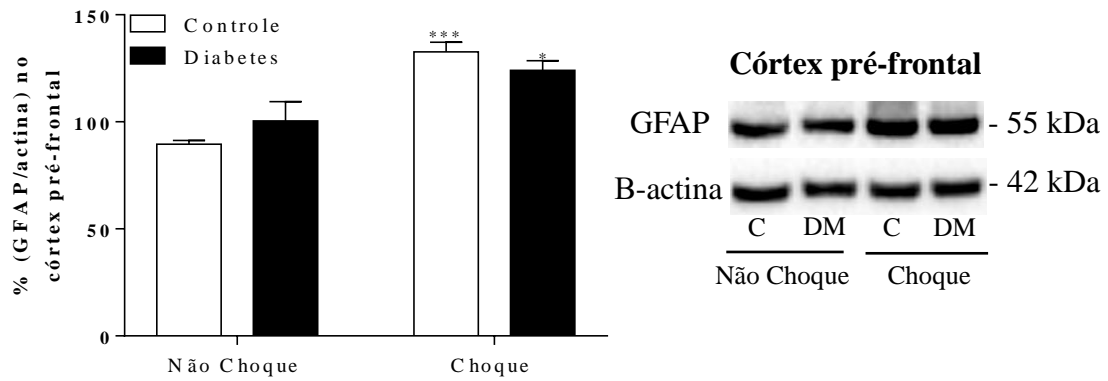
Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 comparado ao grupo controle não choque (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste Bonferroni).

### 6.2.10 Avaliação da expressão da proteína GFAP por *Western blotting* no Córtex pré-frontal

A figura 27 mostra a avaliação da porcentagem da expressão da proteína GFAP/actina no Córtex pré-frontal dos grupos controle não choque, diabetes não choque, controle choque e diabetes choque.

De acordo com a figura 27, pode-se observar que houve um aumento da % de GFAP/Actina no córtex dos grupo controle choque ( $p < 0,001$ ) e diabetes choque ( $p < 0,05$ ) quando comparados com seus respectivos controles, controle não choque e diabetes não choque, respectivamente (fator tratamento:  $F_{1,20} = 3,08$  e  $p = 0,09$ ; fator choque:  $F_{1,20} = 35,94$  e  $p < 0,001$ ; interação entre os dois fatores:  $F_{1,20} = 0,03$  e  $p = 0,84$ ).

Figura 27 - (GFAP/actina) % no Córtex pré-frontal dos grupos controle não choque (n = 6), diabetes não choque (n = 6), controle choque (n = 6) e diabetes choque (n = 6)



Fonte: DA AUTORA.

Legenda: Valores expressos como média  $\pm$  SEM \*\*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$  comparado seus respectivos controles (controle não choque e diabetes não choque) (ANOVA Two-Way seguido do pós-teste *Bonferroni*).

## 7 DISCUSSÃO

A seguir será apresentada a discussão do presente trabalho:

### 7.1 DESENVOLVIMENTO DO TEPT EM ANIMAIS COM NA SÍNDROME METABÓLICA

Os resultados deste trabalho demonstram que animais do grupo frutose após 5 semanas da ingestão da solução 10% de frutose apresentaram um aumento da ingestão líquida, que consequentemente, levou um aumento da variação do ganho de peso, do índice de Lee, da gordura retroperitoneal e epididimal, dosagem hormonal de leptina e dosagens bioquímicas (glicemia, triglicérides, colesterol total, HDL, VLDL e LDL), sugerindo assim, que os animais que consumiram frutose desenvolveram uma síndrome metabólica, devido as alterações metabólicas apresentadas acima.

Os resultados encontrados são semelhantes ao estudo de Orlandi e colaboradores (2015), em que demonstram em sua pesquisa que ratos machos *wistar* após ingerirem durante 5 semanas uma solução de frutose 10% apresentaram distúrbios metabólicos caracterizados por elevados níveis de glicose sanguínea, dislipidemias, aumento do tecido adiposo e desenvolvimento de resistência à insulina.

Dietas ricas em frutose em experimentos com roedores são bem caracterizadas e estabelecidas na literatura. Vários estudos com animais demonstram que as dietas ricas em frutose aumentam os níveis de glicose, colesterol total, triglicérides, HDL e LDL, além do ganho de peso, ingestão líquida e aumento de gorduras retroperitoneal e epididimal. Além de elevados níveis hormonais, como de leptina e insulina provocando uma série de alterações no organismo, podem levar a doenças crônicas não transmissíveis (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005; KELLEY et al. 2004; ROGLANS et al. 2007; KAMARI et al., 2007).

Além do mais, o consumo de frutose em dietas consumidas por humanos está também correlacionados com o aumento da adiposidade visceral, que por sua vez, contribui para resistência à insulina e aumento da pressão arterial, podendo levar a doenças como diabetes, hipertensão e síndrome metabólica (LE et al., 2009; STANHOPE et al., 2009).

Portanto, após o grupo frutose desse estudo apresentarem todas alterações metabólicas citadas acima, então concluiu-se que eles estão com síndrome metabólica, como foi demonstrado anteriormente. Assim, após 5 semanas com a ingestão da solução de frutose

esses animais foram expostos ao choque inescapável seguido por isolamento social para indução do TEPT.

O TEPT é uma doença psiquiátrica crônica de alta prevalência e morbidade, que se desenvolve em indivíduos após experimentar um evento traumático intenso e potencialmente perturbador. O transtorno está listado na quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) como um "transtorno relacionado a trauma e estresse". As características sintomáticas do TEPT incluem alterações cognitivas e emocionais, causadas principalmente por uma adaptação ao trauma. Os sintomas cognitivos incluem a incapacidade de extinguir respostas de medo e ansiedade, suprimir a recuperação de memória episódica e adquirir sinais de insegurança. As disfunções cognitivas estão ligadas ao desenvolvimento de TEPT e sua cronicidade, além de estar relacionadas aos sintomas que incluem lembranças espontâneas, *flashbacks*, amnésia dissociativa (déficits de memória), depressão, entre outros. As principais características do transtorno são: reexperiência traumática, hiperexcitabilidade psíquica e motora, esquiva e isolamento social (MESSMAN-MOORE; WARD; BROWN, 2009; HEIM; NEMEROFF, 2009; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; HOLMES; SINGEWALD, 2013; PARSONS & RESSLER, 2013).

Observa-se que o TEPT é uma patologia de causas e consequências multifacetadas, e como já citado, necessita de estudos para compreender melhor quais os mecanismos responsáveis. Por isso, estudos em modelos animais são de grande importância para desvendar e compreender esses mecanismos. Até o momento, não existe um modelo único aceito que induz TEPT, embora vários paradigmas de estresse mimetizem os sintomas comportamentais e as alterações neuroendócrinas características do TEPT. Modelos animais de TEPT que usam estressores físicos incluem choque nas patas, aprendizado do medo intensificado pelo estresse, estresse por restrição e estresse prolongado. Os paradigmas de estresse físico são usados sozinhos ou em combinação para imitar vários graus de estresse e para examinar respostas comportamentais a estressores subsequentes (WHITAKER; GILPIN; EDWARDS, 2014; SCHÖNER et al., 2017).

O Choque elétrico, é um dos modelos estressores amplamente empregado na indução do TEPT, em que provoca efeitos comportamentais e fisiológicos de longa duração que persistem por até 3 semanas e podem até se intensificar com o tempo. Ele reproduz alguns dos principais sintomas do TEPT, incluindo comportamento preditivo de esquiva, ansiedade, hiperexcitabilidade, agressão e reexperiência, bem como alterações no sono. A incorporação desses modelos ao induzir o TEPT em roedores oferece uma interessante perspectiva na

pesquisa, uma vez que relembra sintomas de TEPT em humanos, como reexperiência (PYNOOS et al., 1996; PAWLYK et al., 2005; LOUVART et al., 2005; LOUVART et al., 2006). Sendo assim, um importante instrumento em estudos com TEPT, e por isso, foi o modelo utilizado nesse trabalho, ressaltando que foi um modelo de choque seguido por isolamento social (BERARDI, 2014).

Deste modo, após a exposição ao choque e isolamento por 14 dias, foram observados os seguintes resultados, os animais dos grupos controle choque e SM choque ao serem expostos ao trauma apresentaram alterações comportamentais como aumento no tempo de congelamento, do comportamento tipo depressivo e ansioso, além da redução da sociabilidade e déficits da memória de curto e longo prazo não relacionado ao trauma quando comparado aos seus respectivos grupos controles (controle não choque e SM não choque), ressaltando que os animais SM choque, apresentaram todas essas alterações citadas anteriormente, de uma forma mais acentuada quando comparado ao grupo controle choque.

Os resultados demonstraram um aumento no tempo de congelamento dos animais SM choque e controle choque quando comparado aos seus respectivos controles (controle não choque e SM não choque). Roedores machos, que passaram pelo mesmo protocolo desse estudo, apresentam um aumento no tempo de congelamento quando são reexpostos ao local do trauma novamente (BERARDI et al.; 2014; SCHÖNER et al., 2017). Além disso, nesse estudo observa-se que o grupo de animais SM choque apresentaram um aumento mais acentuado no tempo de congelamento quando comparado ao grupo controle choque, demonstrando que houve uma hiper retenção da memória relacionada ao trauma nesses animais.

A exposição a choques nas patas em ratos, juntamente com o isolamento social, induziu uma redução duradoura do comportamento social aliada à recuperação excessiva da experiência traumática, levando à disfunção crônica. Observa-se que a exposição a choques nos pés induz uma forma duradoura de memória de medo contextual caracterizada por taxas de congelamento extremamente altas, ainda presentes até 3 meses após a exposição ao estresse. Isso destaca a natureza crônica da memória do medo, uma característica principal da patologia do TEPT em humano. É interessante, também do ponto de vista translacional, que a experiência estressante tenha causado também uma alteração crônica do comportamento social (BERARDI et al., 2014).

Como já demonstrando, o TEPT é uma patologia multifacetada que inclui vários sintomas, como depressão, ansiedade, medo, entre outros. Nessa pesquisa observa-se que os

animais SM choque e controle choque apresentaram uma redução da sociabilidade (redução da interação social), um comportamento tipo depressivo (aumento do tempo de imobilidade no nado forçado), tipo ansioso (aumento da permanência nos braços fechados e redução da permanência no braços aberto) e déficit de memória a longo e curto prazo não relacionado ao trauma (redução no índice de reconhecimento) quando comparado aos seus respectivos controles (controle não choque e SM não choque), sendo que os animais SM choque tem uma alteração mais acentuadas de todos os parâmetros quando comparado ao grupo controle choque. Assim, SM choque possuem uma maior redução da sociabilidade, aumento do comportamento tipo depressivo, tipo ansioso e déficit de memória curto e longo prazo não associada ao trauma.

Uma pesquisa em que induziram o TEPT em roedores, semelhante ao protocolo utilizado nesse estudo, indução por choques elétricos seguido por isolamento social, demonstraram uma redução da interação social nos animais expostos ao choque quando comparado ao seu controle, ratificando os resultados encontrados nesse trabalho (BERARDI et al., 2014).

A interação social reduzida exibida por animais isolados é de alto valor translacional em relação aos critérios diagnósticos humanos de “sentir-se alienado dos outros” e “redução do funcionamento social”, que são dois sintomas incluídos no DSM-5, relacionados a alterações de cognições e humor. Esse resultado demonstra que ratos expostos ao choque e isolados expressam uma forte memória contextual para a experiência traumática acompanhada de retraimento social, ansiedade e sintomas de emocionalidade enfraquecida. É importante ressaltar que todos os sintomas são persistentes e não sofrem recuperação espontânea, destacando a natureza crônica dos sintomas observados (TREZZA et al., 2011; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Estudos em humanos demonstram uma redução dessa sociabilidade em indivíduos que passam por experiências traumáticas na vida está envolvida com a outros distúrbios, como aumento da ansiedade, sintomas depressivos, além de sintomas suicidas (SCHÖNER et al., 2017; MORENA et al., 2018).

Nesse trabalho, observou-se que animais expostos ao trauma demonstraram comportamentos preditivos de ansiedade (redução da permanência nos braços abertos no labirinto em cruz elevado) e depressão (aumento da imobilidade no teste de nado forçado). Roedores com TEPT apresentam comportamentos tipos ansiosos e depressivos quando são expostos ao teste de labirinto em cruz elevado (LEC) e ao nado forçado (NF), respectivamente

(MUNOZ- ABELLÁN et al., 2008; SEROVA et al., 2013; BERARDI et al., 2014; LIU et al., 2017).

O LEC é um teste amplamente utilizado para avaliação do comportamento semelhante a ansiedade e baseia-se no comportamento espontâneo de roedores, envolvendo o conflito entre a exploração de um novo ambiente e suas características aversivas (PELLOW et al., 1985; FILE et al., 2004). Ratos machos ao serem expostos ao estresse prolongado único e depois de um período da indução ao TEPT foram avaliados no LEC e apresentaram uma redução no tempo nos braços abertos. Quanto menor o tempo que o animal gasta nos braços abertos no LEC é considerado como um comportamento semelhante à ansiedade, sendo assim, observa que os animais SM choque e controle choque desse experimento demonstraram uma redução nos braços abertos, sugerindo assim, um comportamento tipo ansioso desses animais quando comparado ao seu controle (PATKI, et al. 2014; LIU et al., 2018).

Além disso, vale ressaltar que os ratos na pesquisa de Liu et al. (2018) no teste de nado forçado apresentaram um aumento do tempo de imobilidade no NF, sugerindo assim, um comportamento tipo depressivo, também um resultado semelhante como apresentado neste estudo. O NF é um teste comportamental amplamente utilizado para a detecção de efeitos semelhantes à depressão, foi descrito pela primeira vez por Porsolt et al. (1977). Pesquisadores relatam que roedores quando expostos a indução do TEPT, por modelos como, odor de gato, estresse único prolongado ou exposição ao choque apresentam um aumento da imobilidade como demonstrada nesse trabalho, sugerindo assim, comportamento semelhante a depressão (SEROVA et al., 2014; LIU et al., 2018).

A depressão e ansiedade são um dos principais sintomas apresentados em veteranos de guerra, mulheres que sofreram algum tipo de violência e até mesmo em crianças e adolescentes que sofreram algum trauma ao decorrer da vida (BALI; JAGGI, 2015; SAKELLARIOU; STEFANATOU, 2017).

Outra questão importante quando se caracteriza o desenvolvimento do TEPT é as alterações relacionadas a memória não associadas ao trauma. As disfunções relacionadas a memória desempenham um papel crucial tanto no desenvolvimento como na manutenção do transtorno de estresse pós-traumático. Indivíduos que sofrem desta condição persistentemente reexperimentam o evento traumático, particularmente quando expostos a sinais relacionados ao trauma e exibem déficits de memória não relacionadas ao trauma (MIKICS; BARANYI,

HALLER, 2008; XIE; KUANG; TSIEN, 2013; EAGLE et al., 2013; PHILBERT; BELZUNG; GRIEBEL, 2015; VETERE et al., 2019).

O teste de reconhecimento de objetos (TRO) é um ensaio comportamental utilizado para a investigação de vários aspectos da aprendizagem e memória em roedores. É bastante simples, pode ser concluída em 3 dias (dia de habituação, dia de treinamento e dia do teste), não é considerado um teste estressante, é eficiente para a memória e apropriado para a detecção de alterações neuropsicológicas após manipulação farmacológica, biológica ou genética. Pesquisas demonstram um déficit de memória a curto prazo e a longo prazo em roedores com TEPT quando expostos ao teste de reconhecimento de objetos, semelhante ao que foi mostrado nesse delineamento experimental (MIKICS; BARANYI, HALLER, 2008; XIE; KUANG; TSIEN, 2013; PHILBERT; BELZUNG; GRIEBEL, 2015).

A formação e a recordação de memórias é uma questão fundamental na neurociência moderna. O hipocampo é a principal região do cérebro para a formação de memórias episódicas. Os danos a ele, resultam na perda quase completa da capacidade de formar novas memórias, embora memórias previamente adquiridas permaneçam intactas. Os mecanismos neurais subjacentes à contribuição do hipocampo para a aquisição e consolidação de memórias episódicas, particularmente, os componentes espacial, temporal e associativo da memória episódica, têm sido rigorosamente estudados em roedores. No condicionamento contextual do medo e no modelo comportamental de aprendizagem associativa a memória, os roedores aprendem a associar um contexto específico a um estímulo aversivo, por exemplo, exposição ao choque em modelos que estudam o TEPT, resultando em prejuízos na memória (atenuação da memória consolidada e déficits de memória não relacionadas ao trauma). (MCGAUGH, 2000; DUDAI, 2012; KAOUANE et al., 2012).

As mudanças causadas pelo estresse preparam o indivíduo para as consequências agudas de uma situação ameaçadora e induzem respostas adaptativas a longo prazo, incluindo influências no aprendizado e na memória. Eventos estressantes, como experiências traumáticas, geralmente são mais lembrados e, por outro lado, a memória que não é útil para o evento estressante pode ser dificultada pelo estresse (ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011; DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2016). Assim, testamos se os animais que foram induzidos ao TEPT e desenvolveram SM tinham comprometimentos de memória não relacionados ao trauma. Encontramos uma redução no tempo de exploração total em animais expostos a curto e longo prazo e maior comprometimento nos índices de reconhecimento de curto e longo prazo em animais com SM e naqueles submetidos a TEPT, demonstrando que a



SM foi capaz de acentuar um sintoma relacionado ao TEPT, que é o comprometimento da memória não associado a trauma.

No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes à deficiência de memória induzida por estresse grave ainda precisam ser entendidos. Além disso, não está claro se esse prejuízo na memória é atribuível ao déficit de consolidação ou recuperação/expressão da memória. E ainda, não se sabe como um evento traumático contribui para a etiologia das patologias de ansiedade ou TEPT, de fato, embora o estresse e os glicocorticóides sejam conhecidos como contribuintes críticos da etiologia do TEPT. A compreensão do efeito e dos mecanismos subjacentes à formação da memória após uma experiência traumática é importante para maiores compreensão da etiologia do transtorno de estresse e do TEPT (KESSLER et al., 2005; PITMAN et al., 2012; FINSTERWALD et al., 2015).

Além disso, vale enfatizar que os animais desse experimento passaram também pelo teste de campo aberto. Esse teste avalia a atividade locomotora dos animais e comportamentos preditivos de ansiedade (VILELA, 2009). Observa em nossos resultados que nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos, sugerindo assim, que os animais dos grupos analisados nesse estudo não possui alterações na locomoção.

A locomoção relacionada ao TEPT é bem contraditória na literatura, Geerse e colaboradores (2006) relataram que ratos com TEPT apresentaram um aumento da imobilidade no teste de campo aberto no seu estudo, assim, sugerindo problemas de locomoção. Porém, já há relatos na literatura, em que roedores quando expostos a protocolos de indução do TEPT (odor de gato, estresse único prolongado, choque elétrico seguido por isolamento) não demonstram diferenças entre os grupos exposto ao trauma quando comparado ao o seu controle, como observado nessa pesquisa (REZNIKOV et al., 2015; BERARDI, 2014). Assim, ressaltando que as alterações encontradas em cada teste estão relacionadas na sua totalidade com ao desenvolvimento do TEPT e não com a locomoção.

Além do mais, de acordo com resultados apresentados o grupo SM choque apresentaram um ganho de peso, índice de Lee, gordura retroperitoneal e epididimal. Estudos demonstram que o ganho de peso pode levar a obesidade e até mesmo outras alterações metabólicas, como diabetes, que pode comprometer a homeostase do organismo (FARR, 2014; JACOBS et al., 2014; GAC et al., 2015; MICHPOULOS et al., 2017).

Não se pode afirmar que os animais desse estudo estão obesos, mas já existem pesquisas em humano que demonstram que a TEPT está relacionada ao risco elevado de síndrome metabólica e a obesidade, como o exemplo, de veteranos de guerras que ao decorrer

da vida apresentaram um aumento do índice de massa corporal, doenças como, diabetes e hipertensão. No entanto, a direção dessa associação e os mecanismos envolvidos entre essas duas patologias ainda não estão bem estabelecidos na literatura (SCHNURR et al., 2000; VIEWEG et al., 2007; HEPPNER et al., 2009; AHMADI et al., 2011; BARTOLI et al., 2013; O'DONOVAN et al., 2015; ROSENBAUM et al., 2015; GREEN et al., 2016; BLESSING et al., 2017; WOLF et al., 2017).

Além disso, quando se discute sobre TEPT e síndrome metabólica pesquisadores apontam que essas duas patologias estão associadas com alterações psiquiátricas como depressão e ansiedade ou até mesmo relacionados com problemas de memória não associada ao trauma e interação social (BERARDI, 2014; BARTOLI et al., 2015; GIRIDHARAN et al., 2016; MORENA, 2017; SCHÖNER et al., 2017).

E o presente estudo demonstrou que os animais SM, após a indução do TEPT apresentaram alterações mais acentuadas, como um aumento do comportamento tipo depressivo e ansioso, redução da sociabilidade e déficit de memória curto e longo prazo não associada ao trauma comparado aos animais que somente apresentavam o TEPT (controle choque).

Como já mencionado anteriormente, observa-se que pesquisas relacionadas ao TEPT e suas alterações metabólicas já estão bem estabelecidas na literatura. Porém, a possibilidade que essas alterações possam se agravar ou não em um indivíduo com síndrome metabólica já pré-estabelecida ainda não foi esclarecido, por isso a importância desse estudo inédito para esclarecer as vias e mecanismos para futuras intervenções terapêuticas, para que assim, possa abrir novos caminhos de pesquisa não apenas em termos de uma melhor compreensão do suporte neural do transtorno, mas também para o teste de drogas inovadoras, que poderia agir ao mesmo tempo, reduzindo a incapacidade cognitiva e melhorando a disfunção emocional observada em pacientes com TEPT que possuem alterações metabólicas, como a SM.

Portanto, podemos destacar com os resultados apresentados nessa discussão que os animais com SM após serem expostos ao trauma acentuaram ainda mais os sintomas relacionados ao desenvolvimento do TEPT.

## 7.2 DESENVOLVIMENTO DO TEPT EM ANIMAIS COM DIABETES

Nesse estudo, além da SM, foi analisado também a diabetes já pré-estabelecida no desenvolvimento do TEPT. E foram observados os seguintes resultados, animais após a

indução da diabetes pela aloxana apresentaram um aumento nos níveis de glicemia, perda de peso, além de da poliúria, sugerindo assim, que esses animais estavam diabéticos.

A indução de diabetes por aloxana é um protocolo bem caracterizado e estabelecido na literatura, além de ser de baixo custo e com resultados eficazes para indução da diabetes em roedores, por isso, esse protocolo foi utilizado nesse estudo, como já mencionado anteriormente (LERCO et al., 2003; CAVALLI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007; SILVA; NOGUEIRA, 2015).

A aloxana promove uma liberação maciça de insulina, presumivelmente em virtude do influxo de íons cálcio ao citosol das células  $\beta$ , no entanto, trata-se de uma liberação de curta duração, seguida por completa supressão da resposta das ilhotas pancreáticas à glicose, em decorrência de necrose das células  $\beta$ . A ação da aloxana no pâncreas é precedida por sua rápida absorção e acúmulo nas células beta, atribuída a uma elevada taxa de captação da droga por essa célula, através do transportador de glicose GLUT2 presente no plasma. Portanto os efeitos patológicos da aloxana podem ser atribuídos as suas propriedades químicas, a absorção seletiva celular e ao acúmulo da mesma (SZKUDELSKI et al., 1998; LIMA et al., 2001; SZKUDELSKI, 2001; ZANOELLO et al., 2002; CAVALLI et al., 2007; LENZEN, 2008).

Estudos em roedores que utilizaram a dose de 150 mg/Kg pela via intraperitoneal, a mesma utilizada nesse protocolo, demonstraram que os animais apresentaram aumento nos níveis de glicemia, (ABUELGASSIM, 2013; BARAGOB et al., 2014). Assim, após certificar que os animais se encontravam com altos níveis de glicemia, concluiu-se que eles estavam diabéticos. E como foi demonstrado anteriormente, após 48 horas esses animais foram expostos ao choque inescapável seguido por isolamento social para indução do TEPT.

Deste modo, após 14 dias, a exposição ao choque, os animais do grupo diabetes não choque, controle choque, diabetes choque, demonstram os seguintes resultados, aumento no tempo de congelamento na reexposição ao aparato de choque, aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado, redução no tempo de permanência dos braços abertos, redução do teste de interação social, redução do índice de reconhecimento de objetos na memória a curto e longo prazo não relacionada ao trauma quando comparado ao grupo controle não choque, ressaltando que os animais diabetes choque apresentaram, todas essas alterações citadas anteriormente, de uma forma mais acentuada quando comparado ao grupo controle choque.

Além disso, os animais desse estudo passaram pelo teste de campo aberto, em que foi observado que os animais diabetes não choque e diabetes choque apresentaram redução da distância percorrida e aumento no tempo de imobilidade quando comparado ao controle não choque, sugerindo assim, que animais estão com redução da locomoção.

Como já demonstrado anteriormente, o TEPT está correlacionado com várias alterações comportamentais em animais quando exposto a algum tipo de trauma, observa-se que os animais com a SM pré-instalada promoveu alterações ainda mais acentuadas no desenvolvimento no TEPT e o mesmo pode ser observado no caso na diabetes já pré-instalada, em que os animais demonstram comportamentos semelhantes a ansiedade (aumento do tempo de permanência no braço aberto) e depressão (aumento do tempo de imobilidade), redução da sociabilidade e déficit de memória a curto e longo prazo não relacionada ao trauma. Assim, ratificando os resultados encontrados nesse estudo no protocolo de SM.

A DM é uma das doenças crônicas mais comuns no mundo com estimativas de mais de 425 milhões de pessoas com DM no mundo, metade delas sendo não diagnosticada e este número pode chegar a 642 milhões de pessoas até o ano 2040. Sabe-se, também, que o diabetes é frequentemente associado a doenças e complicações psiquiátricas, como transtorno de ansiedade e o transtorno de estresse pós-traumático. Pesquisas em indivíduos com TEPT, como veteranos de guerra, após a ocorrência do transtorno, que está relacionado ao estresse depois de um evento potencialmente traumático, tem demonstrado que a longo prazo esses indivíduos apresentam uma alta prevalência a susceptibilidade de doenças metabólicas, como, a diabetes (DE SOUZA et al., 2018).

O TEPT pode causar em alguns pacientes um estado de hipersensibilidade psicofisiológica que é caracterizada por uma resposta exagerada ao medo ou um déficit na extinção do medo. A generalização de uma memória de medo também pode se tornar incapacitante nos indivíduos com TEPT, pois alteram situações neutras ou seguras em estímulos de medo que podem influenciar negativamente vida do paciente, podendo levar sintomas de ansiedade e doenças como a depressão, além de problemas cognitivos relacionados ao déficit de memória e alterações metabólicas, como a diabetes (SAKELLARIOU; STEFANATOU, 2017).

No entanto, vale ressaltar que roedores (camundongos e ratos, idade jovem ou adulta) que possuem somente a diabetes (induzidas por outros fármacos, como estreptozotocina ou linhagens db/db) já demonstram comportamentos semelhantes a ansiedade (aumento do

tempo de permanência no braço aberto) e depressão (aumento do tempo de imobilidade) e redução da sociabilidade quando comparado ao controle (BELLUSH; REID et al., 1991; AMRANI et al., 1994; HAIDER et al., 2013). Dessa forma, observa-se, que os animais diabéticos com choque, nesse estudo, apresentaram um agravo ainda maior quando comparado ao controle choque e os animais que possuíam somente a diabetes. Portanto, é importante ressaltar que o desenvolvimento da TEPT em um diabético pode promover alterações ainda mais graves do que as já existentes.

Outro ponto importante é a questão da locomoção quando se discute a patologia da diabetes e do TEPT, como já mencionado anteriormente, a relação locomoção e TEPT é contraditória na literatura, há estudos que demonstram uma redução da locomoção dos animais com TEPT, embora outros já não mostram uma alteração da locomoção em grupos de animais com TEPT quando comparo ao controle. No nosso trabalho, observamos que os animais só com TEPT também não apresentaram alteração da locomoção quando comparado ao controle, porém os animais diabéticos com ou sem o TEPT demonstram uma redução da locomoção comparado ao controle não TEPT e controle com TEPT.

Pesquisas demonstram que roedores diabéticos (indução da diabetes por estreptozotocina e linhagem db/db), na idade adulta e jovem, apresentaram uma hipolocomoção, como a relatada no nosso estudo. Hipolocomoção é a característica marcante de vários distúrbios psiquiátricos como doença de Parkinson, Huntington, pseudoparkinsonismo induzido por antipsicóticos. Enquanto alguns argumentaram que a diminuição da atividade locomotora no teste de campo aberto pode ser responsável pelo aumento da duração da imobilidade no NF, outros não observaram nenhuma correlação entre a atividade locomotora e o desempenho de camundongos em NF. Além disso, estudos clínicos indicaram comorbidade da depressão com distúrbios hipolocomotores, como o parkinsonismo e outros distúrbios neuropsiquiátricos. Assim, sintomas depressivos também podem ser observados em indivíduos hipolocomotores, independente da alteração locomotora (BELLUSH et al., 1991; AMRANI et al., 1994; CRAWLEY, 1997; HÅKANSSON-OVESJÖ; 2000; PAPAPETROPOULOS et al., 2006; SHARMA, 2010).

Portanto, acreditamos que as alterações comportamentais encontradas nos animais com diabetes e TEPT, independente da redução da locomoção, devem estar mais relacionadas ao transtorno do que a alterações da diabetes, ou seja, a exposição ao trauma pode ter sido mais potente e levado as alterações comportamentais do que a relação da hipolocomoção nesses animais, nesse estudo.

### 7.3 A ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA CORRELACIONADAS COM TEPT E AS ALTERAÇÕES METABÓLICAS

Nos resultados do nosso estudo observa-se que houve um aumento da expressão da % GFAP/actina no hipocampo e córtex pré-frontal dos grupos de animais SM não choque, controle choque e SM choque quando comparados ao grupo de animais controle não choque e esse aumento foi mais acentuado no grupo SM choque quando comparado ao grupo controle choque.

Como já mencionado anteriormente, os astrócitos e a microglia estão cada vez mais envolvidos com diversas funções no organismo, além de desempenhar um papel integral na função do sistema nervoso. Os astrócitos compreendem a população mais abundante da glia no cérebro de mamíferos e são fundamentais para a boa funcionalidade do SNC uma vez que participam de eventos como migração neuronal, proteção contra o estresse oxidativo, composição da barreira hematoencefálica, transmissões sinápticas e resposta imune com secreção de citocinas pró-inflamatórias (VOLTERRA; MELDOLESI, 2005).

A ativação dos astrócitos está associada à expressão de uma proteína, chamada de Proteína Glial Fibrilar Ácida ou Glial fibrillary acidic protein (GFAP). A GFAP constitui o principal biomarcador de astrócitos, e é um tipo de filamento intermediário que compõe o citoesqueleto dos astrócitos (RODNIGHT et al., 1997). E alterações na estrutura, função e expressão dos astrócitos podem estar associadas tanto a doenças neuropsiquiátricas, quanto a alterações metabólicas (KIM et al., 2017).

Em relação a microglia, pesquisas demonstram que ela desempenha um papel importante no sistema de defesa do cérebro e na reparação de tecidos. No cérebro lesionado as microglias ramificadas transformam-se rapidamente de um estado de repouso para um ativo, proliferam, migram, liberam uma variedade de citocinas e se tornam fagocíticas (KREUTZBERG 1996; RAIVICH et al. 1999). A molécula adaptadora de ligação ionizada ao cálcio 1 (Iba1) é uma proteína de 17 kDa, cuja expressão é restrita a microglia/macrófagos (IMAI et al. 1996). A expressão de Iba1 é regulada na microglia, por exemplo, na ativação após axotomia do nervo facial (ITO et al. 1998), isquemia (ITO et al. 2001) e diversas doenças cerebrais (VON ERTZEN et al. 1998; MORI et al. 2000).

Devido a diversas funções no sistema nervoso central saudável e disfuncional, é fundamental avaliar como a disfunção dos astrócitos e microglia contribui para o desenvolvimento do TEPT em animais com SM ou Diabetes. De fato, os animais que

desenvolveram TEPT nesse estudo, demonstraram um aumento da expressão da % GFAP/actina no córtex pré-frontal e no hipocampo, e esse aumento foi mais acentuado nos animais com SM TEPT. E nos grupos de animais Diabetes TEPT também podemos observar um aumento da expressão da % GFAP/actina.

Um grupo de pesquisadores (TSAI et al. 2018) descobriram que os níveis de GFAP aumentam no hipocampo de camundongos expostos a uma dieta com 60% de gordura por 3 meses comparado ao seu grupo controle, e que o consumo de dietas hiperlipídicas levam a uma redução do comprimento e ramificação dos processos astrocíticos em algumas regiões, mas não o giro dentado do hipocampo, sendo que, essa retração de processos astrocíticos é importante para o suporte metabólico que os astrócito devem fornecer aos neurônios e suas sinapses (SONNAY et al., 2017; LIZARBE et al., 2019).

Observa-se também que há um aumento da expressão da % de Iba-1/actina no hipocampo do grupo de animais SM choque quando comparado ao grupo de animais SM não choque, além disso esse aumento foi ainda maior no grupo de animais SM choque quando comparado ao grupo de animais controle choque. Há também um aumento da expressão da % de Iba-1/actina no córtex pré-frontal dos grupos de animais SM não choque, controle choque e SM choque quando comparados ao grupo de animais controle não choque.

Em relação a micróglia, pesquisas tem demonstrado que a molécula Iba-1 tem sido predominantemente usada para determinar informações sobre as alterações morfológicas e distribuição da microglia em resposta a eventos adversos (NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005). Em nosso estudo, animais que desenvolveram SM e sintomas como TEPT tiveram um aumento de Iba-1 no hipocampo. No córtex pré-frontal, ambos os animais com SM expostos ou não ao choque também apresentaram expressão aumentada de Iba-1. Em uma pesquisa foi relatado, que a contenção crônica de ratos por 1 hora por dia durante 14 dias aumenta a contagem de células positivas para Iba-1 no córtex pré-frontal (TYNAN et al., 2010). Curiosamente, a exposição a curto prazo (2-4 dias) a um estresse imprevisível variável levou ao aumento da expressão de Iba-1 no hipocampo, e observou-se que uma exposição mais longa (35 dias) reduziu o mRNA para Iba-1 no giro dentado de ratos e camundongos (KREISEL et al., 2014).

Gzielo e seus colaboradores (2017), demonstraram uma redução da imunorreatividade tanto de GFAP quanto de Iba1, marcadores associados à ativação e inflamação da glia, no hipocampo de roedores alimentados com dieta hiperlipídica (modelo usado para indução de obesidade) por um longo período de tempo. Isso demonstra uma correlação com a obesidade

(um fator presente na SM) e alteração na ativação glial. De fato, em nosso estudo, animais com SM, mas sem indução de TEPT, apresentaram um aumento na expressão de GFAP no córtex pré-frontal, hipocampo e na expressão de Iba-1 no córtex pré-frontal.

Essa superexpressão de GFAP e Iba-1 é, portanto, indicativa de hiper-reatividade associada a SM de astrócitos (astrogliose) e microglia (microgliose) (LIZARBE et al., 2019), que foi acentuada em animais com TEPT. Os distúrbios cerebrais são acompanhados de neuroinflamação com astrogliose e microgliose geralmente em resposta a danos de processos neuronais próximos, mas a gliose pode se tornar prejudicial para os neurônios após a cronicidade (LÓPEZ-VALDÉS; MARTÍNEZ-CORIA; 2016). Pesquisadores também demonstraram que astrogliose associada à distúrbios metabólicos não ocorrem uniformemente através do hipotálamo, mas estão associados a microvasos, sugerindo uma possível resposta por astrócitos a alterações na barreira hematoencefálica e/ou a circulação periférica (BONDAN et al., 2019).

Já nos grupos de animais diabetes não choque, controle choque e diabetes choque observa-se que houve um aumento % GFAP/actina no hipocampo quando comparado ao grupo controle não choque e um aumento % GFAP/actina no córtex pré-frontal nos grupos de animais controle choque e diabetes choque quando comparados aos seus respectivos grupos controles (controle não choque e diabetes não choque).

Além dos muitos componentes da SM que podem afetar a função cerebral, a resistência à insulina e hiperglicemia é um elo importante e que deve ser ressaltado, principalmente quando se relaciona DM e transtornos neuropsiquiátricos, que também é outro foco desse estudo, (STECULORUM et al., 2015; MOHEET et al., 2015; DUARTE, 2015), devido ao fato de receptores de insulina serem amplamente distribuídos no cérebro (HAVRANKOVA et al., 1978; HILL et al., 1986). A insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), que possuem vias de sinalização convergentes no cérebro, regulam o controle neuronal da homeostase da energia e da glicose, agindo sobre os núcleos hipotalâmicos (STECULORUM et al., 2015), e também regulam as funções cognitivas, processos através de suas ações na neurotransmissão, plasticidade sináptica e neurogênese nos circuitos corticais e hipocampais (FERNANDEZ; TORRES-ALEMÁN, 2012).

Embora essa combinação de fatores com potencial impacto no SNC torne difícil o estudo dos mecanismos da disfunção cerebral induzida pelo diabetes, pesquisas em diferentes modelos de roedores relacionados a diabetes descobriram que condições diabéticas levam à deterioração sináptica que resulta em danos na neurotransmissão e plasticidade sináptica



(DUARTE et al., 2009, 2012A; CALVO-OCHOA et al., 2014), bem como neuroinflamação e astrogliose (SARAVIA et al., 2002; BAYDAS et al., 2008; DUARTE et al., 2009, 2012; CALVO-OCHOA et al., 2014).

Além disso, e como já relatado, o SNC é considerado um sistema glicodependente, por isso a glicose exerce um papel essencial ao seu adequado funcionamento e qualquer desequilíbrio associado ao fornecimento ou captação da glicose relacionada ao sistema nervoso pode ser prejudicial, causando sérias alterações no organismo, como o surgimento ou complicações de doenças neurológicas, metabólicas, etc. E as duas patologias metabólicas, SM e diabetes, envolvidas no desenvolvimento do TEPT nesse trabalho, estão relacionadas com uma hiperglicemia crônica que pode ser associada com ativação das células gliais estudadas, indicando expressão aumentada de GFAP (SM e diabetes) e Iba-1 (SM). Estudos demonstram que elevadas concentrações de glicose no organismo podem influenciar de maneira danosa no metabolismo cerebral e promover alterações nas células gliais, como estímulos excitotóxicos, em que o aumento da concentração de glutamato extracelular pode ser responsável pela morte de células neuronais (MELLO, 2012).

No entanto, vale ressaltar que os astrócitos e a microglia são ambos mediadores fundamentais do SNC, com isso, podem estar intimamente envolvidos com a excitabilidade neuronal. Além do mais, a neuroinflamação no SNC tem sido cada vez mais identificada como uma característica das alterações metabólicas, principalmente em estudos com obesidade em animais, não somente no hipotálamo, onde foi reconhecido pela primeira vez, mas também em outras áreas do cérebro. E é amplamente reconhecido que dietas obesogênicas que induzem efeitos inflamatórios precoces estão envolvidas com alterações neuropsiquiatrias e neurodegenerativas (HASLAM; JAMES, 2005; ARAÚJO; TORSONI; VELLOSO, 2010; THALER et al., 2012; BUCKMAN et al., 2013; GARCIA-CÁCERES; YI; TSCHÖP, 2013; BONDAN et al., 2018; BONDAN et al., 2019).

Outras complicações ocasionadas pela diabetes e ativação de células gliais que afetam o SNC estão associados ao aumento da incidência de convulsões, derrame, demência e comprometimento cognitivo observados em estudos com roedores e humanos. Essas patologias emergem de alterações no metabolismo cerebral, reatividade vascular e aumento do estresse oxidativo. Além disso, os astrócitos desempenham um papel relevante no metabolismo energético, manutenção da barreira hematoencefálica, reatividade vascular, regulação dos níveis extracelulares de glutamato e proteção contra espécies reativas de oxigênio, entre outras funções (MANKOVSKY et al., 1996; TSACOPOULOS;

MAGISTRETTI, 1996; WHITING et al., 1997; OTT et al., 1999; DRINGEN et al., 2000; HORANI; MOORADIAN, 2003; ZONTA et al., 2003; MANSCHOT et al., 2007; VALKO et al., 2007, BIESSELS et al., 2006, 2008; TIEHUIS et al., 2008; COLEMAN et al., 2010). Assim, diante dessas observações sugere-se que a atividade alterada dos astrócitos contribui para a fisiopatologia do SNC associada ao diabetes.

Pesquisas demonstram que os astrócitos fornecem suporte metabólico e estrutural aos neurônios e desempenham um papel ativo na modulação da neurotransmissão. No núcleo arqueado hipotalâmico (ARC), eles são regulados pelo balanço energético positivo e negativo e o aumento da expressão da proteína ácida glia-fibrilar (GFAP), plasticidade morfológica (aumento da ramificação e complexidade dos processos astrocitários) e expressão alterada do astrócito (FUENTE-MARTÍN et al., 2012; BUCKMAN et al., 2015; CHEN et al., 2016; ZHANG et al., 2017, VERKHRATSKY; NEDERGAARD, 2018; MACDONALD et al., 2019).

Os níveis elevados de glicose circulante alteram as atividades de neurônios e astrócitos, o que conseqüentemente resultam em complicações neurológicas em pacientes com DM. Os efeitos da hiperglicemia no cérebro, podem incluir, a redução do fluxo sanguíneo, alterações no metabolismo, aumento no nível de cálcio, aumento mediado pela glicose no estresse oxidativo e na inflamação. Em um estudo realizado com ratos adultos *wistar* diabéticos (indução da diabetes em única dose 45/mg/Kg por estreptozotocina) foi demonstrado um aumento da expressão de GFAP (*Immunoblotting*) no hipocampo quando comparado ao grupo de animais controle, após 7 dias da aplicação da droga na indução da diabetes, e esse aumento foi ainda maior após 14 dias, corroborando com os resultados encontrados em nosso estudo, em que podemos observar um aumento da expressão de GFAP nos animais com diabetes (LEBED et al., 2008; REAGAN, 2012; NAGAYACH; PATRO, 2014; SON et al., 2015)

Outros estudos reforçam o aumento de GFAP em estruturas cerebrais como, no hipocampo de animais diabéticos, em foi observado esse aumento tanto pela técnica de imuno-histoquímica e quanto pela de Western Blotting promovendo vários danos cerebrais (SARAVIA et al. 2002; BAYDAS et al., 2008). Por outro lado, outros trabalhos já apresentaram uma redução da expressão de GFAP no córtex e no hipocampo de roedores com diabetes até a quarta e oitava semana após a indução da diabetes (COLEMAN et al. 2004) ou não apresentaram alterações de GFAP quando comparado ao grupo controle (GUVEN et al. 2009).

Apesar da literatura apresentar dados conflitantes em relação aos níveis de expressão de GFAP, é importante ressaltar que diante dos resultados pode-se concluir que a diabetes preexistente acentua os sintomas semelhantes ao TEPT e que parece não estar relacionado diretamente com a astrogliose uma vez que associação diabetes versus TEPT não acentuou astrogliose. E como já discutido anteriormente, pesquisas relacionadas a doenças neuropsiquiátricas demonstram um aumento na expressão de GFAP no hipocampo e córtex pré-frontal, como os resultados encontrados neste trabalho, em que o grupos de animais com diabetes e TETP apresentaram um aumento na da expressão de GFAP, porém não foi mais acentuado quando comparado ao grupo controle choque.

Portanto, de acordo com nossos achados, sugere-se que alterações na atividade das células gliais, induzidas pelas alterações metabólicas e neuropsiquiátricas, causaram uma reação astrocitária no córtex pré-frontal e no hipocampo, como visto pelo aumento da expressão GFAP, indicando a ocorrência de astrogliose no grupo de animais com síndrome metabólica com transtorno do estresse pós-traumático e também uma reação da microglia, com aumento da expressão Iba-1 no grupo de animais síndrome metabólica com transtorno do estresse pós-traumático, indicando a ocorrência de microgliose. Porém, no grupo de animais diabetes choque esse aumento deve estar relacionada com outras vias de mecanismos e por isso mais estudos devem ser realizados para melhor compreensão da via que envolve diabetes e TEPT.

## **8 CONCLUSÃO**

Em conclusão, a SM e Diabetes acentuou sintomas semelhantes ao TEPT, que podem estar relacionados ao aumento da ativação glial e este estudo inédito ajuda a revelar fatores que podem predispor ao desenvolvimento de TEPT, como distúrbios metabólicos, e que possam contribuir para o aumento da incidência de indivíduos com TEPT. Além disso, o trabalho sugere possíveis mecanismos, a serem explorados em estudos futuros relacionando intervenções terapêuticas que possam contribuir para a eficácia no tratamento dos distúrbios metabólicos quando associado com o transtorno.

## REFERÊNCIAS

- ABUELGASSIM, A. O. Effect of *Acacia nilotica* fruit extract on serum glucose and lipid concentrations in alloxan-induced diabetic rats. **Pak J Biol Sci.**, v. 16, n. 21, p. 1398-1402, Nov. 2013.
- AHMADI, N. *et al.* Post-traumatic stress disorder, coronary atherosclerosis, and mortality. **Am J Cardiol.**, v. 108, n. 1, p. 29-33, July 2011.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **The diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5)**. Washington, DC, United States. British Library. 5<sup>o</sup> ed. 2013.
- AMRANI, A. *et al.* Glucose, insulin, and open field responses to immobilization in nonobese diabetic (NOD) mice. **Physiol Behav.**, v. 56, n. 2, p. 241-246, Aug. 1994.
- ARAÚJO, E.P.; TORSONI, M.A.; VELLOSO, L.A. Hypothalamic inflammation and obesity. **Vitam Horm.**, v. 82, p. 129-143, 2010.
- BALI, A.; JAGGI, A. S. Clinical experimental stress studies: methods and assessment. **Rev Neurosci.**, v. 26, n. 5, p. 555-579, 2015.
- BARAGOB, A. E. *et al.* The hypoglycemic effect of the aqueous extract of the fruits of *Balanites aegyptica* in alloxan-induced diabetic rats. **Pharmacognosy Res.**, v. 6, n. 1, p. 1-5, Jan. 2014.
- BARAGOB, A. E. *et al.* Evaluation of oxidative stress and lipid profile in STZ-induced rats treated with antioxidant vitamin. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 5, p. 272-279, 2014.
- BARTOLI, F. *et al.* Metabolic syndrome in people suffering from posttraumatic stress disorder: a systematic review and meta-analysis. **Metab Syndr Relat Disord.**, v. 11, n. 5, p. 301-308, Oct. 2013.
- BARTOLI, F. *et al.* Posttraumatic stress disorder and risk of obesity: systematic review and meta-analysis. **J Clin Psychiatry**, v. 76, n. 10, p. 1253-1261, Oct. 2015.
- BAYDAS, G. *et al.* Astroglialosis in the hippocampus and cortex and cognitive deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes: effects of melatonin. **Neurophysiology**, v. 40, p. 91-97, 2008.
- BELLUSH, L. L.; REID, S.G. Altered behavior and neurochemistry during short-term insulin withdrawal in streptozocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v. 40, n. 2, p. 217-222, Feb. 1991.
- BERARDI, A. *et al.* An updated animal model capturing both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 1-12, Abr. 2014.

- BIESSELS, G. J.; KOFFEMAN, A.; SCHELTENS, P. Diabetes and cognitive impairment. clinical diagnosis and brain imaging in patients attending a memory clinic. **J Neurol.**, v. 253, p. 477–482, 2006.
- BIESSELS, G. J.; DEARY, I. J.; RYAN, C. M. Cognition and diabetes: a lifespan perspective. **Lancet Neurol.**, v. 7, p. 184–190, 2008.
- BISON, S. et al. Differential behavioral, physiological, and hormonal sensitivity to LPS challenge in rats. **Int J Interferon Cytokine Mediator Res.**, v. 1, p.1-13, Dec. 2009.
- BLESSING E.M. *et al.* Biological predictors of insulin resistance associated with posttraumatic stress disorder in young military veterans. **Psychoneuroendocrinology**, v. 82, p. 91-97, Aug. 2017.
- BOLLINGER J. L.; BERGEON BURNS C. M.; WELLMAN C. L. Differential effects of stress on microglial cell activation in male and female medial prefrontal cortex. **Brain Behav Immun.**, v. 52, p. 88-97, Feb. 2016.
- BONDAN, E. F. *et al.* Hypercaloric diet induces astrogliosis in several areas of the rat brain. **J Comp Pathol.**, v. 58, n. 132, Jan. 2018.
- BONDAN, E. F. Memory impairments and increased GFAP expression in hippocampal astrocytes following hypercaloric diet in rats. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 77, n. 9, Sep. 2019.
- BOSCARINO, J. A. A prospective study of ptsd and early-age heart disease mortality among vietnam veterans: implications for surveillance and prevention. **Psychosom Med.**, v. 70, n. 6, p. 668-676, 2008.
- BRASIL. Ministério da saúde. Cadernos de Atenção Básica. Diabetes mellitus. Brasília. 2006. p. 56.
- BROUSSARD, J. I *et al.* Repeated mild traumatic brain injury produces neuroinflammation, anxiety-like behaviour and impaired spatial memory in mice. **Brain Inj.**, v. 32, n. 1, p. 113-122, 2018.
- BUCKMAN, L. B. *et al.* Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. **Mol Metab.**, v. 16, n. 4 (1), p. 58-63, Oct. 2014.
- BUCKMAN, L. B. *et al.* Regional astrogliosis in the mouse hypothalamus in response to obesity. **J Comp Neurol.**, v. 15, n. 521 (6), p. 1322-1333, Apr. 2013.
- CALVO-OCHOA, E. *et al.* Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 34, n. 6, p. 1001-1008, Mar./June 2014.
- CAVALLI V. L. L. O. *et al.* Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill). **Rev Bras Farmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 64-70, July 2007.

CHEN, C.L. *et al.* Potential of nonoral  $\alpha$ -lipoic acid aqueous formulations to reduce ocular microvascular complications in a streptozotocin-induced diabetic rat model. **J Ocul Pharmacol Ther.**, v. 29, n. 8, p. 738-745, Oct. 2013.

CHEN, N. *et al.* Direct modulation of GFAP-expressing glia in the arcuate nucleus bi-directionally regulates feeding. **Elife**, v. 18, n. 5., p. 18716, Oct. 2016.

COLEMAN, E. *et al.* Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. **Glia**, v. 48, n. 2, p. 166-178, Nov. 2004.

COLEMAN, E. S. *et al.* Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 and 8 weeks of diabetes duration. **Brain Res.**, v. 8; n. 1306, p. 131-141, Jan. 2010

CRAWLEY, J. N. *et al.* Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: Implications and recommendations for molecular studies. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 132, p. 107-124, 1997.

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Ver.**, v. 29, n. 4-5, p. 547-569, 2005.

DEDERT, E. A. *et al.* Posttraumatic stress disorder, cardiovascular, and metabolic disease: a review of the evidence. **Ann Behav Med.**, v. 39, n. 1, p. 61-78, Feb. 2010.

DE QUERVAIN, D.; SCHWABE, L; ROOZENDAAL, B. Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders. **Nat Rev Neurosci.**, v. 18, n. 1, p. 7-19, Jan. 2017.

DE SOUZA, C. P. *et al.* Posttraumatic stress disorder-type behaviors in streptozotocin-induced diabetic rats can be prevented by prolonged treatment with vitamin E. **Behav Brain Res.**, v. 1, n. 359, p. 749-754, Feb. 2019.

DER-AVAKIAN, A.; MARKOU, A. Withdrawal from chronic exposure to amphetamine, but not nicotine, leads to an immediate and enduring deficit in motivated behavior without affecting social interaction in rats. **Behav. Pharmacol.**, v. 21, n. 4, p. 359-368, 2014.

DIAO, C. *et al.* Systemic and characteristic metabolites in the serum of streptozotocin-induced diabetic rats at different stages as revealed by a <sup>1</sup>H-NMR based metabonomic approach. **Molecular BioSystems**, v. 10, p. 686-693, 2014.

DI BENEDETTO, B.; RUPPRECHT, R. Targeting glia cells: novel perspectives for the treatment of neuropsychiatric diseases. **Curr Neuropharmacol.**, v. 11, n. 2, p. 71-85, Mar. 2013.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J.M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in the brain. Metabolic interactions between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **Eur J Biochem.**, v. 267, p. 4912-4916, 2000.

DUARTE, J. M. *et al.* Caffeine consumption attenuates neurochemical modifications in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Neurochem.**, v. 111, n. 2, p. 368-379. Oct. 2009.

DUARTE, A. A; MOHSIN, S.; GOLUBNITSCHAJA, O. Diabetes care in figures: current pitfalls and future scenario. **EPMA J.**, v. 9, p. 125–131, 2018.

DUARTE, A. I.; MOREIRA, P. I.; OLIVEIRA, C.R. Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. **J Aging Res.**, v. 2012, n. 384017, Feb. 2012.

DUARTE, J. M. Metabolic Alterations Associated to Brain Dysfunction in Diabetes. **Aging Dis.**, v. 1; n. 6 (5), p. 304-321, Oct. 2015.

DUDAI, Y. The restless engram: consolidations never end. **Annu Rev Neurosci.**, v. 35, p. 227–247, 2012.

EAGLE, A. L.; FITZPATRICK, C. J.; PERRINE, S. A. Single prolonged stress impairs social and object novelty recognition in rats. **Behav Brain Res.**, v. 1, n. 256, p. 591-7, Nov. 2013.

ECKEL, R. H. *et al.* The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 375, p. 181–183, 2010.

FARR, O. M. *et al.* Stress- and PTSD-associated obesity and metabolic dysfunction: A growing problem requiring further research and novel treatments. **Metabolism.**, v. 63, n. 12, p.1463-1468, Dez. 2014.

FERDER, L.; FERDER, M. D.; INSERRA, F. The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. **Curr Hypertens.**, v. 12, p. 105-112, 2010.

FERNÁNDEZ, C. M. *et al.* The expression of rat resistin isoforms is differentially regulated in visceral adipose tissues: effects of aging and food restriction. **Metabolism.**, v. 58, n. 2, p. 204-211, 2009.

FERNANDEZ, A. M.; TORRES-ALEMÁN, I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. **Nat Rev Neurosci.**, v. 13, n. 4, p. 225-239, Mar. 2012.

FILE, S. E. *et al.* Animal tests of anxiety. **Curr Protoc Neurosci.**, v. 8, n. 8.3, 2004.

FINSTERWALD, C. *et al.* From Memory Impairment to Posttraumatic Stress Disorder-Like Phenotypes: The Critical Role of an Unpredictable Second Traumatic Experience. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 48, Dec. 2015.

FORTINO, M. A.; LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model. **Nutrition.**, v. 23, p. 489-497, 2007.

FUENTE-MARTÍN, E. *et al.* Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. **J Clin Invest.**, v. 122, n. 11, p. 3900-3913, Nov. 2012.

GARCÍA-CÁCERES, C.; YI C. X.; TSCHÖP, M. H. Hypothalamic astrocytes in obesity. **Endocrinol Metab Clin North Am.**, v. 42, n. 1, p. 57-66, Mar. 2013.



- GEERSE, G. J. *et al.* Individual reactivity to the open-field predicts the expression of stress-induced behavioural and somatic pain sensitisation. **Behav Brain Res.**, v. 174, n. 1, p. 112-118, Nov. 2006.
- GIRIDHARAN, V. V. *et al.* Newer insights into the role of miRNA a tiny genetic tool in psychiatric disorders: focus on post-traumatic stress disorder. **Transl Psychiatry**, v. 6, n. 11, p. 954, Nov. 2016.
- GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V.P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estud Av.**, v. 27, n. 77, 2013.
- GREEN, J. D. *et al.* The effect of enemy combat tactics on PTSD prevalence rates: A comparison of Operation Iraqi Freedom deployment phases in a sample of male and female veterans. **Psychol Trauma**, v. 8, n. 5, p. 634-640, Sep. 2016.
- GREEN, E. *et al.* Effects of posttraumatic stress disorder and metabolic syndrome on cognitive aging in veterans. **Gerontologist**, v. 56, n. 1, p. 72-81, Feb. 2016.
- GUGLIUCCI, A. Formation of fructose-mediated advanced glycation end products and their roles in metabolic and inflammatory diseases. **Adv Nutr.**, v. 17, n. 8 (1), p. 54-62, Jan. 2017.
- GUVEN, A. *et al.* Central nervous system complications of diabetes in streptozotocin-induced diabetic rats: a histopathological and immunohistochemical examination. **Int J Neurosci.**, v. 119, n. 8, p. 1155-1169, 2009.
- GZIELO, K. *et al.* Long-term consumption of high-fat diet in rats: effects on microglial and astrocytic morphology and neuronal nitric oxide synthase expression. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 37, n. 5, p. 783-789, 2017.
- HABA, R. *et al.* Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: possible role of activation of the central amygdala. **Behavioural Brain Research.**, v. 228, n. 2, p. 423-31, 2012.
- HAIDER S. *et al.* Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. **Acta Neurol Belg.**, v. 113, n. 1, p. 35-41, Mar. 2013.
- HAN, F.; XIAO, B.; WEN, L. Loss of glial cells of the hippocampus in a rat model of post-traumatic stress disorder. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 5, p. 942-951, Mar. 2015.
- HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. T. Obesity. **Lancet**, v. 366, p. 1197–1209, 2005.
- HAVEL, P. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. **Nutr Rev.**, v. 63, p. 133–157, 2005.
- HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. Neurobiology of posttraumatic stress disorder. **CNS Spectr.**, v. 14, n. 1, p. 13-24, 2009.
- HEPPNER, P. S. *et al.* The association of posttraumatic stress disorder and metabolic syndrome: a study of increased health risk in veterans. **BMC Med.**, v. 9, p. 1-7, Jan. 2009.

HERNÁNDEZ-SALINAS, R. *et al.* Antioxidant and anti-hyperglycemic role of wine grape powder in rats fed with a high fructose diet. **Biol Res.**, v. 48, n. 1, p. 53, 2015.

HIGA, T.S. *et al.* Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.**, v. 6, p. 47-54, 2014.

HOLMES, A.; SINGEWALD, N. Individual differences in recovery from traumatic fear. **Trends Neurosci.**, v. 36, n. 1, p. 23-31, Jan. 2013.

HORANI, M. H.; MOORADIAN, A. D. Effects of diabetes on the blood brain barrier. **Curr Pharm Des.**, v. 9, p. 833-840, 2003.

IMAI, Y. *et al.* A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 224, n. 3, p. 855-862, July 1996.

ITO, D. *et al.* Enhanced expression of *Iba1*, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. **Stroke**, v. 32, n. 5, p. 1208-1215, May 2001.

ITO, D. *et al.* Microglia-specific localization of a novel calcium binding protein, *Iba1*. **Brain Res Mol Brain Res.**, v. 57, n. 1, p. 1-9, June 1998.

JACOBSEN, L. K.; SOUTHWICK, S. M.; KOSTEN, T. R. Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: A review of the literature. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, p. 1184-1190, 2001.

JACQUES-SILVA, M. C. *et al.* Papel dos astrócitos no sistema nervoso central. **Ciência em Movimento**, v. 18, p. 61-69, 2007.

JIN, H. *et al.* Association of posttraumatic stress disorder with increased prevalence of metabolic syndrome. **J Clin Psychopharmacol.**, v. 29, n. 3, p. 210-215, 2009.

JONES, J. P. *et al.* Art therapy interventions for active duty military service members with post-traumatic stress disorder and traumatic brain injury. **International Journal of Art Therapy Formerly Inscape**, v. 23, n. 2, 2018.

KAMARI, Y. *et al.* Metabolic stress with a high carbohydrate diet increases adiponectin levels. **Horm Metab Res.**, v. 39, p. 384-388, 2007.

KAMNAKSH, A. *et al.* Factors affecting blast traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 28, n. 10, p. 2145-2153, Oct. 2011.

KAOUANE, N. *et al.* Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. **Science**, v. 335, n. 6075, p. 1510-1513, Mar. 2012.

KELLEY, G.L.; ALLAN, G.; AZHAR, S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. **Endocrinology**, v. 145, p. 548-555, 2004.

- KELMENDI, B. *et al.* PTSD: from neurobiology to pharmacological treatments. **Eur J Psychotraumatol.**, v. 8; n. 7, p. 31858, Nov. 2016.
- KENNEDY, A.J. *et al.* Mouse models of the metabolic syndrome. **Dis Model Mech.**, v.3, n. 3–4, p. 156–166, 2010.
- KESSLER, R. C. *et al.* Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, p. 593-602, 2005.
- KIM, R., *et al.* Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: From astrocytopathy to astrogliosis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 87, p. 126-146, 2018.
- KIM, S. K.; NABEKURA, J.; KOIZUMI, S. Astrocyte-mediated synapse remodeling in the pathological brain. **Glia**, v. 65, n. 11, p. 1719-1727, Nov. 2017.
- KIMELBERG, H. K.; NOREMBERG, M. D. Astrocytes. **Sci Am.**, v. 260, n. 4, p. 66-72, Apr. 1989.
- KIRKEDAL, C. A dual inhibitor of FAAH and TRPV1 channels shows dose-dependent effect on depression-like behaviour in rats. **Acta Neuropsychiatr.**, v. 12, p. 1-6, Dec. 2017.
- KOOLHAAS, J. M. *et al.* Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 35, n. 5, p. 1291-1301. Apr. 2011.
- KOOLHAAS, J. M. The laboratory rat. In: POOLE, T. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 7th ed. British: Blackwell Science, v.1, p. 313-330, 2006.
- KREISEL, T. *et al.* Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. **Mol Psychiatry**, v. 19, n. 6, p. 699-709. 2014.
- KRETZ, O. *et al.* Corticotropin-releasing hormone expression is the major target for glucocorticoid feedback-control at the hypothalamic level. **Brain Res.**, v. 818, p. 488–491. 1999.
- KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci.**, v. 19, n. 8, p. 312-318, Aug. 1996.
- KUMAR, R. *et al.* In vivo evaluation of hypoglycemic activity of Aloe spp. and identification of its mode of action on GLUT-4 gene expression in vitro. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 1246–1256, 2011.
- LE, K. A. *et al.* Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. **Am J Clin Nutr.**, v. 89, p. 1760-1765, 2009.
- LE, K. A.; TAPPY, L. Metabolic effects of fructose. Current opinion in clinical. **Nutrition and Metabolic Care**, v. 9, p. 469–475, 2006.

LEBED, Y. V. *et al.* Early reaction of astroglial cells in rat hippocampus to streptozotocin-induced diabetes. **Neurosci Lett.**, v. 444, n. 2, p. 181–185, 2008.

LEE, D. Y.; KIM, E.; CHOI, M. H. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. **BMB Rep.**, v. 48, n. 4, p. 209-216, Apr. 2015.

LEHNER, M. *et al.* Chronic restraint increases apoptosis in the hippocampus of rats with high responsiveness to fear stimuli. **Neuroscience Letters.**, v. 586, p. 55-59, Jan. 2015.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios**. São Paulo: Atheneu. 2001.

LENZEN S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LERCO, M. M. *et al.* Caracterização de um modelo experimental de *diabetes mellitus*, induzido por Aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Bras.**, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

LIU, H. *et al.* World health organization world mental health survey collaborators. Association of DSM-IV posttraumatic stress disorder with traumatic experience type and history in the world health organization world mental health surveys. **JAMA Psychiatry**, v. 74, n. 3, p. 270-281, Mar. 2017.

LIZARBE, B. *et al.* High-fat diet consumption alters energy metabolism in the mouse hypothalamus. **Int J Obes.**, v. 43, n. 6, p. 1295-1304, 2019.

LÓPEZ-VALDÉS, H. E.; MARTÍNEZ-CORIA, H. The role of neuroinflammation in age-related dementias. **Rev Invest Clin.**, v. 68, n. 1, p. 40-48, 2016.

LOUVART, H. Effects of a single footshock followed by situational reminders on HPA axis and behaviour in the aversive context in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, n. 1, p. 92-99, Jan. 2006.

LOUVART, H. *et al.* Long-term behavioural alterations in female rats after a single intense footshock followed by situational reminders. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, p. 316–324, 2005.

LUCASSEN, P. J. *et al.* Neuropathology of stress. **Acta Neuropathol.**, v. 127, n. 1, p. 109-135, Jan. 2014.

MALTA, D. C. *et al.* Doenças crônicas não transmissíveis e a utilização de serviços de saúde: análise da pesquisa nacional de saúde no Brasil. **Rev Saude Publica**, v. 51, p. 1-4, 2017.

MANKOVSKY, B. N. *et al.* Cerebrovascular disorders in patients with diabetes mellitus. **J Diabetes Complications.**, v. 10, p. 228–242, 1996.

MANSCHOT, S. M. *et al.* Utrecht diabetic encephalopathy study group. Metabolic and vascular determinants of impaired cognitive performance and abnormalities on brain magnetic resonance imaging in patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, p. 2388–2397, 2007

- MARGIS, R. *et al.* Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **R. Psiquiatr.**, v. 25, n. 1, p. 65-74, abr. 2003.
- MARTIN LUTHER KING. Pensamentos. [S. l.: s. n.], 195-?. Disponível em: [http://pensador.uol.com.br/autor/martin\\_luther\\_king/2/](http://pensador.uol.com.br/autor/martin_luther_king/2/). Acesso em: 08 maio 2016.
- MCDONALD, C. A. Intranasal delivery of mesenchymal stromal cells protects against neonatal hypoxic-ischemic brain injury. **Int J Mol Sci.**, v. 17, n. 20 (10), p. E2449, May 2019.
- MCEWEN, B.S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1, n. 840, p. 33-44, May 1998.
- MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248-251. Jan. 2000.
- MCNEILL, J. H. **Experimental models of diabetes**. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999. 266p.
- MEEWISSE, M. L. *et al.* Cortisol and posttraumatic stress disorder in adults: systematic review and meta-analysis. **Br. J. Psychiatry**, v. 191, p. 387-392, 2007.
- MELLO, A. S.; QUINCOZES-SANTOS, A.; FUNCHAL, C. Correlação entre hiperglicemia e células do SNC, com enfoque na atividade glial. **Rev Neurocienc.**, v. 20, n. 2, p. 294-300, 2012.
- MESSMAN-MOORE, T. L.; WARD, R. M.; BROWN, A. L. Substance use and PTSD symptoms impact the likelihood of rape and revictimization in college women. **J Interpers Violence**, v. 24, n. 3, p. 499-521, Mar. 2009.
- MICHOPOULOS, V.; VESTER, A.; NEIGH, G. Posttraumatic stress disorder: a metabolic disorder in disguise? **Experimental Neurology**, v. 284, p. 220-229, Oct. 2016.
- MIKICS, E.; BARANYI, J.; HALLER J. Rats exposed to traumatic stress bury unfamiliar objects--a novel measure of hyper-vigilance in PTSD models? **Physiol Behav.**, v. 94, n. 3, p. 341-348, Jun. 2008.
- MILAD, Mohammed R. *et al.* Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. **Biological Psychology**, v. 73, n. 1, p. 61-71. July 2006.
- MOHEET, A., MANGIA, S., SEAQUIST, E. R. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1353, p. 60-71. Sep. 2015
- MORENA, M. *et al.* Enhancing endocannabinoid neurotransmission augments the efficacy of extinction training and ameliorates traumatic stress-induced behavioral alterations in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 6, p. 1284-1296, May 2018.
- MUÑOZ-ABELLÁN, C. *et al.* Marked dissociation between hypothalamic-pituitary-adrenal activation and long-term behavioral effects in rats exposed to immobilization or cat odor. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 8, p. 1139-1150, Sep. 2008.

- NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318. 2005.
- NOLDUS, L. P. J. J.; J. SPINK, A. J.; TEGELENBOSCH, R. A. J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods, Instruments and Computers**, v. 33, n. 3, p. 398-414, 2001.
- O'DONOVAN, A. *et al.* Elevated risk for autoimmune disorders in iraq and afghanistan veterans with posttraumatic stress disorder. **Biol Psychiatry**, v. 15, v. 77, n. 4, p. 365-374, Feb. 2015.
- OLIVEIRA, J. E. P.; MONTENEGRO JUNIOR, R. M.; VENCIO, S. (ORG). **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: Editora Clannad, 2017.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Brasil, Brasília, 2019. Acesso disponível em: <https://www.who.int/eportuguese/publications/pt/>. Acesso em: jun. 2019.
- ORLANDI, L. *et al.* Sickness behavior is accentuated in rats with metabolic disorders induced by a fructose diet. **J Neuroimmunol.**, v. 15, n. 289, p. 75-83, Dec. 2015.
- OTT, A. *et al.* Diabetes mellitus and the risk of dementia: the rotterdam study. **Neurol.**, v. 53, p. 1937-1942, 1999.
- PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr Rev.**, v. 22, n. 4, p. 502-548, Aug. 2001.
- PAPAPETROPOULOS, S. *et al.* The effect of depression on motor function and disease severity of Parkinson's disease. **Clin Neurol Neurosurg.**, v. 108, p. 465-469, 2006.
- PARSONS, R. G.; RESSLER, K. J. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. **Nat Neurosci.**, v.16, n. 2, p. 146-153, Feb. 2013.
- PATKI, G. *et al.* Moderate treadmill exercise rescues anxiety and depression-like behavior as well as memory impairment in a rat model of posttraumatic stress disorder. **Physiol Behav.**, v. 10, n. 130, p. 47-53, May 2014.
- PAWLYK, A. C. A rodent model of sleep disturbances in posttraumatic stress disorder: the role of context after fear conditioning. **Biol Psychiatry**, 2005.
- PECKETT, A. J.; WRIGHT, D. C.; RIDDELL, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metabolism**, v. 60, n. 11, p. 1500–1510, 2011.
- PEKNY, M. *et al.* Astrocytes: a central element in neurological diseases. **Acta Neuropathol.**, v. 131, n. 3, 323-345, Mar. 2016.
- PELLOW, S. *et al.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods.**, v. 14, n. 3, p. 149-167, Aug. 1985.

PHILBERT, J.; BELZUNG C.; GRIEBEL, G. Long-lasting memory abnormalities following exposure to the mouse defense test battery: an animal model of PTSD. **Physiol Behav.**, v.1; n. 146, p. 67-72, July 2015.

PITMAN, R. K. *et al.* Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nat Rev Neurosci.**, v. 13, p. 769–787, 2012.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales of Pharmacodynamie at of Therapie**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

PYNOOS, R. S.; STEINBERG, A. M.; GOENJIAN, A. Traumatic stress in childhood and adolescence: recent developments and current controversies. In: B. A. VAN DER KOLK, B. A.; MCFARLANE, A. C (Ed.), **Traumatic stress: the effects of overwhelming experience on mind, body, and society**. New York: Guilford Press. 1996. p. 331–358.

RAIVICH, G. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain Res Brain Res Rev.**, v. 30, n. 1, p. 77-105, July 1999.

RANSOM, B. R.; KETTENMANN, H. Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. **Glia**, v. 3, n. 4, p. 258-66, 1990.

RASMUSSEN, A.M. *et al.* Adaptation to extreme stress: post-traumatic stress disorder, neuropeptide Y and metabolic syndrome. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 235, n. 10, p. 1150-1162, 2010.

REAGAN, L. P. Diabetes as a chronic metabolic stressor: causes, consequences and clinical complications. **Exp Neurol.**, v. 233, p. 68-78, 2012.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association**, v. 22, p. 359–370, 2005.

REZNIKOV, R. *et al.* Towards a better preclinical model of PTSD: characterizing animals with weak extinction, maladaptive stress responses and low plasma corticosterone. **J Psychiatr Res.**, v. 61, p. 158-165, Feb. 2015.

RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C. A. M.; MELLO, M. A. R. Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos. **Motriz**, v. 13, n. 1, p. 72-77, 2007.

RICHARD, J.; ROBERT, M. Fructose, exercise, and health. **Curr Sports Med Rep.**, v. 9, p. 253-258, 2010.

RODNIGHT, R. *et al.* Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. **Braz J Med Biol.**, v. 30, n. 3, Mar. 1997.

RODRIGUES, A. **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005. 628 p.

- RODRIGUES, A. L. *et al.* Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 109-117, 2011.
- ROGLANS, N. *et al.* Impairment of Hepatic Stat-3 Activation and Reduction of PPAR $\alpha$  Activity in Fructose-Fed Rats. **Hepatology**, v. 45, p. 778-788, 2007.
- ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J. L. Memory modulation. **Behav Neurosci.**, v. 125, n. 6, p. 797-824, Dec. 2011.
- ROSENBAUM, S. *et al.* The prevalence and risk of metabolic syndrome and its components among people with posttraumatic stress disorder: a systematic review and meta-analysis. **Metabolism**, v. 64, p. 926-933, 2015.
- SAKELLARIOU, M. O.; STEFANATO, A. Neurobiology of PTSD and implications for treatment: An overview. **Curr Res Integr Med.**, v. 2, n. 1, p. 50-53, 2017.
- SARAVIA, F. E. *et al.* Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice. **Brain Res.**, v. 957, p. 345-353, 2002.
- SAUR, L. *et al.* Experimental post-traumatic stress disorder decreases astrocyte density and changes astrocytic polarity in the CA1 hippocampus of male rats. **Neurochem Res.**, v. 41, n. 4, p. 892-904, Nov. 2017.
- SCHNURR, P. P. *et al.* Predictors and outcomes of posttraumatic stress disorder in World War II veterans exposed to mustard gas. **J Consult Clin Psychol.**, v. 68, n. 2, p. 258-68, Apr. 2000.
- SCHÖNER, J. *et al.* Post-traumatic stress disorder and beyond: an overview of rodent stress models. **J Cell Mol Med.**, v. 21, n. 10, p. 2248-2256, Oct. 2017.
- SCOTT, K. M. *et al.* Obesity and mental disorders in the general population: Results from the world mental health surveys. **Int J Obes.**, v. 32, n. 1, p. 192-200, 2008.
- SEROVA, L. I. *et al.* Single intranasal neuropeptide Y infusion attenuates development of PTSD-like symptoms to traumatic stress in rats. **Neuroscience**, v. 16, n. 236, p. 298-312, Apr. 2013.
- SHARMA, A. N. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. **Physiol Behav.**, v. 101, n. 3, p. 381-388, Oct. 2010.
- SIANG YONG TAN, M. D.; AYIP, M. S. Hans Selye (1907–1982): Founder of the stress theory. **Singapore Med J.**, v. 59, n. 4, p. 170–171, Apr. 2018.
- SIL, R.; RAY, D.; CHAKRABORTI, A.S. Glycyrrhizin ameliorates metabolic syndrome-induced liver damage in experimental rat model. **Mol Cell Biochem.**, v. 409, n. 1-2, p. 177-189, 2015.



SIOPI, E. *et al.* Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: **The effect of minocycline. Neuroscience Letters**, v. 511, n. 2, p. 110-115, 2012.

SILVA, V. D.; NOGUEIRA, R. M. B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 36, n. 1, p. 9-15, 2015.

SMITH, K. L. *et al.* Microglial cell hyper-ramification and neuronal dendritic spine loss in the hippocampus and medial prefrontal cortex in a mouse model of PTSD. **Brain Behav Immun.**, v. 80, p. 889-899, Aug. 2019.

SOFRONIEW, M. V; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol.**, v. 119, n. 1, p. 7-35, Jan. 2010.

SON, S. M. *et al.* Statins induce insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes via an autophagy-based unconventional secretory pathway. **Mol Neurodegener.**, v. 31, n. 10, p. 56, Oct. 2015.

SONNAY, S. *et al.* Compartmentalised energy metabolism supporting glutamatergic neurotransmission in response to increased activity in the rat cerebral cortex: a <sup>13</sup>C MRS study in vivo at 14.1 T. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 36, p. 928–940, 2016.

SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 125, p. 451-472, 2007.

SRINIVASAN, K. *et al.* Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 313–320, 2005.

STANHOPE, K.L. *et al.* Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increase visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **J. Clin. Invest.**, v. 119, p. 1322–1334, 2009.

STANHOPE, K.L.; HAVEL, P.J. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. **J. Nutr.**, v. 139, p. 1236S-1241S, 2009.

STECULORUM, S. M. *et al.* Hypothalamic UDP increases in obesity and promotes feeding via P2Y6-dependent activation of AgRP neurons. **Cell**, v. 162, n.6, p. 1404-17, Sep. 2015.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res.**, v. 50, n. 6, p. 536-546, 2001.

SZKUDELSKI, T.; KANDULSKA, K.; OKULICZ, M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. **Physiol Res.**, v. 47, n. 5, p. 343-346, 1998.

THALER, J. P. *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **J Clin Invest.**, v. 122, n. 1, p. 153-162, Feb. 2012.

- TIEHUIS, A. M. *et al.* Study Group. Diabetes increases atrophy and vascular lesions on brain MRI patients with symptomatic arterial disease. **Stroke**, v. 39, p. 1600-1603, 2008.
- TRAN, L. T.; YUEN, V. G.; MCNEIL, J. H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. **Mol Cell Biochem.**, v. 332, p. 145-159, 2009.
- TREZZA, V; CAMPOLONGO, P. The endocannabinoid system as a possible target to treat both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, p. 1-5, Aug. 2013.
- TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P. J. Metabolic coupling between glia and neurons. **J Neurosci.**, v. 16, p. 877-885, 1996.
- TYNAN, R.J. *et al.* Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. **Brain Behav. Immun.**, v. 24, n. 7, p. 1058-1068, 2010.
- ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci.**, v. 10, n. 6, p. 397-409, June 2009.
- VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology**, v. 83, p. 103-111, 1970.
- VANITALLIE, T. B. Stress: a risk factor for serious illness. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 51, n. 1, p. 40-45, 2002.
- VERKHRATSKY, A, NEDERGAARD M. Physiology of astroglia. **Physiol Rev.**, v. 98, n. 1, p. 239-389, Jan. 2018.
- VETERE, G. *et al.* Memory formation in the absence of experience. **Nat Neurosci.**, v. 22, n. 6, p. 933-940, June 2019.
- VIEWEG, W. V. *et al.* Posttraumatic stress disorder in male military veterans with comorbid overweight and obesity: psychotropic, antihypertensive, and metabolic medications. **Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2006.
- VIEWEG, W.V. *et al.* Posttraumatic stress disorder as a risk factor for obesity among male military veterans. **Acta Psychiatr. Scand.**, v. 116, n. 6, p. 483-487, 2007.
- VILELA, F.C.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **J Ethnopharmacol.**, v. 124, n. 2, p. 325-327, 2009.
- VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat Rev Neurosci.**, v. 6, n. 8, p. 626-640, Aug. 2005.

WHITAKER, A. M.; GILPIN, N. W.; EDWARDS, S. Animal models of post-traumatic stress disorder and recent neurobiological insights. **Behav Pharmacol.**, v. 25, n. 5 (6), p. 398-409, Sep. 2014

WHITING, S. *et al.* Insulin-dependent diabetes mellitus presenting in children as frequent, medically unresponsive, partial seizures. **J Child Neurol.**, v. 12, p. 178–180, 1997.

WILGENFELD, K. *et al.* Effect of current and lifetime posttraumatic stress disorder on 24-hour urinary catecholamines and cortisol: results from the mind your heart study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 81-92, Feb. 2016.

WOLF, E. J. *et al.* The Dissociative Subtype of PTSD Scale: Initial Evaluation in a National Sample of Trauma-Exposed Veterans. **Assessment.**, v. 24, n. 4, p. 503-516, June 2017.

XIE, K.; KUANG, H.; TSIEN, J. Z. Mild blast events alter anxiety, memory, and neural activity patterns in the anterior cingulate cortex. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64907, May. 2013.

YEHUDA, R. Neuroendocrine aspects of PTSD. **Handb. Exp. Pharmacol.** p. 371- 403, 2005.

YOSHII, T. *et al.* Brain atrophy in the visual cortex and thalamus induced by severe stress in animal model. **Scientific Reports**, v. 7, n. 12731, 2017.

ZANOELLO, A. M. *et al.* Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra *diabetes mellitus* induzido por aloxana em ratos. **Acta Farm Bonaer.**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2002.

ZHANG, J. C. *et al.* Keap1-Nrf2 signaling pathway confers resilience versus susceptibility to inescapable electric stress. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.**, Nov. 2017.

ZHANG, S. *et al.* Correlative and quantitative 1H NMR-based metabolomics reveals specific metabolic pathway disturbances in diabetic rats. **Analytical Biochemistry**, v. 383, p.76–84. 2008.

ZHANG, Y. *et al.* Astrocytic process plasticity and IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B in central control of blood glucose, blood pressure and body weight. **Cell Metab.**, v. 25, n. 5, p. 1091-1102, May 2017.

ZONTA, M. *et al.* Neuron to astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. **Nat Neurosci.**, v. 6, p. 43–50, 2003.

ZUNG, A. *et al.* Israel IDDM registry study group, increase in the incidence of type 1 diabetes in Israeli children following the second lebanon war, **Pediatr Diabetes**, v. 13, p. 326-333, 2012.

## APÊNDICE A

Behavioural Brain Research 384 (2020) 112557



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)

Research report

## Metabolic syndrome accentuates post-traumatic stress disorder-like symptoms and glial activation



Ana Cláudia Alves Freire Ribeiro, Tatiane Helena Batista, Viviana Carolina Trujillo Rojas, Alexandre Giusti-Paiva, Fabiana Cardoso Vilela\*

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas (UnifalMG), Alfenas, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Fructose  
PTSD-like symptoms  
GFAP  
Iba-1

## ABSTRACT

The relationship between individuals with post-traumatic stress disorder (PTSD) and the development of metabolic syndrome (MS) is well understood, but the relationship between individuals with preexisting MS and the development of PTSD is not yet known. Therefore, we evaluated the course of PTSD development in preexisting MS rats and we quantified the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1) in the cortex and hippocampus of the experimental animals. Male Wistar rats were divided into two groups: control or 10 % fructose for 5 weeks. After 5 weeks of MS induction, a group of animals was used to characterize MS. In another group, after 5 weeks of MS induction, animals were exposed to or not exposed to inescapable footshocks, followed by social isolation. After 14 days of a retention interval, the animals were re-exposed to the inescapable footshocks box, and the freezing time was evaluated. Over the following days, the animals were tested using the open field, social interaction and forced swimming tests, respectively. In another group of animals, after induction of MS and PTSD as previously described, elevated plus maze and object recognition tests were performed. Our results demonstrate that fructose solution for 5 weeks was able to induce MS, and animals with MS had more pronounced PTSD-like symptoms and a greater increase in GFAP and Iba-1 in the hippocampus and prefrontal cortex. In conclusion, MS accentuated PTSD-like symptoms that may be related to increased glial activation. This study helps reveal factors that may predispose individuals to the development of PTSD, such as metabolic disorders.

## 1. Introduction

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a chronic psychiatric disorder triggered by a traumatic event [1], and it is characterized by exposure to an intense source of stress, re-experience of the trauma, avoidance of trauma-related stimuli, negative alterations in cognitions and mood, alterations in arousal and reactivity, and functional impairments in various domains such as the social and occupational realms [2].

Evidence from epidemiological studies demonstrates that PTSD in military veterans has led to the development of overweightness and obesity [3–5]. Overweightness and obesity are risk factors present in metabolic syndrome (MS), in addition to elevated triglycerides and hyperglycemia, among others. In fact, MS and its constituent components are highly prevalent among individuals identified as having PTSD, who are almost twice as likely to have MS [6].

Therefore, the relationship between individuals with PTSD and the

development of MS is well understood, but the relationship between individuals with preexisting MS and the development of PTSD is not yet known. Furthermore, it should be considered that the prevalence rate of MS is high, and it is a noticeable cause for stroke, coronary heart disease, and cardiovascular disease [7]. In addition, the risk of developing MS is increased in a range of psychiatric patients. This increased risk is due to a combination of pathways acting synergistically and having a negative effect on the course of psychiatric diseases [8].

Thus, our aim was to evaluate the course of PTSD development in preexisting MS rats. In addition, in order to explain the neurobiological pathways that link exposure to adversity to the development of psychiatric disorders associated with preexisting MS, we quantified the glial fibrillary acidic protein (GFAP, astrocyte-specific biomarker) and the ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1, microglial-specific biomarker) in the cortex and hippocampus of the experimental animals. This is because reported changes in GFAP expression related to psychiatric disorders, including depression, stress, and anxiety, have

\* Corresponding author at: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Avenida Jovino Fernandes Sales 2600, 37130-000, MG, Brazil.

E-mail address: [facvilela@gmail.com](mailto:facvilela@gmail.com) (F. Cardoso Vilela).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112557>

Received 13 November 2019; Received in revised form 29 January 2020; Accepted 11 February 2020

Available online 20 February 2020

0166-4328/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.