



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DARCY RIBEIRO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

WEMBLEY RODRIGUES VILELA

**DISFUNÇÃO METABÓLICA CENTRAL E PERIFÉRICA ASSOCIADA AO  
DIABETES MELLITUS: Impacto sobre a cognição e função mitocondrial**

BRASÍLIA  
AGOSTO DE 2020

Wembley Rodrigues Vilela

**DISFUNÇÃO METABÓLICA CENTRAL E PERIFÉRICA ASSOCIADA AO  
DIABETES MELLITUS: Impacto sobre a cognição e função mitocondrial**

Dissertação de mestrado apresentado à Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia Molecular

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andreza Fabro de Bem

Coorientadores: Prof. Dr. Jair Trapé Goulart

Prof<sup>ª</sup>. Kelly Grace Magalhães

Brasília

Agosto de 2020

RV699d Rodrigues Vilela, Wembley  
DISFUNÇÃO METABÓLICA CENTRAL E PERIFÉRICA ASSOCIADA AO  
DIABETES MELLITUS: Impacto sobre a cognição e função  
mitocondrial / Wembley Rodrigues Vilela; orientador Andreza  
Fabro de Bem; co-orientador Jair Trapé Goulart. -- Brasília,  
2020.  
85 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Patologia Molecular)  
- Universidade de Brasília, 2020.

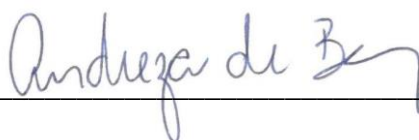
1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Função Mitocondrial. 3.  
Alterações Metabólicas. 4. Hipocampo. 5. Tecido Adiposo  
Marrom. I. Fabro de Bem, Andreza, orient. II. Trapé  
Goulart, Jair, co-orient. III. Título.

Wembley Rodrigues Vilela

**DISFUNÇÃO METABÓLICA CENTRAL E PERIFÉRICA ASSOCIADA AO  
DIABETES MELLITUS: impacto sobre a cognição e função mitocondrial**

Dissertação de mestrado apresentado à  
Faculdade de Medicina da Universidade de  
Brasília como requisito parcial para a obtenção  
do título de mestre em Patologia Molecular

Data de Aprovação: 27/08/2020



---

Dr<sup>a</sup>. Andreza Fabro de Bem – Orientadora

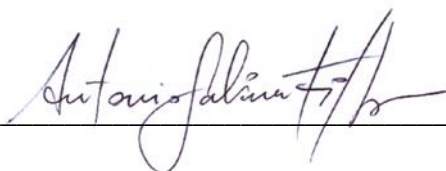
Professora Associada do Departamento de Ciências Fisiológicas, IB, Universidade de Brasília



---

Dr. Luiz Osório Silveira Leiria – Membro Titular

Professor Associado do Departamento de Farmacologia, FMRP, Universidade de São Paulo



---

Dr. Antonio Galina Filho – Membro Titular

Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica Médica, CCS-ICB, Universidade Federal  
do Rio de Janeiro



---

Dr<sup>a</sup>. Márcia Renata Mortari – Membro Suplente

Professora Associada do Departamento de Ciências Fisiológicas, IB, Universidade de  
Brasília

*Dedico este trabalho aos meus pais, que  
sempre me apoiaram e acreditaram em mim.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à Deus, que me proporcionou saúde e vitalidade para cursar mais esta etapa de minha vida!

À minha família, especialmente aos meus pais Marilene e Welton, que sempre me apoiaram e acreditaram incondicionalmente em mim, me dando todo o suporte financeiro e emocional necessário para chegar tão longe! ❤️

Aos meus professores Andreza, Jair e Kelly, pela imensa paciência e ensinamentos ao longo deste 2 anos, que possibilitaram a realização deste trabalho e foram imprescindíveis no meu crescimento profissional.

À professora Marcia Mortari, por ceder o espaço utilizado nas avaliações comportamentais e auxílio no aperfeiçoamento das técnicas

Ao professor Emiliano Medei, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelas discussões e suporte na implementação do modelo experimental

À todos os colaboradores e amigos, em especial meus colegas de laboratório Victor, Paula, Louise, Bruna e Keila, que estavam comigo nos momentos de alegria e de desespero, e que também foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À todos os funcionários da Universidade de Brasília, que direta ou indiretamente proporcionaram um ambiente propício para a realização desta pesquisa.

À CAPES, CNPQ e FAPDF, pelo apoio financeiro.

*O que você faz com amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença, tanto para você como para a vida de outras pessoas. Tudo o que se faz sem amor e sem convicção é fadado ao fracasso e à perda de tempo, para você e para os outros” (Wim Wenders).*

## RESUMO

A ingestão de dietas hiperlipídicas (DH) tem sido associada à disfunção metabólica e doenças crônicas que impactam a qualidade de vida do indivíduo. Caracterizado por uma resistência à insulina que pode levar a uma falência pancreática e posterior deficiência na secreção de insulina, o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tem como consequência a elevação da concentração de glicose plasmática, a qual compromete diversos tecidos. Além do pâncreas, tecidos relacionados ao metabolismo energético são altamente comprometidos pelo DM2, incluindo o cérebro, tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue*, BAT), fígado e coração. Este estudo teve como principal objetivo avaliar o efeito do DM2 sobre parâmetros metabólicos, comportamentais, energéticos e celulares em camundongos C57BL/6. Os animais jovens de 3 semanas de idade (21 dias) foram submetidos à uma dieta normolipídica ou DH por 7 semanas. Nos dias 35 e 36 (5ª semana) de vida, os animais receberam duas doses de estreptozotocina (STZ) 40mg/kg via i.p. Na 9ª semana de vida os animais foram submetidos à testes comportamentais a fim de avaliar a locomoção, memórias de reconhecimento e espacial e o comportamento tipo depressivo. Na semana seguinte foi feito o teste de tolerância à glicose (TTG), seguido da avaliação mitocondrial pela respirometria de alta resolução e coleta do sangue para a caracterização do perfil lipídico. Paralelamente, um grupo de animais foi perfundido intracardialmente para análises histológicas de marcadores celulares (GFAP e NeuN). A exposição precoce dos animais à DH associada a STZ induziu um modelo de DM2 em camundongos jovens, sendo observado um comprometimento do metabolismo de glicose, sem alterações no peso corpóreo e no perfil lipídico. Os camundongos DM2 apresentaram comprometimento das memórias de reconhecimento e espacial, sem apresentarem comportamento tipo depressivo. Essas alterações fenotípicas são reflexo de alterações celulares encontradas no hipocampo dos animais DM2, que apresentaram astrócitos reativos e menor população neuronal. Além disso, o modelo de DM2 provocou comprometimento mitocondrial no hipocampo de camundongos jovens, caracterizado pelo menor consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>) relacionado à produção de ATP e menor capacidade respiratória de reserva, sem alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ). Alterações no consumo de O<sub>2</sub> também foram encontrados no BAT e fígado de camundongos DM2 jovens, sendo que no BAT os animais DM2 apresentaram menor consumo de O<sub>2</sub> e maior taxa respiratória quando a atividade da proteína desacopladora 1 está inibida, indicando uma menor capacidade termogênica. Ademais, os animais DM2 apresentaram uma capacidade respiratória de reserva que é nula em camundongos controle.



No fígado de camundongos DM2 jovens, menor consumo de O<sub>2</sub> utilizando piruvato e malato como substratos foram evidentes nos estados respiratórios 2 e 4, sem alterações no  $\Delta\psi$ . Não houve alteração na função mitocondrial cardíaca de camundongos DM2 jovens. Esses dados sugerem que características do DM2 afetam a fisiologia de diversos tecidos, e que a função mitocondrial é fortemente comprometida juntamente com o aparecimento das características do DM2. Acredita-se que a disfunção metabólica periférica evidenciada neste estudo esteja diretamente relacionada com as alterações celulares, metabólicas e cognitivas encontradas no sistema nervoso central.

**Palavras-chave:** Diabetes mellitus tipo 2. Dieta hiperlipídica. Hipocampo. Tecido adiposo marrom. Fígado. Disfunção cognitiva. Função mitocondrial. Alterações metabólicas. Estreptozotocina.

## ABSTRACT

High-fat diet (HFD) intake has been associated with metabolic dysfunction and chronic diseases that influence the individual's quality of life. Characterized by insulin resistance, which further may lead to pancreatic failure and deficiency in insulin secretion, type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic disease that features chronic hyperglycemia, compromising several tissues. In addition to pancreas, tissues related to energy metabolism are highly compromised by T2DM, including the brain, brown adipose tissue (BAT), liver and heart. This study aimed to evaluate the effect of T2DM on metabolic, behavioral, energetic and cellular parameters in C57BL/6 mice. Aging 3 weeks, young animals were submitted to a normolipidic or HFD for 7 weeks. On days 35 and 36 (5th week) of life, the animals received two doses of streptozotocin (STZ) 40mg/kg via i.p. In the 9th week of life, the animals were submitted to behavioral tests in order to assess locomotion, recognition and spatial memories, and depressive-like behavior. In the following week, glucose tolerance test (GTT) was performed, followed by mitochondrial evaluation using high resolution respirometry and blood collection for the characterization of the lipid profile. In parallel, a group of animals was perfused intracardially for histological analysis of cellular markers (GFAP and NeuN). The animals' early exposure to HFD associated with STZ induced a model of T2DM in young mice, featuring impaired glucose metabolism, with no changes in body weight and lipid profile. T2DM model mice showed impaired recognition and spatial memories, without showing depressive-like behavior. These phenotypic changes are reflection of cellular changes found in the hippocampus of T2DM mice, which showed reactive astrocytes and smaller neuronal population. In addition, T2DM model caused mitochondrial impairment in the hippocampus of young mice, characterized by lower oxygen (O<sub>2</sub>) consumption related to ATP production and lower respiratory reserve capacity, without changes in the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi$ ). Changes in O<sub>2</sub> consumption were also found on BAT and liver of T2DM mice. On BAT, T2DM animals presented lower O<sub>2</sub> consumption and a higher respiratory rate when the activity of uncoupling protein 1 is inhibited, indicating a diminished thermogenic capacity. Furthermore, T2DM animals showed a reserve respiratory capacity that is null in control mice. In the liver of T2DM mice, lower oxygen consumption using pyruvate and malate as substrates was evident on respiratory states 2 and 4, with no changes in  $\Delta\psi$ . There was no changes on cardiac mitochondrial function in young T2DM mice. These data suggest that T2DM affects the physiology of several tissues, and mitochondrial function is strongly compromised together with the beginning of T2DM

characteristics. It is believed that the peripheral metabolic dysfunction shown in this study is directly associated to the cellular, metabolic and cognitive changes that are observed in the central nervous system.

**Keywords:** Type 2 diabetes mellitus. Hyperlipidic diet. Hippocampus. Brown adipose tissue. Liver. Cognitive dysfunction. Mitochondrial function. Metabolic changes. Streptozotocin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais estruturas do sistema límbico humano e de roedores.....	23
Figura 2. Constituintes celulares da barreira hematoencefálica.....	26
Figura 3. A mitocôndria e o processo energético.....	28
Figura 4. Esquema do desenho experimental.....	35
Figura 5. Exposição precoce à DH + STZ induz um modelo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) em camundongos.....	44
Figura 6. Efeito do modelo de DM2 em análises comportamentais.....	46
Figura 7. Efeito do modelo de DM2 no consumo de O <sub>2</sub> do hipocampo.....	49
Figura 8. Efeito do modelo de DM2 nas populações celulares hipocampais.....	51
Figura 9. Efeito do modelo de DM2 no consumo de O <sub>2</sub> do tecido adiposo marrom.....	53
Figura 10. Efeito do modelo de DM2 no consumo de O <sub>2</sub> de mitocôndrias isoladas do fígado.....	54
Figura 11. Efeito do modelo de DM2 no consumo de O <sub>2</sub> de mitocôndrias isoladas do coração.....	56

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Formulação de nutrientes das dietas padrão (DC) e hiperlipídica (DH).....	34
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\Delta\psi$	Potencial de membrana mitocondrial
$\Delta F$	Varição da fluorescência
AA	Antimicina A
ADP	Adenosina di-fosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
BAT	Tecido adiposo marrom
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Albumina bovina sérica
CA	Região hipocámpal do Corno de amon
$Ca^{2+}$	Íon cálcio
CCCP	Cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
CTRL	Grupo controle
DAB	3, 3 –diaminobenzidina
DC	Dieta controle
DH	Dieta hiperlipídica
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGTA	Ácido tetraacético Trietileno diamina glicol
EIM	Espaço inter-membrana
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F	Fluorescência máxima obtida após adição de CCCP
FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleotídeo
FGF21	Fator de crescimento de fibroblasto 21
GD	Giro denteado
GDP	Guanosina di fosfato
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLUT	Transportador de glicose
GSH	Glutathione reduzida
Hepes	(4-(2-hidroxietil)-1- ácido piperazinoetanosulfônico)

HRP/DAB	3, 3 –diaminobenzidina conjugado com a peroxidase de rábano
ID	Índice de discriminação
IL	Índice de localização
KCl	Cloreto de potássio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio dibásico
LPS	Lipopolissacarídeo
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MR	Meio de reação
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF	Nado forçado
NR	Objeto não-realocado
OA	Objeto antigo
OMY	Oligomicina
ON	Objeto novo
PBS	Tampão fosfato salina
PM	Piruvato e malato
R	Objeto realocado
RAR	Respirometria de alta resolução
ROT	Rotenona
RNA	Ácido ribonucleico
S	Succinato
SNC	Sistema nervoso central
STZ	Estreptozotocina
TBS	Tampão tris salina
TBST	Tampão tris salina e triton
TCA	Teste do campo aberto
TI	Tampão de isolamento
TLR4	Receptor do tipo toll 4
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRLO	Teste de realocação do objeto
TRNO	Teste de reconhecimento ao novo objeto
TTG	Teste de tolerância à glicose
UCP	Proteína desacopladora

WAT      Tecido adiposo branco



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
1.1	Desregulação metabólica induzida por dietas ricas em gordura	18
1.2	Diabetes mellitus tipo 2	20
1.3	Desfechos metabólicos periféricos decorrentes da ingestão da DH e do DM2	20
1.3.1	Alterações cardíacas	20
1.3.2	Alterações hepáticas	21
1.3.3	Alterações no tecido adiposo	21
1.4	Efeitos da DH e do DM2 sobre o SNC	22
1.4.1	Papel do hipocampo na modulação da função cerebral	22
1.4.2	Alterações no SNC decorrentes do DM2 e da DH	24
1.5	Mecanismos subjacentes às alterações comportamentais associados ao DM2 e à DH	25
1.5.1	Metabolismo de glicose e alterações comportamentais	25
1.5.2	Inflamação	25
1.5.3	Participação da mitocôndria nas alterações cerebrais desencadeados pela ingestão de DH e DM2	27
1.6	Efeito do consumo de DH na infância e a adolescência	29
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos Específicos	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	33
4.1	Animais e desenho experimental	33
4.2	Avaliações comportamentais	36
4.2.1	Teste do Campo aberto (TCA)	36
4.2.2	Teste de reconhecimento ao novo objeto (TRNO)	36

4.2.3	<i>Teste de realocação do objeto (TRLO)</i> .....	36
4.2.4	<i>Teste do nado forçado (NF)</i> .....	37
<b>4.3</b>	<b>Análise do perfil glicêmico e lipídico</b> .....	<b>37</b>
4.3.1	<i>Teste de tolerância à glicose</i> .....	37
4.3.2	<i>Níveis de colesterol e triglicérides totais</i> .....	38
<b>4.4</b>	<b>Respirometria de alta resolução</b> .....	<b>38</b>
4.4.1	<i>Respirometria do hipocampo</i> .....	38
4.4.2	<i>Respirometria do tecido adiposo marrom (BAT)</i> .....	39
4.4.3	<i>Respirometria do fígado e coração</i> .....	39
4.4.4	<i>Potencial de membrana mitocondrial</i> .....	39
<b>4.5</b>	<b>Imunohistoquímica: marcação com GFAP e NeuN</b> .....	<b>40</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>A exposição precoce à DH + STZ induziu um modelo de diabetes mellitus tipo 2 em camundongos.</b> .....	<b>42</b>
<b>5.2</b>	<b>Memória dependente do hipocampo está prejudicada quando o DM2 é induzido na juventude.</b> .....	<b>43</b>
<b>5.3</b>	<b>O DM2 induzido no início da vida causou disfunção mitocondrial e alteração nas populações celulares no hipocampo.</b> .....	<b>45</b>
<b>5.4</b>	<b>Função mitocondrial do BAT e fígado são prejudicadas em camundongos DM2 induzido no início da vida</b> .....	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>6.1</b>	<b>Alterações causadas pelo modelo de DM2 no SNC</b> .....	<b>58</b>
<b>6.2</b>	<b>Alterações causadas pelo modelo de DM2 em tecidos periféricos</b> .....	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade mundial triplicou nos últimos 45 anos. De uma população de aproximadamente 7 bilhões de pessoas, cerca de 1,9 bilhão está com sobrepeso e 650 milhões estão obesos. Além disso, esse excesso de peso está presente também no início da vida, sendo que 38 milhões de crianças abaixo dos 5 anos e 340 milhões de crianças e adolescentes (5 a 19 anos) estão com sobrepeso ou obesas (SAÚDE, 2020). Sobrepeso e obesidade são definidos pelo excesso ou acúmulo anormal de gordura no tecido adiposo branco, que predispõe o indivíduo a uma série de comorbidades como doenças cardiovasculares, diabetes, risco aumentado de câncer e doenças neurodegenerativas (HARGRAVE et al., 2016; JOKINEN, 2015; SAÚDE, 2020). A causa fundamental da obesidade é o desbalanço energético entre a quantidade de calorias ingeridas e as calorias gastas nos processos metabólicos do corpo. Mundialmente, estamos sendo desafiados com a facilidade de acesso a alimentos altamente calóricos, com baixo valor nutricional e contendo grande quantidade de açúcares e gorduras. Por outro lado, observamos um crescente aumento do sedentarismo dos indivíduos em todas as faixas etárias, incluindo crianças e adolescentes (SAÚDE, 2020).

### 1.1 Desregulação metabólica induzida por dietas ricas em gordura

Sabe-se que o consumo prolongado de açúcares simples e gorduras saturadas induz obesidade e sobrepeso. A dieta hiperlipídica (DH), com elevado consumo de gorduras saturadas e de origem animal induz o sobrepeso e obesidade, afetando o organismo como um todo. Dentre as consequências negativas induzidas pela ingestão de DH, destaca-se a inflamação sistêmica crônica, mediada pela desregulação metabólica e inflamatória do tecido adiposo branco (*white adipose tissue*, WAT), com aumento de produção de adipocinas pró-inflamatórias, proliferação de macrófagos inflamatórios do perfil M1 e hipóxia tecidual (CORREA; HEYN; MAGALHAES, 2019). Também ocorre a resistência à leptina e à insulina, ambos hormônios intimamente ligados com o controle do metabolismo energético e saciedade (CORREA et al., 2019; HALEEM; MAHMOOD, 2019; SOLIMAN; YASIN; KASSEM, 2012)..

A leptina é um hormônio liberado pelo WAT, que atua no sistema nervoso central (SNC), mais precisamente no hipotálamo, com função de sinalizar saciedade e estimular o gasto energético. Em indivíduos com sobrepeso e obesos, devido a uma maior quantidade de

WAT, a hiperleptinemia é frequente, juntamente com a resistência à leptina no SNC, exacerbando o descontrole energético no hipotálamo e estimulando a hiperfagia (CORREA et al., 2019; HALEEM; MAHMOOD, 2019; SOLIMAN et al., 2012).

A homeostase de glicose é mantida coordenadamente pela produção hepática e pela captação tecidual mediada pelos transportadores intracelulares GLUT (CZECH, 2017), cuja translocação para a membrana é dependente da ação da insulina na maioria das células. A insulina é um hormônio secretado pelas células  $\beta$ -pancreáticas, que atua em todos os tecidos do organismo. As ações da insulina se iniciam com a ligação da insulina em seu receptor, desencadeando uma cascata de sinalização que culmina no aumento do transporte e oxidação da glicose e na síntese de glicogênio (POSNER, 2017). Entretanto, uma elevada ingestão de gorduras e consequente elevação dos níveis de ácidos graxos livres na circulação pode acarretar um desbalanço na secreção e indução de resistência à insulina corporal (BODEN et al., 1994). Por outro lado, a redução dos níveis de ácidos graxos livres se correlaciona com a redução da resistência à insulina sistêmica em humanos (SANTOMAURO et al., 1999). Os mecanismos que medeiam a resistência à insulina, induzida por ácidos graxos livres, envolvem a inibição da síntese de glicogênio muscular, visto que o músculo esquelético capta boa parte da glicose sanguínea (cerca de 80%) (BODEN et al., 1994), aumento de gliconeogênese hepática (BODEN et al., 2002), menor oxidação de carboidratos (BODEN; CHEN, 1995) e menor expressão do transportador GLUT4, especialmente no músculo esquelético (MANNA; ACHARI; JAIN, 2017).

A ingestão de uma DH por camundongos causa hiperinsulinemia já na primeira semana, antes mesmo de ser notada a elevação da glicemia em jejum (TURNER et al., 2013; WAISE et al., 2015). O tecido adiposo configura-se como um órgão central na resistência à insulina periférica, exacerbada pela desregulação endócrina e liberação de ácidos graxos livres oriundos da ingestão de DH ou da disfunção adiposa na obesidade, podendo estimular diretamente as células  $\beta$ -pancreáticas a liberarem insulina em excesso, muito antes de serem notadas a resistência à insulina ou a hiperglicemia. A secreção de insulina dependente de glicose também é amplificada pela presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ácidos graxos de cadeia longa, presentes em grandes quantidades na supernutrição (CASTRO et al., 2014; CZECH, 2017). A tríade hiperinsulinemia, resistência à insulina e hiperglicemia crônica, induzidas pela DH, representa as principais alterações metabólicas que caracterizam o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (CZECH, 2017; ZHENG; ZHENG; ZHAO; et al., 2017).

## 1.2 Diabetes mellitus tipo 2

Como apresentado acima, uma das consequências da DH é o desenvolvimento do DM2. Segundo dados da OMS, cerca de 463 milhões de pessoas no mundo convivem com o diabetes, sendo que 90-95% dos casos são de DM2, acometendo 10% da população adulta (FEDERATION, 2020; SAÚDE, 2020). O DM2 é caracterizado pela deficiência na secreção e resistência à sinalização de insulina nos tecidos periféricos, resultando em uma hiperglicemia crônica, e está comumente associada com histórico familiar para a doença, obesidade e sedentarismo (DE LA MONTE; WANDS, 2008).

Complicações frequentes relacionadas ao diabetes são doenças cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico, doença renal crônica, retinopatia diabética e neuropatia periférica, com elevado risco de amputação dos membros inferiores (DESHPANDE; HARRIS-HAYES; SCHOOTMAN, 2008). Também são observados em pacientes diabéticos alterações hepáticas e adiposas, favorecendo o acúmulo de corpúsculos lipídicos nos hepatócitos (STEFAN; HARING; CUSI, 2019) e inflamação e acúmulo anormal de triglicerídeos no WAT, bem como maior inflamação com menor ação termogênica do tecido adiposo marrom (*brown adipose tissue*, BAT) (LEE, M. W.; LEE; OH, 2019). Além disso, indivíduos diabéticos apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de declínio cognitivo leve, demência e doença de Alzheimer (DE LA MONTE; WANDS, 2008).

## 1.3 Desfechos metabólicos periféricos decorrentes da ingestão da DH e do DM2

Conforme previamente descrito, a ingestão de DH induz obesidade e desregulação metabólica que desencadeia a hiperglicemia e resistência à insulina, características patofisiológicas do DM2 (TURNER et al., 2013). Modelos animais que manifestam as características do DM2 podem ser gerados a partir da exposição a uma DH (DUTHEIL et al., 2016). Tanto em humanos quanto em modelos animais, a DH leva a desregulação das funções de diversos órgãos periféricos, incluindo coração (COLE et al., 2011), fígado (ISHIMOTO et al., 2013), BAT (LEE, J. H. et al., 2020) e também no SNC (DUTHEIL et al., 2016).

### 1.3.1 Alterações cardíacas

Doenças cardiovasculares são a causa de mais de 65% das mortes em pessoas com DM2. A mortalidade devido às doenças cardíacas são 2 a 4 vezes maiores em pessoas diabéticas. As principais complicações do sistema cardiovascular relacionados ao diabetes são acidente

vascular encefálico, doença arterial coronariana e cardiomiopatia diabética, podendo evoluir para o infarto agudo do miocárdio (DESHPANDE et al., 2008), com hipertrofia do ventrículo esquerdo, resultando em disfunção contrátil, e conseqüentemente menor fluxo de oxigênio (O<sub>2</sub>) para todos os tecidos. Essa disfunção cardíaca está primordialmente ligada à hiperglicemia sustentada, resistência à insulina e distúrbios metabólicos como inflamação e hiperlipidemia (LEE, W. S.; KIM, 2017).

Alterações mitocondriais estão presentes na cardiomiopatia diabética, incluindo elevação de EROs, alteração no metabolismo de cálcio, produtos de glicação avançada e reduzida oxidação de ácidos graxos. Essas disfunções celulares, frequentes no DM2, exacerbam a inflamação local e disparam a cascata apoptótica, contribuindo para a morte de cardiomiócitos e eventual fibrose tecidual, comprometendo cada vez mais a função cardíaca (LEE, W. S.; KIM, 2017).

### *1.3.2 Alterações hepáticas*

Os fatores que desencadeiam o DM2 podem resultar em quadros de alterações hepáticas, incluindo a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), cirrose e câncer hepático. O DM2 promove aumento da lipogênese hepática, resultando em acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, podendo evoluir para a DHGNA a longo prazo. Diversos estudos evidenciam o papel de medicamentos hipoglicemiantes como uma forma de desacelerar a progressão e até mesmo reverter o dano tecidual hepático causado pelo DM2. Acredita-se que essa proteção mediada pelo medicamento seja devido à redução de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo (STEFAN et al., 2019; TANG et al., 2017), evidenciando estratégias de controle glicêmico e insulínico como promissores para o tratamento de DHGNA.

### *1.3.3 Alterações no tecido adiposo*

Estudos recentes mostram o papel do BAT na homeostase de glicose e na sensibilidade à insulina, desempenhando papel protetor contra o DM2 e a obesidade (CHONDRONIKOLA et al., 2014; STANFORD et al., 2013). O BAT e o WAT são tipos de tecidos adiposos de mamíferos. Enquanto o WAT estoca o excesso calórico na forma de triglicérides dentro de seus corpúsculos lipídicos, o BAT dissipa a energia contida em seus corpúsculos lipídicos para a produção de calor (termogênese) devido ao seu elevado número de mitocôndrias contendo a proteína desacopladora 1 (*uncoupling protein 1*, UCP-1) (LEE, M. W. et al.,

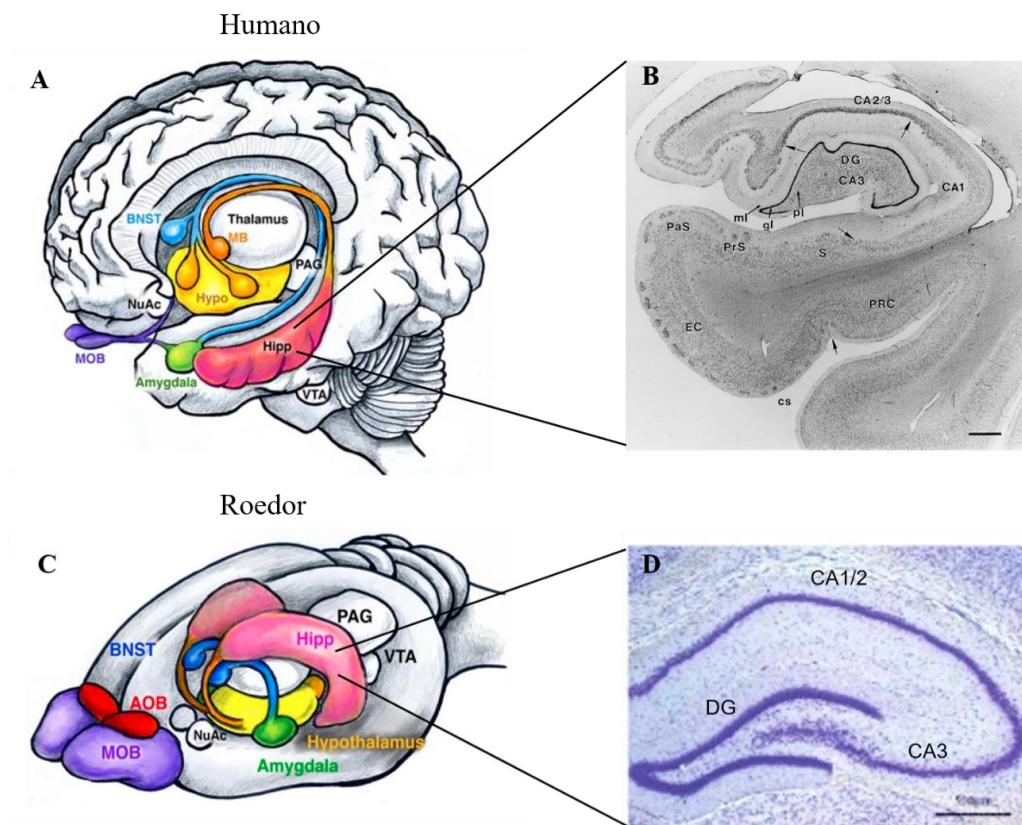
2019). Atuando como um órgão endócrino, o tecido adiposo secreta adipocinas, quimiocinas e hormônios que atuam de forma autócrina, parácrina e endócrina responsáveis pelo metabolismo de glicose e lipídeos, sinalização da insulina, termogênese e inflamação, podendo afetar órgãos metabólicos, como o cérebro, fígado, músculo e pâncreas (GE et al., 2011; GIRALT; GAVALDA-NAVARRO; VILLARROYA, 2015; LEE, M. W. et al., 2019).

#### **1.4 Efeitos da DH e do DM2 sobre o SNC**

O SNC é essencial na manutenção das funções vitais, obtenção, processamento e armazenamento de informações através do sistema sensorial e modulação do comportamento. O processamento e armazenamento de informações é um processo complexo que envolve sinapses entre neurônios provenientes de todas as regiões cerebrais (BIRD; BURGESS, 2008; SPORNS; TONONI; KOTTER, 2005).

##### *1.4.1 Papel do hipocampo na modulação da função cerebral*

Pertencente ao sistema límbico e localizado no lobo temporal medial, a formação hipocampal desempenha funções importantes no controle das emoções, aprendizado e consolidação de memórias de curto e longo prazo (MCDONALD; MOTT, 2017). A formação hipocampal é composta pelo giro denteado (GD) e as regiões do Corno de Ammon (CA) 1, CA2 e CA3, o complexo subicular e o córtex entorrinal, perirrinal e parahipocampal (SCHULTZ; ENGELHARDT, 2014), que fazem conexões diretas com regiões corticais e subcorticais, como o núcleo talâmico anterior, os corpos mamilares no hipotálamo, o núcleo séptico do córtex pré-frontal, córtex parahipocampal e a amígdala (Figura 1) (BIRD; BURGESS, 2008).



**Figura 1. Principais estruturas do sistema límbico humano e de roedores.** (A) cérebro humano e (C) de roedores, mostrando a amígdala (verde), núcleo leito da estria terminal (azul), hipotálamo (amarelo) e hipocampo (rosa). O hipocampo está ligado aos corpos mamilares (laranjado) através da fimbria-fórnix. Os estímulos olfatórios são recebidos pelos bulbos olfatórios (roxo). (B) Corte coronal da formação hipocampal humana do hemisfério direito do cérebro corado com tionina. As regiões CA1 e CA2/3 e o GD referem-se às regiões do hipocampo propriamente dito. ml- camada molecular do GD, gl- camada granular celular do GD, pl- camada polimórfica do GD, S- região subicular, PrS- região pré-subicular, PaS- região para subicular, EC- córtex entorrinal, cs – sulco colateral, PRC- córtex perirrinal. Barra da escala: 1mm. (D) Corte hipocampal de roedor corado com tionina, evidenciando as regiões CA1/2, CA3 e GD. Adaptado de (SOKOLOWSKI; CORBIN, 2012) sob licença Creative Commons Attribution Non Commercial 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), de MOTOLESE *et al.* (2015) sob licença Creative Commons Attribution 4.0 International (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) e de REMPEL-CLOWER *et al.* (1996) Copyright © 1996 Society for Neuroscience (<https://www.jneurosci.org/content/rights-permissions>).

Estudos em humanos indicam que interações hipocampo-amígdala são essenciais para o fortalecimento da memória declarativa (DOLCOS; LABAR; CABEZA, 2004; PHELPS, 2004), bem como avaliações post-mortem de pacientes com amnésia retrógrada e anterógrada indicaram lesões com perda de neurônios em diversas regiões do hipocampo e redução do volume hipocampal (REMPEL-CLOWER *et al.*, 1996; ZOLA-MORGAN; SQUIRE;



AMARAL, 1986). A perda de memória está positivamente correlacionada com a extensão da área hipocampal afetada (REMPEL-CLOWER et al., 1996) e pacientes com lesões hipocampais podem se recordar de eventos ocorridos anos antes do início do dano cerebral, o que indica que as memórias gradualmente vão se consolidando em outras partes do cérebro, como o neocortex, ressaltando a importância do hipocampo na formação de novas memórias (KNIERIM, 2015).

#### *1.4.2 Alterações no SNC decorrentes do DM2 e da DH.*

O DM2 e suas características patofisiológicas (resistência à insulina, intolerância à glicose e elevada glicemia em jejum) estão relacionados com alterações hipocampais, que se refletem na disfunção cognitiva e em comportamento tipo-depressivo em humanos e em roedores submetidos a DH (DUTHEIL et al., 2016; SIMON et al., 2008; YANG et al., 2019).

O índice de massa corporal está negativamente relacionado com o volume cerebral (WARD et al., 2005) e frequentemente a obesidade relaciona-se com alterações estruturais e funcionais cerebrais em todas as faixas etárias. Ainda na infância há piora da performance cognitiva associada à elevação nos níveis de gordura visceral e subcutânea (BAUER et al., 2015; DAVIS; COOPER, 2011; JANSEN et al., 2011) bem como o sobrepeso e/ou obesidade se correlacionam com redução da massa hipocampal (BAUER et al., 2015).

Alterações similares são vistas em modelos animais de diabetes, induzido por dietas com alta densidade energética. O desempenho em testes cognitivos, está relacionado com alterações morfológicas das células nervosas hipocampais, sendo presentes ativação de células da glia, redução da ramificação dendrítica e menor densidade de marcadores de plasticidade sináptica, progredindo para perda neuronal e diminuição da neurogênese (TREVINO et al., 2015; TREVINO et al., 2017; YANG et al., 2019). Além disso, estudos em um camundongos transgênicos (*db/db*) confirmam o dano cognitivo associado ao DM2 (ZHENG; ZHENG; WANG; et al., 2017; ZHENG; ZHENG; ZHAO; et al., 2017).

## **1.5 Mecanismos subjacentes às alterações comportamentais associados ao DM2 e à DH**

### *1.5.1 Metabolismo de glicose e alterações comportamentais*

Alterações no metabolismo de glicose causam disfunções não apenas em tecidos periféricos (NATH; GHOSH; CHOUDHURY, 2017), mas também no SNC (TREVINO et al., 2015). A neurotoxicidade induzida pela hiperglicemia é manifestada através de alterações na sinalização da insulina, aumento do fluxo dos polióis, com elevados níveis de produtos de glicação avançados, alteração nas proporções de enzimas anti-oxidantes (NADPH e GSH) entre seus estados oxidado/reduzido e aumento do fluxo da via das hexosaminas (GARCIA-SERRANO; DUARTE, 2020; SPAUWEN et al., 2015).

Por possuir uma alta demanda energética, o hipocampo é uma das estruturas cerebrais que possui maior densidade de receptores de insulina (GHASEMI et al., 2013). Indivíduos diabéticos e modelos animais submetidos à DH apresentam resistência à insulina neuronal com alterações na via de sinalização da insulina no cérebro (DUTHEIL et al., 2016; GHASEMI et al., 2013). O prejuízo na sinalização da insulina hipocampal e consequente comprometimento da sinaptogênese e da plasticidade sináptica desencadeiam mudanças fenotípicas como déficits cognitivos e comportamento tipo-depressivo em ratos (DUTHEIL et al., 2016; TREVINO et al., 2017). Por outro lado, o aumento na sensibilidade do receptor de insulina, provocado pelo hipoglicemiante metformina, reduziu o comportamento tipo ansioso em camundongos submetidos a alimentação com DH (JI; WANG; LI, 2019).

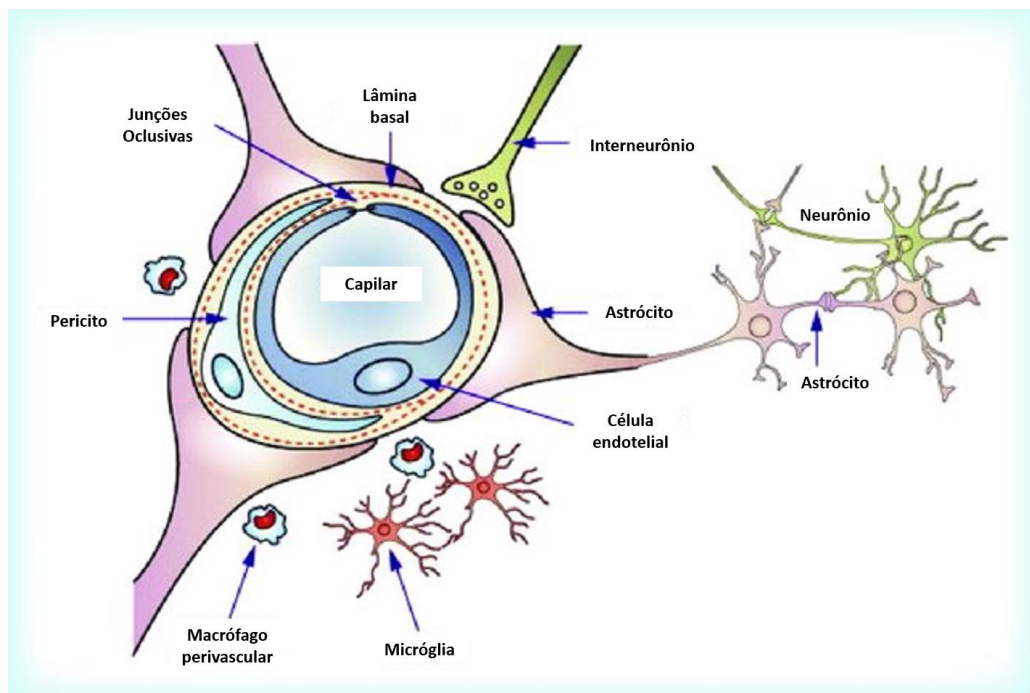
### *1.5.2 Inflamação*

A inflamação está presente em diversas doenças metabólicas e neurodegenerativas (CALVO-OCHOA et al., 2014; DE LA MONTE; WANDS, 2008; DUTHEIL et al., 2016). Marcadores inflamatórios como a interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e proteína C reativa se elevam pelo consumo de DH e em suas comorbidades associadas, como DM2 e obesidade, o que gera uma inflamação sistêmica de baixo grau, afetando todos os órgãos inclusive o SNC (WHITMER, 2007), e particularmente a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). (DAVIDSON et al., 2012).

A BHE compõe a unidade neurovascular que compreende as células endoteliais dos vasos sanguíneos, pericitos, membrana basal, e astrócitos. Os pés dos astrócitos envolvem o vaso

sanguíneo e se conectam diretamente com os neurônios, atuando em um sistema coordenado, conhecido como acoplamento neurovascular, que mantém a homeostase do SNC (DAVIDSON et al., 2012; ZLOKOVIC, 2008). Essa proximidade de diferentes células gliais com os neurônios permite uma eficiente regulação parácrina, essencial para o bom funcionamento do SNC. As células endoteliais são fortemente conectadas por junções oclusivas, que em situações fisiológicas impedem a passagem de células sanguíneas e moléculas lipofílicas maiores que 400 Daltons para o SNC, enquanto que as moléculas hidrofílicas e íons necessitam de um sistema de transporte para entrar ou sair do SNC (Figura 2) (ZLOKOVIC, 2008).

Em condições patológicas como na obesidade ou consumo de DH, a permeabilidade da BHE é alterada, com menor expressão das proteínas de junções oclusivas, o que está associado ao comprometimento da performance cognitiva (DAVIDSON et al., 2012; YAMAMOTO, M. et al., 2019). Curiosamente, no estudo de Davidson et al (2012), ratos obesos apresentaram déficit cognitivo com aumento da permeabilidade da BHE no hipocampo, sem apresentar aumento da permeabilidade no córtex pré-frontal e no estriado, regiões também envolvidas em processos cognitivos e coordenação de movimentos (DAVIDSON et al., 2012).



**Figura 2. Constituintes celulares da barreira hematoencefálica.** A barreira hematoencefálica é formada pelas células endoteliais conectadas por junções oclusivas, circundadas pela membrana basal, pericitos e pés terminais dos astrócitos perivasculars, os quais fazem conexão direta com os neurônios. Micróglia e macrófagos

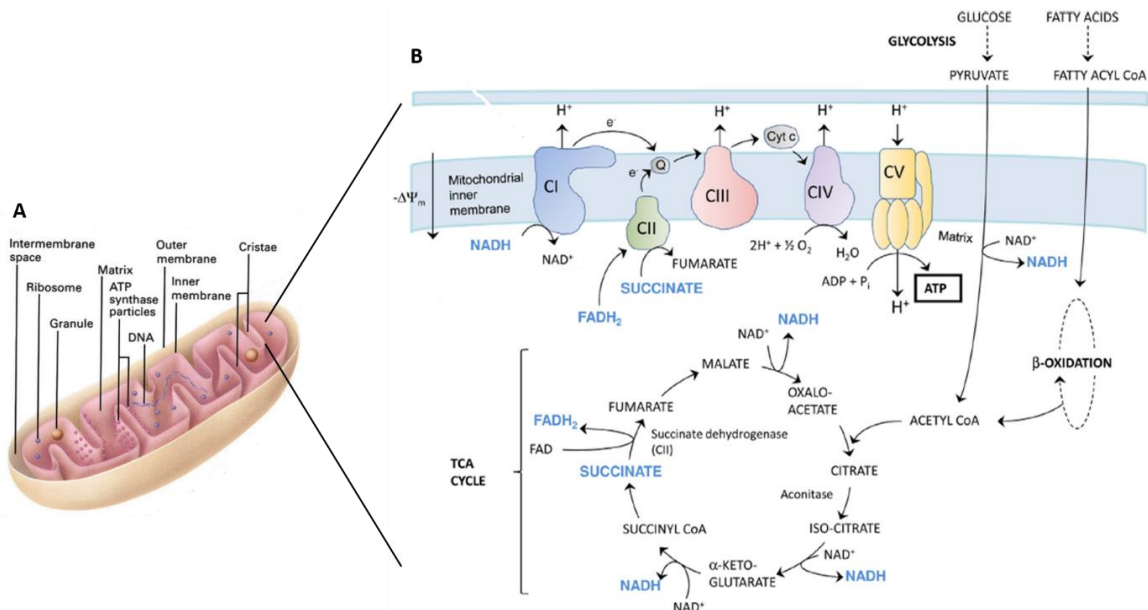
perivasculares estão proximamente ligados, formando componentes importantes da unidade neurovascular. Retirado de (PULLAGURLA et al., 2015). Copyright© Future Science Ltd (licença de reprodução nº 1052427-1).

A inflamação central, além de ser mediada pelas citocinas inflamatórias periféricas que passam a atravessar a BHE, é também mediada pela reatividade de astrócitos e micróglia. Esse processo promove danos e até mesmo destruição das junções oclusivas das células endoteliais da unidade neurovascular, potencializando a entrada de células e moléculas inflamatórias periféricas, e a manutenção do microambiente inflamatório (DUTHEIL et al., 2016; YANG et al., 2019; YARLAGADDA; ALFSON; CLAYTON, 2009).

### *1.5.3 Participação da mitocôndria nas alterações cerebrais desencadeados pela ingestão de DH e DM2*

A mitocôndria é a organela celular que controla os processos energéticos, oxidação de substratos e geração de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), sendo essencial também no metabolismo redox, homeostase de cálcio e sobrevivência celular (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; OSELLAME; BLACKER; DUCHEN, 2012). A função mitocondrial em neurônios é fundamental para o suporte da maquinaria sináptica, sendo considerada como um fator limitante da sinaptogênese e plasticidade neuronal (LUQUE-CONTRERAS et al., 2014).

O processo de geração de ATP nos eucariotos se inicia no citoplasma celular com as enzimas da via glicolítica, através do catabolismo de glicose a piruvato, que entra na matriz mitocondrial, juntamente com acil-Coa, derivado de ácidos graxos, ambos geram as coenzimas reduzidas NADH e FADH<sub>2</sub> em processos do ciclo do ácido cítrico. As coenzimas reduzidas, por sua vez, são oxidadas nos complexos localizados nas cristas mitocondriais, e os elétrons são transportados através dos complexos I, II, III e IV e da ubiquinona, até chegarem em seu aceptor final, o O<sub>2</sub>, reduzindo-o a água. Durante o processo de transporte de elétrons, os complexos I, III e IV bombeiam prótons da matriz para o espaço inter-membrana (EIM), formando um gradiente de prótons, que posteriormente retornará para a matriz através da ATP sintase (complexo V), sendo esse o mecanismo de geração de ATP através da oxidação de substratos (Figura 3) (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; OSELLAME et al., 2012).



**Figura 3. A mitocôndria e o processo energético.** (A) Estrutura da mitocôndria, composta por ribossomos, DNA mitocondrial, grânulos de RNA, membranas externa, interna e o espaço inter-membrana (EIM). (B) O ciclo do ácido cítrico ocorre na matriz e a cadeia transportadora de elétrons (CTE) ocorre nas cristas mitocondriais. O piruvato proveniente da glicólise e os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico e catalisa a formação das coenzimas reduzidas NADH e FADH<sub>2</sub> e succinato, que irão alimentar a CTE. O NADH, o FADH<sub>2</sub> e o succinato transferem seus elétrons para os complexos I e II, e através da oxirredução das outras enzimas da CTE, culminam na redução do O<sub>2</sub> (aceptor final de elétrons) a água. A transferência de elétrons através da CTE mantém o potencial da membrana pelo bombeamento de prótons para o EIM. Nesta etapa final, o gradiente de prótons retorna à matriz pela ATP sintase, onde ADP é fosforilado para formar ATP. (A) Adaptado de (LOGAN, 2006), Copyright © 2006 Oxford University Press (Licença nº 4881380536714). (B) Adaptado de (POLYZOS; MCMURRAY, 2017), Copyright © 2017 Elsevier Ireland Ltd. (Licença nº 4881390389815).

A obesidade induzida por uma DH diminui a expressão de proteínas da cadeia respiratória no hipocampo de camundongos C57BL/6, conferindo uma provável disfunção energética dessas células (PETROV et al., 2015). De acordo com essa hipótese, dados do nosso grupo demonstram o comprometimento no consumo de O<sub>2</sub> em camundongos *Swiss* alimentados com DH por 1 mês, e que essa disfunção energética está associada à disfunção sináptica e comprometimento cognitivo (PAULA, 2020). Neste sentido, a disfunção mitocondrial presente no DM2 pode favorecer o aparecimento das características fisiopatológicas da doença de Alzheimer, como perda sináptica e disfunção cognitiva (CARVALHO et al., 2015).

Além disso, alguns estudos tem proposto a utilização de fármacos antidiabéticos como metformina e rosiglitazona para melhorar a função cognitiva em modelos animais de Alzheimer (CRAIG; PARVEZ; ISSBERNER, 2019). Ademais, a inibição da enzima dipeptidil peptidase 4, pelos hipoglicemiantes vidagliptina e sitagliptina, foi capaz de reverter o dano cognitivo, a superprodução de ER e as alterações no potencial de membrana mitocondrial causados pela DH (PINTANA et al., 2013).

No cérebro como um todo e particularmente no hipocampo, o excesso de EROs, disfunção na oxidação de proteínas e lipídeos, menor produção de ATP e menor expressão e função de enzimas antioxidantes são achados frequentes em modelos de DH e obesidade (PARK; CHO; KIM, 2018; RUEGSEGGGER et al., 2019). O aumento na produção de EROs favorece sua reação com proteína e lipídeos estruturais, tornando-os disfuncionais (ALZOUBI et al., 2018; MORRISON et al., 2010; TREVINO et al., 2015). Essas modificações oxidativas causam disfunção sináptica e ativação da cascata apoptótica, levando à danos neuronais e posterior declínio cognitivo (MASSAAD; KLANN, 2011; TREVINO et al., 2015).

Todas essas alterações mitocondriais, especialmente no hipocampo, comprometem a bioenergética e sobrevivência celular, sendo que a disfunção energética afeta diretamente as interações neuro-gliais e podem ter como consequência a redução da densidade sináptica e comprometimento cognitivo.

## **1.6 Efeito do consumo de DH na infância e a adolescência**

A adolescência é um processo de transição entre a infância e a vida adulta, acompanhada pela puberdade, maturidade sexual, profunda maturação cerebral, mudanças comportamentais e vulnerabilidade a fatores ambientais (VINUESA et al., 2019). O elevado consumo de produtos industrializados contendo altas quantidades de gordura, juntamente com os hábitos sedentários está associado com o rápido ganho de peso na adolescência e na juventude adulta (VINUESA et al., 2019). Adultos e crianças expostos à DH pelo mesmo período de tempo respondem metabolicamente de formas diferentes, sendo que os efeitos da ingestão de DH são mais intensos quando esta é introduzida em um período mais precoce da vida (BOITARD et al., 2012).

A DH torna a criança mais propensa a alterações metabólicas e cognitivas na vida adulta, impactando no desenvolvimento cerebral e plasticidade neuronal (YANG et al., 2019), especialmente na neurogênese hipocampal, uma forma de plasticidade baseada na formação

continuada de novos neurônios na vida adulta (LINDQVIST et al., 2006). Nesta linha, camundongos recém-desmamados (21º dia de vida) expostos a diferentes períodos de DH apresentaram alterações em proteínas relacionadas ao metabolismo de glicose e resistência à insulina, bem como pior desempenho em testes cognitivos relacionados a memória, aprendizado e comportamento tipo-depressivo no início da vida adulta (VINUESA et al., 2016). A disfunção cognitiva acompanhada de alterações hipocâmpais induzida pela DH no início da vida de camundongos são especialmente importantes uma vez que as alterações metabólicas ocorridas neste período podem comprometer permanentemente as funções cerebrais (BOITARD et al., 2012; VINUESA et al., 2019; YANG et al., 2019).

Neste estudo propusemos um modelo de hiperglicemia, através da introdução de DH em camundongos recém-desmamados (21 dias de idade), a fim de avaliar como este insulto afeta parâmetros metabólicos e comportamentais na fase adulta destes animais. Além da ingestão de DH, a droga estreptozotocina (STZ) foi aplicada nestes animais, com o intuito de acelerar a progressão da disfunção metabólica do DM2, muito frequente na obesidade e sobrepeso (NATH et al., 2017). A STZ é uma droga tóxica para as células  $\beta$ -pancreáticas, causando danos no DNA através da geração de EROs, tendo por consequência a redução da secreção de insulina, juntamente com resistência em tecidos periféricos (DE LA MONTE; WANDS, 2008; NATH et al., 2017). Com isso, avaliamos como o DM2 afeta parâmetros cognitivos dos camundongos, e como tecidos periféricos como o BAT, fígado e coração podem estar contribuindo para essas alterações.

## 2 JUSTIFICATIVA

O DM2 é reconhecido como um problema de saúde de alta prevalência e de grande impacto na qualidade de vida, devido à sua associação com outras comorbidades, incluindo, doenças cardiovasculares, DHGNA, asma, disfunção renal, entre outros. Ademais, estudos recentes também associam o DM2 ao desenvolvimento de neuropatologias e prejuízos cognitivos.

Neste segmento, alterações energéticas figuram como um fator confluyente entre o DM2 e o desencadeamento de processos neurocognitivos, visto que alterações de aprendizado e transtornos de humor são alterações decorrentes do DM2 observados a nível de sistema nervoso central. Assim, estudar o papel da mitocôndria, que é a organela responsável pela bioenergética celular, se faz necessário para uma melhor compreensão da fisiologia energética de células metabolicamente muito ativas, como as células do sistema nervoso central, bem como compreender a relação da função de órgãos periféricos relacionados ao metabolismo energético e sua interação com a função cerebral.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos de um modelo de diabetes mellitus tipo 2 induzido por uma dieta hiperlipídica e duas doses de estreptozotocina sobre parâmetros metabólicos, comportamentais, energéticos e celulares em camundongos C57BL/6.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- a) Caracterizar as alterações metabólicas causadas pelo modelo de DM2 sobre o ganho de peso e perfis glicêmico e lipídico.
- b) Avaliar parâmetros comportamentais associados à aprendizagem, memória e emocionalidade.
- c) Investigar o papel da mitocôndria no hipocampo, tecido adiposo marrom, fígado e coração e sua relação com as alterações causadas pelo DM2.
- d) Quantificar marcadores de inflamação e densidade neuronal nas regiões CA1 e giro denteado hipocampais.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

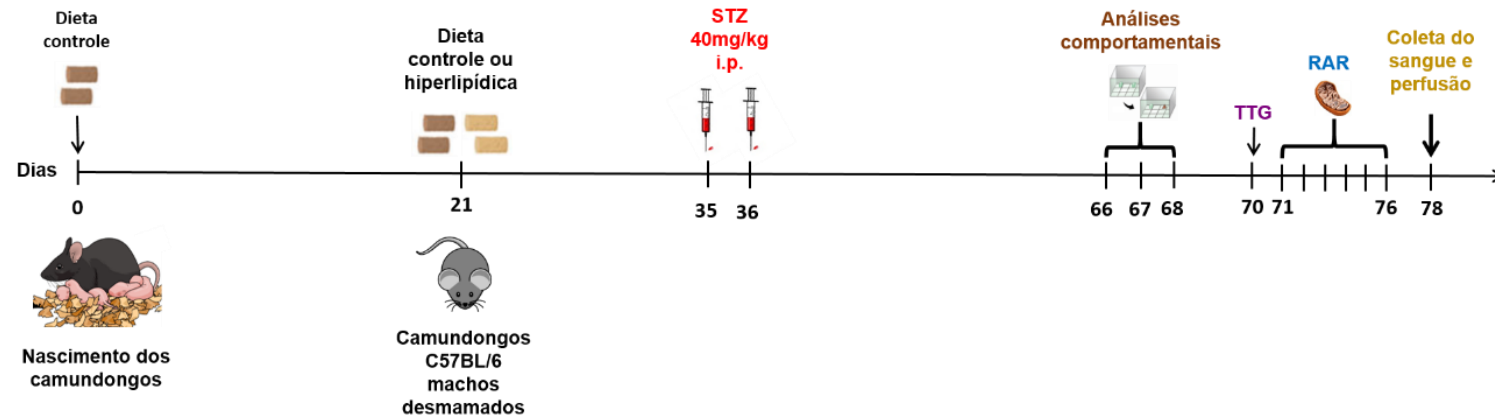
### 4.1 Animais e desenho experimental

O presente estudo foi realizado em camundongos machos C57BL/6 adquiridos na Universidade Católica de Brasília. Todos os animais foram alojados em gaiolas acrílicas com sistema de ar filtrado (Alesco; 3-4 camundongos/gaiola), temperatura controlada (23-25°C) e ciclo claro/escuro de 12h (luzes às 6h) no biotério da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Água e dietas foram fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos feitos em animais cumpriram as diretrizes sobre cuidados com animais do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/UnB), que segue a publicação do NIH "Principles of Laboratory Animal Care". Número do processo 60/2019 (Anexo A).

Este protocolo experimental foi realizado para avaliar os efeitos da DH no início da vida, sobre parâmetros metabólicos e comportamentais na idade adulta. Camundongos com 21 dias de idade (imediatamente após o desmame) foram alimentados com uma dieta controle (DC; 15% de lipídeos; PRAGSOLUÇÕES Biociências®) ou hiperlipídica (DH; 48% de lipídeos; PRAGSOLUÇÕES Biociências®) por 7 semanas (ver composição nutricional completa na Tabela 1). Duas injeções intraperitoneais consecutivas de STZ (40 mg/kg) foram realizadas no grupo DH no dia 35 e 36 de vida, para induzir o modelo de DM2 (NATH et al., 2017). Camundongos alimentados com DC receberam o mesmo volume de tampão de citrato 0,1M (veículo). O peso corporal foi registrado semanalmente. Na décima semana de vida (dias 66-68), os animais foram submetidos a testes comportamentais, que incluem campo aberto, reconhecimento do novo objeto, realocação do objeto e nado forçado. Após as análises comportamentais, foi realizado um teste de tolerância à glicose (dia 70). Na décima primeira semana de vida os camundongos foram sacrificados, sendo dissecados o hipocampo, tecido adiposo marrom, fígado e coração para avaliar o consumo de O<sub>2</sub> por respirometria de alta resolução (RAR). O sangue foi coletado para determinar o perfil lipídico. Paralelamente, quatro ou cinco animais em cada grupo foram perfundidos intracardialmente para análise imunohistológica (Figura 4).

<i>Componente</i>	<i>Controle</i>		<i>Hiperlipídica</i>	
	Kcal	%kcal	Kcal	%kcal
<i>Amido de milho</i>	2118	52,95	1326	26,57
<i>Caseína</i>	800	20	800	16,03
<i>Sacarose</i>	400	10	400	8,02
<i>Óleo de soja</i>	630	15,75	360	7,21
<i>Mix de vitaminas e minerais AIN-93</i>	40	1	40	0,8
<i>L-Cistina</i>	12	0,3	12	0,24
<i>Banha</i>	0	0	2052	41,12
<i>Colina</i>	0	0	0	0
<i>Fibras</i>	0	0	0	0
<i>Total</i>	4000	100	4990	100

**Tabela 1.** Formulação de nutrientes das dietas controle (DC) e hiperlipídica (DH). Quantidade calórica correspondente a 1kg de alimento.



**Figura 4. Esquema do desenho experimental.** Camundongos C57BL/6 machos com 21 dias de idade foram submetidos a dieta controle (DC) ou hiperlipídica (DH) por 7 semanas. Nos dias 35 e 36 de vida, camundongos sob DH receberam injeções i.p. de estreptozotocina (STZ) 40mg/kg, enquanto camundongos sob DC receberam veículo. As avaliações comportamentais foram realizadas nos dias 66-68. Depois disso, foi realizado o teste de tolerância à glicose (TTG). O consumo de O<sub>2</sub> foi avaliado em vários tecidos por respirometria de alta resolução (RAR) e amostras cerebrais foram utilizadas para imunohistoquímica. Paralelamente à perfusão, 5-6 camundongos tiveram seu sangue coletado para ensaios enzimáticos

## 4.2 Avaliações comportamentais

### 4.2.1 *Teste do Campo aberto (TCA)*

O TCA foi utilizado para avaliar as atividades locomotoras e exploratórias induzidas por um novo ambiente. A tendência natural dos camundongos em um novo ambiente é explorá-lo, apesar do estresse e do medo causados pelo mesmo (PRUT; BELZUNG, 2003). O aparato é uma arena cúbica de madeira, com dimensões 30x30x30 cm (comprimento x largura x altura) com fundo branco, contendo pistas espaciais nas paredes laterais. Os camundongos foram colocados individualmente no centro do aparato para explorar livremente a arena por 5 minutos. A arena foi limpa com etanol a 70% entre cada teste. A distância total percorrida e o tempo gasto nos quadrantes interno e externo foram avaliados no software ANY-maze® (versão 4.20, Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA).

### 4.2.2 *Teste de reconhecimento ao novo objeto (TRNO)*

Este teste avalia a memória de reconhecimento dependente do hipocampo (AINGE et al., 2006). O TRNO foi realizado 24 horas após a exposição ao campo aberto (habituação). Durante a sessão treino, o animal foi exposto por 5 minutos a dois objetos idênticos (Objeto Antigo, OA) colocados em paralelo e a 5 cm das paredes. Os animais foram devolvidos às suas gaiolas imediatamente após o treino. Uma hora e meia ou 24 horas após a sessão treino, os animais foram reintroduzidos na mesma arena por mais 5 minutos, com um OA e outro objeto novo (ON). A arena foi limpa com etanol a 70% entre cada teste. Os objetos eram de nível exploratório/complexidade física e tamanho similares. O tempo de exploração foi registrado manualmente com cronômetros e o comportamento de cheirar a menos de 1 cm ou tocar foram considerados atividades exploratórias. Um índice de discriminação (ID) foi calculado para avaliar a memória de reconhecimento usando a equação:

$$ID = \frac{T_{ON} \cdot 100}{T_{ON} + T_{OA}}$$

onde,  $T_{ON}$  e  $T_{OA}$  são os tempo de exploração dos objetos novo e antigo, respectivamente.

### 4.2.3 *Teste de realocação do objeto (TRLO)*

O TRLO foi utilizado para avaliar a memória de referência espacial dos camundongos, dependente de funções hipocampais. Este teste baseia-se na tendência espontânea de roedores, previamente expostos a dois objetos idênticos, de explorar posteriormente o objeto

realocado em um novo local (R) por mais tempo do que exploram o objeto não realocado (NR), fornecendo assim um índice qualitativo de aprendizado (MURAI et al., 2007). Durante a sessão treino, os animais foram colocados por 5 minutos no centro da arena com dois objetos idênticos em paralelo e a 5 cm das paredes. Após a fase de treino, os camundongos foram retirados do aparato por 1,5 horas. Após o intervalo entre o treino e o teste, um objeto foi movido para um novo local. O tempo gasto na exploração dos objetos NR e R foi registrado por 5 min. Após cada teste, o aparelho experimental foi limpo com papel toalha e etanol a 70%. O tempo de exploração foi registrado manualmente com cronômetros e comportamentos como cheirar o objeto a menos de 1 cm de distância ou tocar foram considerados atividades exploratórias. Um índice de localização (IL) foi calculado para avaliar a memória espacial usando a equação:

$$IL = \frac{T_R \cdot 100}{T_R + T_{NR}}$$

onde,  $T_R$  é o tempo de exploração do objeto realocado e  $T_{NR}$  é o tempo de exploração do objeto não realocado.

#### 4.2.4 *Teste do nado forçado (NF)*

O comportamento tipo-depressivo dos camundongos também foi avaliado utilizando o teste do NF (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). Este protocolo avalia a capacidade de resposta do animal a uma situação de estresse inescapável. Os animais foram colocados individualmente em um béquer de 5L contendo 30 cm de altura de água a 22°C e permitidos de nadar por 6 min. Os animais foram registrados por 6 min, onde foi analisado o tempo de imobilidade nos 4 últimos minutos, sendo imobilidade definida como flutuar na água sem esforço, fazendo apenas os movimentos necessários para manter a cabeça acima da água. Os primeiros 2 minutos de gravação foram descartados.

### 4.3 **Análise do perfil glicêmico e lipídico**

#### 4.3.1 *Teste de tolerância à glicose*

O teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado após um jejum de 6 horas, sem restrição hídrica. Amostras de sangue caudal foram coletadas para determinar a glicemia em jejum (tempo 0 min) e em seguida, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de glicose (2g/kg). As amostras de sangue caudal foram coletadas após 15, 30, 60, 90 e 120

minutos após a injeção de glicose e analisadas com tiras reativas em um glicosímetro (Accu-Chek, modelo Active, Roche).

#### 4.3.2 Níveis de colesterol e triglicerídeos totais

Os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos foram medidos por ensaios colorimétricos, seguindo as instruções do fabricante LABTEST kits comerciais. Registro no Ministério da Saúde: Colesterol total – 10009010068 e Triglicerídeos totais – 10009010070.

### 4.4 Respirometria de alta resolução

O consumo de O<sub>2</sub> foi avaliado pela RAR usando um repirômetro *Oxygraph-2k* (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Os animais foram sacrificados utilizando os anestésicos cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) via i.p. até a total analgesia e posterior deslocamento cervical. Amostras de hipocampo, tecido adiposo marrom, coração e fígado foram analisadas e todos os tecidos foram coletados logo após o sacrifício do animal.

#### 4.4.1 Respirometria do hipocampo

O hipocampo foi coletado e homogeneizado em 300µL de tampão de isolamento [TI: manitol 225mM, sacarose 75mM, Hepes 10mM, EGTA 1mM, albumina bovina sérica (*bovine serum albumin. BSA*) livre de ácidos graxos 0,1%] usando um homogeneizador tipo Dounce de 5 ml de vidro-teflon. As amostras (~0,200mg/mL) foram colocadas no repirômetro contendo 2mL de meio de reação (MR: sacarose 125mM, KCl 65mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Hepes 10mM, EGTA 0,2mM) e em seguida, foram adicionados alguns substratos/drogas a avaliar os estados respiratórios. Foram adicionados piruvato + malato (PM: 5 e 2,5mM) ou rotenona (ROT: 0,5µM) + succinato (S: 10mM) para avaliar o estado respiratório 2, por substratos ligados ao complexo 1 ou 2, respectivamente. O estado 3 (fosforilante) foi avaliado após a adição de adenosina di-fosfato (ADP: 500µM) e o estado 4 (vazamento) após a adição de oligomicina (OMY: 0,1 µg/mL). O estado 4 desacoplado foi avaliado após a titulação com cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona (CCCP) (concentração final de 1-3 µM) e a respiração residual não mitocondrial foi avaliada com ROT ou Antimicina A (AA) (0,5 e 1 µM, respectivamente).

#### 4.4.2 *Respirometria do tecido adiposo marrom (BAT)*

O BAT foi coletado, pesado e cortado em pequenos pedaços de 1 mm e, em seguida, foi adicionado 10x o volume ( $\mu\text{L}$ ) de MR correspondente ao seu peso para homogeneizar o tecido, em um homogeneizador tipo Dounce de 5 ml de vidro-teflon. A amostra ( $\sim 0,135\text{mg/mL}$ ) foi colocada no Oroboros contendo 2mL de MR e em seguida, foram adicionados os substratos PM (5 e 2,5mM), guanosina difosfato (GDP 1mM), para avaliar a atividade da UCP-1, CCCP para avaliar a respiração desacoplada máxima (concentração final de 3-7  $\mu\text{M}$ ) e a respiração residual não mitocondrial foi avaliada com ROT (0,5  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.4.3 *Respirometria do fígado e coração*

Os tecidos foram coletados e cortados em pequenos pedaços de  $1\text{mm}^3$ , em um béquer contendo 10mL de TI. Lavagens sucessivas foram feitas para remover o excesso de sangue. A seguir, os tecidos foram homogeneizados em um homogeneizador tipo Dounce de 30 ml de vidro-teflon e foi adicionado cerca de 10x o volume ( $\mu\text{L}$ ) de MR de acordo com a quantidade total do tecido correspondente. Os homogenatos foram centrifugados a 600G. Todas as etapas de centrifugação foram realizadas a  $4^\circ\text{C}$  por 10 minutos. O sobrenadante obtido da primeira centrifugação foi coletado e centrifugado a 7000G. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 10 mL de TI e novamente centrifugado a 7000G. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em 500  $\mu\text{L}$  de TI. As amostras finais (fígado  $\sim 0,200\text{mg/mL}$  e coração  $\sim 0,055\text{mg/mL}$ ) foram colocadas no Oroboros contendo 2mL de MR e adicionados PM (5 e 2,5mM) ou ROT + S (0,5 $\mu\text{M}$  e 10mM) para avaliar o estado respiratório 2. O estado 3 foi avaliado após a adição de ADP 500 $\mu\text{M}$ , e o estado 4 após a adição de OMY 0,1 $\mu\text{g/mL}$ . O estado 4 desacoplado foi avaliado após a titulação de CCCP (concentração final de 1 a 5  $\mu\text{M}$ ) e a respiração residual não mitocondrial foi avaliada com ROT ou AA (0,5 e 1  $\mu\text{M}$ , respectivamente).

#### 4.4.4 *Potencial de membrana mitocondrial*

Nos experimentos utilizando substratos ligados ao complexo 2 da cadeia respiratória, a estimativa do potencial de membrana foi realizada juntamente com a respirometria. A estimativa do potencial de membrana foi feita utilizando um sensor de fluorescência azul, que foi acoplado nas janelas da frente das cubetas e conectada com a unidade de controle de fluorescência (O2k-Fluorescence LED2 module, Oroboros Instrument, Austria), excitação



495 nm e emissão 587 nm. A molécula catiônica fluorescente safranina (2 $\mu$ M), com alta afinidade para membranas e muito sensível a diferenças nas concentrações iônicas no meio intra e extramitocondrial, foi adicionada após a adição das amostras, e os experimentos de respirometria foram conduzidos. A medida de fluorescência das amostras foi registrada a cada 2 segundos, juntamente com o consumo de O<sub>2</sub>. A variação da fluorescência foi medida pela seguinte fórmula:

$$\Delta\psi = \frac{\Delta F}{F}$$

onde,  $\Delta\psi$  é o potencial de membrana estimado, calculado pela razão entre a variação da fluorescência ( $\Delta F$ ), obtida através da diferença entre a fluorescência máxima do estado 4 desacoplado (CCCP) e da fluorescência obtida em cada estado respiratório avaliado, e ( $F$ ), sendo a fluorescência máxima obtida após CCCP.

#### 4.5 Imunohistoquímica: marcação para GFAP e NeuN

Um subgrupo de animais foi anestesiado com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) via i.p. Os animais foram perfundidos intracardialmente com o auxílio de uma bomba peristáltica (4 mL/min) através do ventrículo esquerdo com solução fosfato salina tamponada (PBS) 0,1M pH 7,4. Após completar a perfusão, os animais foram decapitados e seus cérebros removidos, pós-fixados em paraformaldeído a 4% em PBS durante a noite à temperatura ambiente. A crioproteção foi feita no dia seguinte por imersão em solução de sacarose a 30% em PBS a 4°C até saturação completa. Os cérebros foram congelados e armazenados a -80°C para posterior preparo dos cortes, feitos em seções de 30  $\mu$ m de espessura a -20°C com a ajuda de um criostato.

A proliferação de astrócitos foi avaliada pela marcação da proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein, GFAP*), constituinte do citoesqueleto dos astrócitos (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). A densidade neuronal foi avaliada pela marcação da proteína NeuN, localizada especificamente no núcleo de neurônios (GUSEL'NIKOVA; KORZHEVSKIY, 2015). Trinta fatias de flutuação livre dos grupos controle e DM2 foram incubadas com tampão citrato por 1h a 70°C, para recuperação antigênica. As fatias foram lavadas com tampão tris salina (*tris buffer saline, TBS*) e bloqueadas por 2h com uma solução de bloqueio (BSA 4% em TBS + triton 0,5%, *TBST*). Depois disso, as fatias foram incubadas durante a noite com anticorpo primário de camundongo anti-GFAP (1:200; Sigma, San Louis, Missouri, EUA) ou coelho anti-NeuN (1:750; Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA).

Em seguida, as fatias foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos secundários anti-camundongo ou anti-coelho, para anti-GFAP e anti-NeuN respectivamente. Streptavidina Peroxidase e DAB (kit de detecção Polivalente HRP/DAB (ABC), Abcam, Cambridge, Reino Unido), foram utilizados seguindo as instruções do fabricante. As fatias foram lavadas, montadas em lâminas gelatinizadas, incubadas por 20s com hematoxilina (Harris hematoxilina, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e desidratadas com álcool seguido de xileno. As lâminas foram montadas com verniz e lamínulas.

As lâminas foram digitalizadas com o aparelho Aperio Digital Pathology Slide Scanner CS2 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) sob luz em lente de ampliação de 20X e foram obtidas imagens das camadas CA1 e giro denteado do hipocampo para quantificação das células marcadas. A quantificação foi realizada medindo a área total marcada, utilizando o *software* ImageJ (versão 1.8. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Uma razão das populações celulares hipocâmpais foi obtida na região CA1 e GD, calculada pela quantidade de células positivas para NeuN dividido pela quantidade de células marcadas para GFAP.

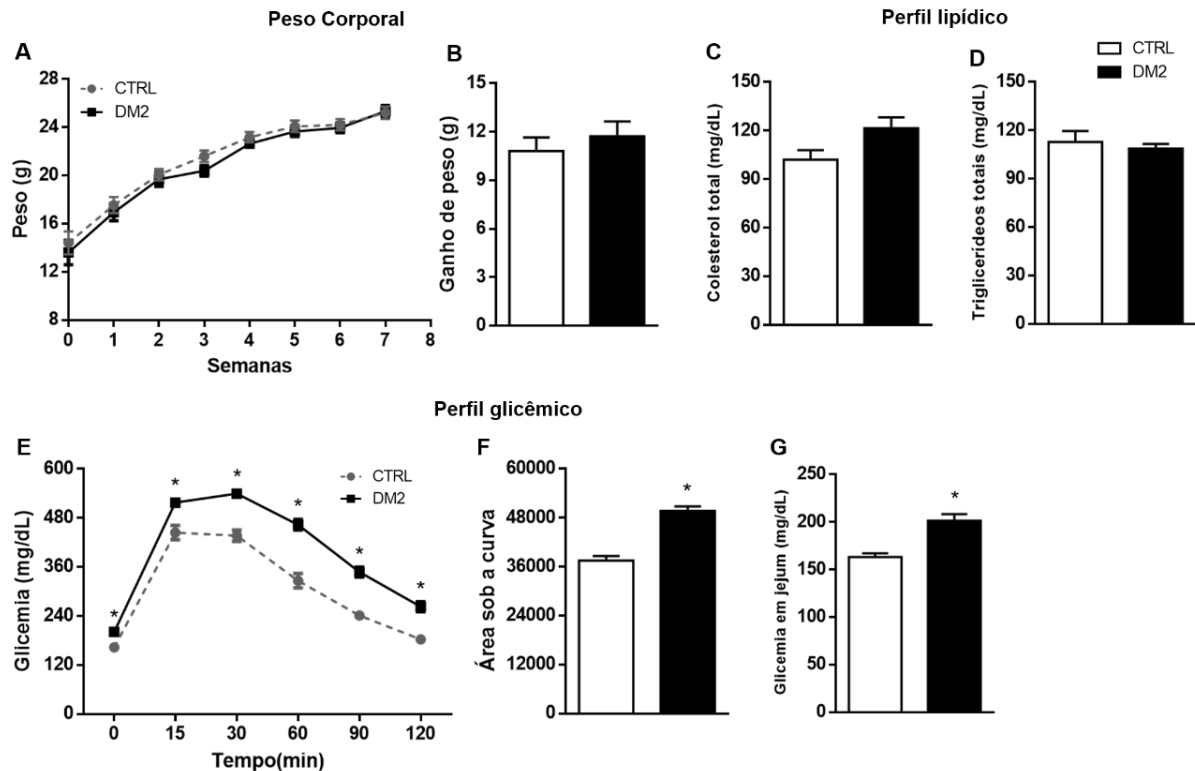
#### **4.6 Análise estatística**

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foram analisados com o GraphPad Prism (versão 6.0, La Jolla, California, USA). O teste de normalidade foi realizado em todas as amostras, sendo feitas as análises estatísticas adequadas. Teste *t* de uma amostra foi realizada para TRNO e TRLO para determinar se os índices de discriminação ou localização diferem de um valor teórico de 50%. \* $p < 0,05$  vs 50% (objeto novo ou realocado). As respirometrias e o  $\Delta\psi$  foram analisados pelo teste *t student* pareado para amostras com distribuição normal e Wilcoxon para distribuições não normais, segundo o teste de normalidade. Todos os outros experimentos foram analisados pelo teste *t student* não pareado para distribuições normais e teste de Mann-Whitney para distribuições não normais. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 A exposição precoce à DH + STZ induziu um modelo de diabetes mellitus tipo 2 em camundongos.

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que a introdução de uma DH no início da vida (D21: no dia do desmame) + STZ na 5ª semana de vida induziram um modelo de DM2 em camundongos. A alimentação de camundongos com 21 dias de idade por 57 dias com DH seguida de duas doses baixas de STZ promoveu o comprometimento do metabolismo da glicose sem induzir a obesidade. Os níveis de glicose no sangue em jejum aumentaram significativamente em camundongos DM2 em comparação com o grupo controle (Figura 5G). No TTG, uma ferramenta diagnóstica para o DM2, indicador de eficiência metabólica e resistência à insulina (DUTHEIL et al., 2016) realizado no final do protocolo experimental, a glicemia plasmática aumentou para seu máximo após 15-30 min da administração i.p. de glicose em camundongos controle e DM2, mas esse aumento foi maior nos camundongos DM2. Além disso, houve um atraso na depuração da glicose nos camundongos DM2 em relação à CTRL, com níveis de glicose permanecendo elevados após 120 min (Figura 5E). A área sob a curva foi significativamente maior nos camundongos DM2 (Figura 5F). Por outro lado, o peso corporal final e o ganho de peso dos camundongos DM2 não foram diferentes do grupo controle (Figura 5A e 5B), assim como os níveis totais de colesterol e triglicerídeos não se alteraram nos camundongos DM2 (Figura 5C e 5D).



**Figura 5. Exposição precoce à DH + STZ induz um modelo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) em camundongos.** (A) Peso corporal semanalmente registrado dos animais. (B) Ganho de peso calculado pelo peso final menos o peso inicial. (C) Colesterol total e (D) triglicédeos totais séricos medidos por análise colorimétrica. (E) Teste de tolerância à glicose (TTG) realizado antes (tempo 0 min) e 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração de glicose 2g/kg via i.p. após 6 horas de jejum. (F) Área sob a curva obtida do gráfico E. (G) Glicemia em jejum medida pelo sangue caudal. N= 5-7/grupo para a quantificação de colesterol e triglicédeos totais e N=22-23/grupo para os outros experimentos. Todos os dados expressos como média  $\pm$  EPM. Análise estatística feita por teste *t student*. \* $p < 0.05$  vs controle.

## 5.2 Memória dependente de funções hipocampais está prejudicada quando o DM2 é induzido na juventude.

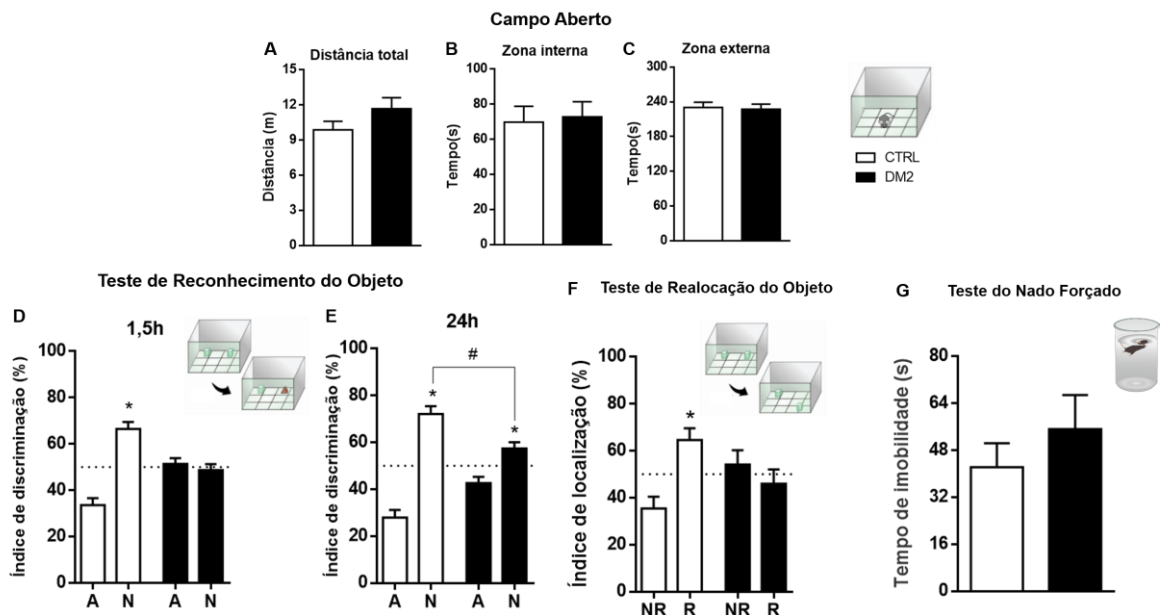
O teste de campo aberto foi realizado para habituar os animais no aparato e avaliar a atividade locomotora. Os dados da Figura 6 mostram que os dois grupos não diferiram na distância total percorrida (Figura 6A) e no tempo gasto nas zonas internas e externas da arena (Figura 6B e 6C). O TRNO e TRLO, que são ambos testes dependentes da atividade hipocampal, foram usados para avaliar a memória de reconhecimento e espacial, respectivamente.

Os animais CTRL demonstraram uma memória de reconhecimento de curta (1,5 h) ou longa duração (24 h) normais, demonstrado pelo aumento do comportamento exploratório em

relação ao novo objeto usado nas sessões teste. No entanto, o grupo DM2 não atingiu a porcentagem exploratória do novo objeto acima do valor teórico de 50%, após 1,5 h da sessão treino, mostrando comprometimento da memória de curta duração (Figura 6D). Ao avaliar a memória de longa duração, concluímos que os camundongos DM2 foram capazes de discriminar o novo objeto após 24 horas da seção treino, porém a quantidade de tempo de exploração dos camundongos DM2 foi significativamente menor que a dos CTRL (Figura 6E), indicando um desempenho pior no teste de memória de longa duração.

O TRLO corroborou os resultados obtidos no TRNO, pois apenas o grupo CTRL demonstrou um índice de localização significativamente acima de 50%, o que demonstra exploração por mais tempo do objeto realocado (Figura 6F), enquanto os camundongos DM2 não discriminaram a nova posição do objeto.

Por fim, os camundongos foram submetidos ao teste de nado forçado para avaliar o comportamento do tipo depressivo. Os dados da Figura 6G demonstram não haver diferenças no tempo de imobilidade entre os camundongos DM2 e CTRL.



**Figura 6. Efeito do modelo de DM2 em análises comportamentais.** Testes do campo aberto (TCA), Reconhecimento do novo objeto (TRNO), realocação do objeto (TRLO) e nado forçado (NF) foram realizados em camundongos CTRL ou DM2 entre os dias 66 e 68 de vida. (A) Distância total percorrida na arena do TCA durante 5 minutos. Tempo total gasto nas zonas (B) interna e (C) externa no TCA. A performance cognitiva foi avaliada pelos índices de discriminação no TRNO com (D) 1,5 h e (E) 24 h de intervalo entre as sessões treino e teste, e pelo índice de localização, feito pelo (F) TRLO com 1,5 h de intervalo entre a sessão treino e teste.

Ambos TRNO e TRLO tiveram a duração de 5 minutos (teste *t student* vs valor teórico de 50%). (G) Tempo de imobilidade no NF utilizado para avaliar o comportamento tipo-depressivo dos camundongos, e registrado durante 6 minutos de teste. TCA, TRNO e NF, N= 15-16/grupo. TRLO, N=7/grupo. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM; \* $p < 0.05$  vs grupo controle.

### **5.3 O DM2 induzido no início da vida causou disfunção mitocondrial e alteração nas populações celulares no hipocampo.**

Para investigar os mecanismos subjacentes ao DM2 que levam ao comprometimento cognitivo, investigamos a atividade da CTE e a área dos astrócitos e neurônios no hipocampo.

A caracterização da atividade mitocondrial foi realizada a partir do homogenato do hipocampo por RAR, uma técnica usada para análises *ex vivo* da atividade da cadeia respiratória em mitocôndrias, tecidos e células isolados, permitindo acompanhar em tempo real as alterações no consumo de O<sub>2</sub> das amostras. A avaliação da CTE é uma excelente maneira de avaliar a bioenergética e função mitocondrial (HUTTER et al., 2006).

Na figura 7, mostramos como o homogenato de hipocampo CTRL e DM2 se comportam *ex vivo* durante o processo respiratório, que inclui transferência de elétrons de NADH ou FADH<sub>2</sub> para os complexos, bombeamento de prótons para o EIM, e a capacidade de produzir ATP. Além disso, desafiamos as mitocôndrias com um desacoplador a fim de avaliar a capacidade respiratória máxima.

Com o intuito de avaliar duas condições diferentes da CTE, usamos PM para avaliar majoritariamente o consumo de O<sub>2</sub> mediado pelo complexo 1 e ROT + S, para o complexo 2. O complexo 1, também conhecido como NADH desidrogenase, é a maior enzima da CTE, sendo também e o principal ponto de entrada de elétrons para a fosforilação oxidativa (LEIPNITZ et al., 2018). O complexo 2 é representado pela succinato desidrogenase, uma enzima essencial no metabolismo mitocondrial sendo a única enzima que compõe o ciclo do ácido cítrico e a CTE (HUANG; MILLAR, 2013).

As figuras 7A e 7E mostram traços representativos das oximetrias obtidas nos experimentos realizados com PM ou ROT+S, respectivamente. Observamos um menor consumo de O<sub>2</sub> dos camundongos DM2 no estado fosforilante (estado 3) e no estado desacoplado (estado 4U), quando o PM são os substratos disponíveis (Figura 7D). Essas alterações são refletidas na produção de ATP (Figura 7B) e na capacidade respiratória de reserva (Figura 7C), que são significativamente menores em relação ao CTRL. Nossos dados

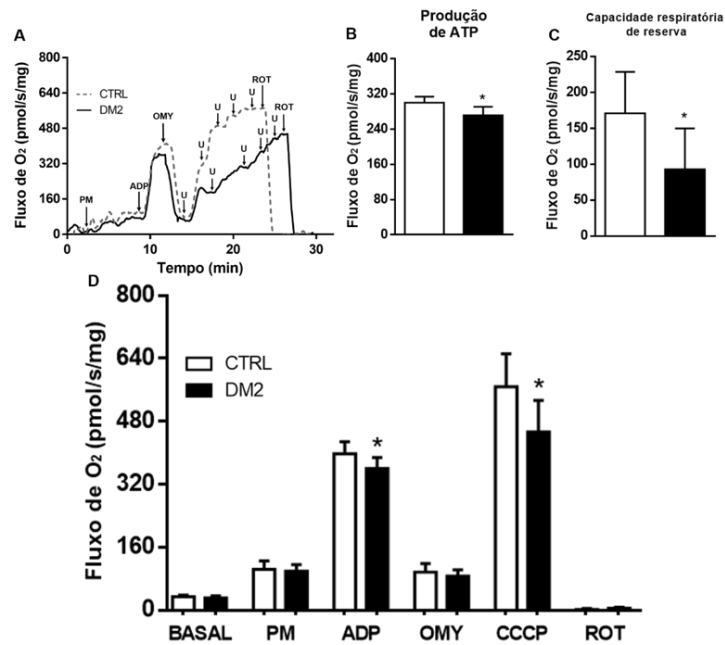
indicam uma redução da eficiência mitocondrial dos camundongos DM2 na produção de ATP e uma menor reserva respiratória, sugerindo que esses animais tenham menor capacidade de produção de ATP e maior suscetibilidade à danos caso a célula sofra um estímulo estressor (YAMAMOTO, H. et al., 2016).

Ao usar ROT+S como substratos, bloqueamos o complexo 1 com ROT e avaliamos apenas a respiração mediada pelo complexo 2, e encontramos resultados semelhantes ao experimento anterior, com menor consumo de O<sub>2</sub> de camundongos DM2 nos estados 3 e 4U (Figura 7H). Essa disfunção reflete-se em uma menor produção de ATP (Figura 7F), sem alterações na capacidade de reserva (Figura 7G). Esses dados de ambos os experimentos demonstram que há uma disfunção bioenergética das células hipocâmpais, causada pelo modelo de DM2, que podem ser o resultado do comprometimento da função das enzimas da CTE.

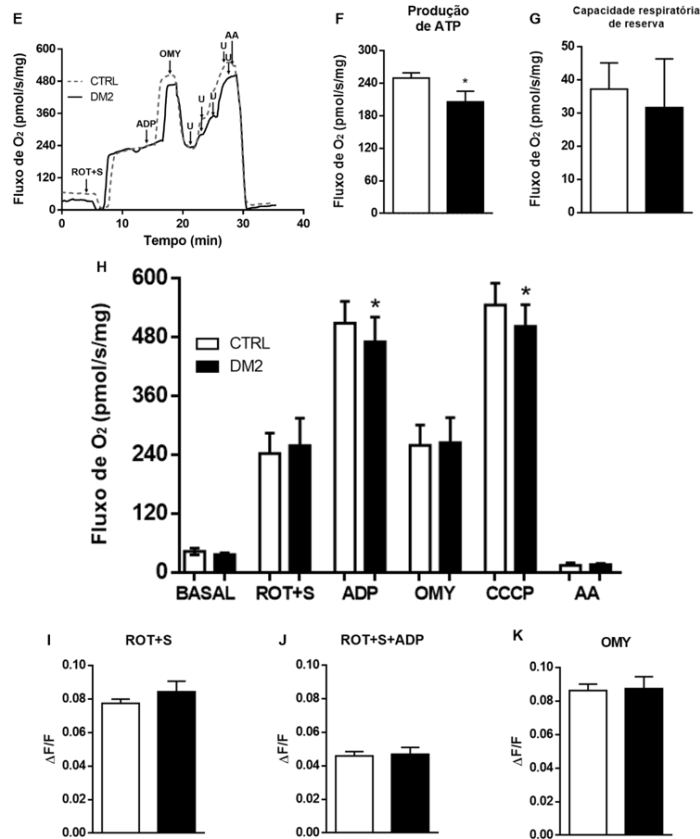
Considerando essa redução no consumo de O<sub>2</sub> hipocâmpal, desejamos investigar suas consequências no  $\Delta\psi$ .  $\Delta\psi$  é a principal força próton motriz, gerada pela oxidação das coenzimas reduzidas NADH e FADH<sub>2</sub>, que geram um fluxo de elétrons através da CTE e com isso estimulam o bombeamento de prótons, através dos complexos situados nas cristas mitocondriais, da matriz para o EIM, que ao retornar para a matriz mitocondrial via ATP sintase, catalisam a formação de ATP (FIGUEIRA et al., 2012). Não observamos diferenças no  $\Delta\psi$  entre os grupos controle e DM2 nos estados 2,3 ou 4, usando substratos ligados ao Complexo 2 (Figuras 7I-K, respectivamente). Esses dados indicam que o gradiente de prótons está sendo formado na mesma proporção em ambos os grupos experimentais, porém provavelmente está ocorrendo um certo vazamento de prótons no EIM de camundongos DM2, que culmina em um menor fluxo de prótons disponível para a ATP sintase e consequente menor consumo de O<sub>2</sub> relacionado a síntese de ATP.

### Consumo de oxigênio do hipocampo

#### Substratos relacionados ao complexo 1



#### Substratos relacionados ao complexo 2

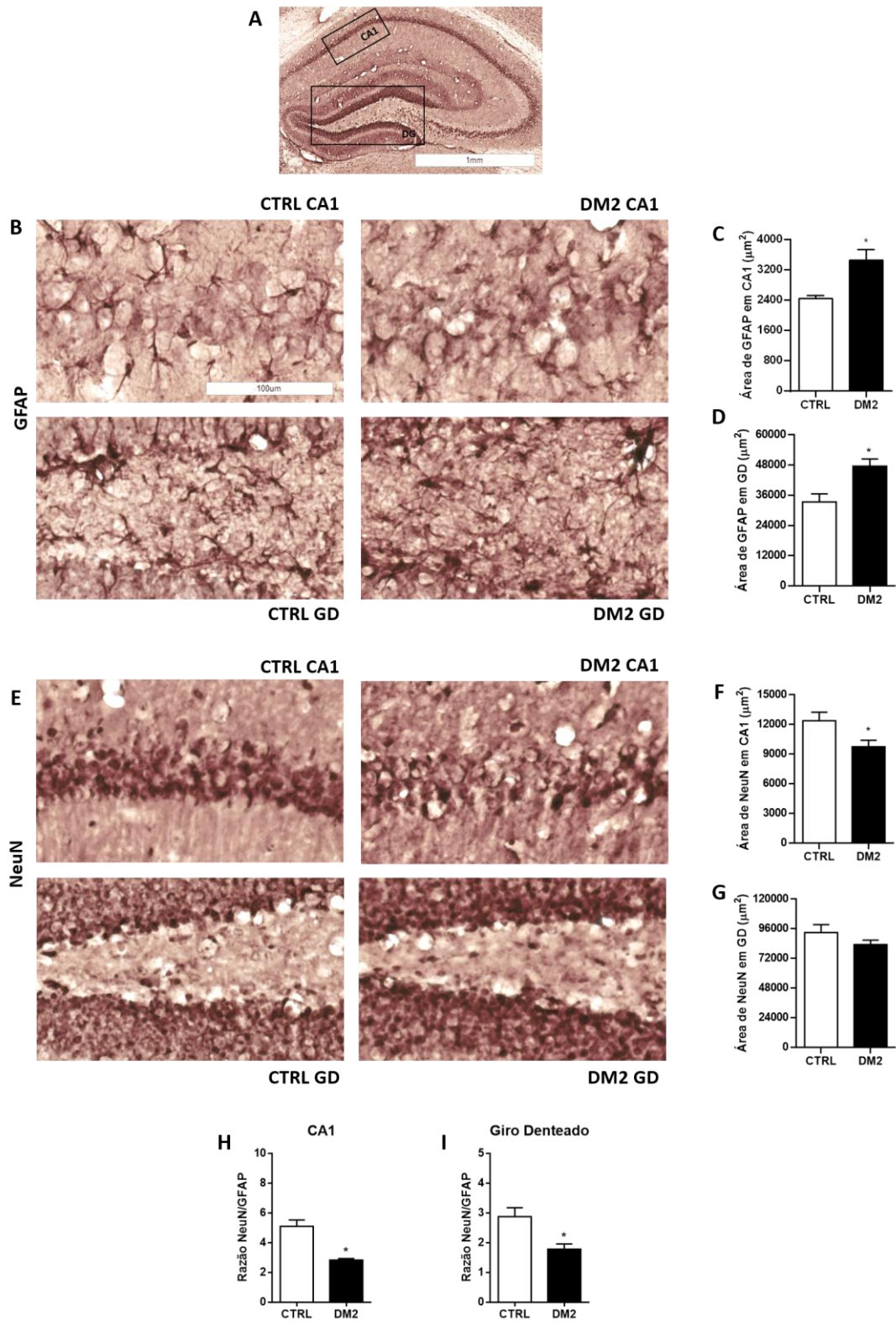


**Figura 7.** Efeito do modelo de DM2 no consumo de O<sub>2</sub> do hipocampo. Respirometria de alta resolução para avaliar os estados respiratórios mitocondriais: BASAL (sem substrato), estado 2 (PM ou ROT+S), estado 3



(ADP), estado 4 (OMY), estado 4 desacoplado ( $U = \text{CCCP}$ ) e respiração residual (ROT ou AA). (A-D): resultados obtidos com os substratos ligados ao complexo 1 e (E-K) resultados obtidos com os substratos ligados ao complexo 2. (A) e (E) Traçado representativo do consumo de  $\text{O}_2$  pelo tempo ao adicionar os substratos e drogas relacionados ao complexo 1 e 2, respectivamente. (B) e (F)- Consumo de  $\text{O}_2$  relacionado à produção de ATP, calculado pelo estado 3 - estado 4. (C) e (G)- Capacidade respiratória de reserva, calculada pelo estado 4 desacoplado - estado 3. (D) e (H)- Fluxo de  $\text{O}_2$  (pmol/s/mg) em todos os estados respiratórios. (I-K) – Resultados do potencial de membrana mitocondrial, obtido pela fluorescência da safranina.  $N=6/\text{grupo}$  para experimentos utilizando substratos ligados ao complexo 1 e  $N=8/\text{grupo}$  para experimentos utilizando substratos ligados ao complexo 2. Todos os dados expressos por média  $\pm$  EPM. Análise estatística feita por teste *t student*. \* $p<0.05$  vs grupo controle.

Em seguida, investigamos os efeitos do DM2 na população celular do hipocampo. Os neurônios são responsáveis pela rápida comunicação de informações e, entre seus componentes, NeuN é uma proteína localizada no núcleo dos neurônios, e tem sido amplamente utilizada como marcador específico (GUSEL'NIKOVA; KORZHEVSKIY, 2015). Os astrócitos são um dos componentes das células gliais, que fornecem o suporte para a sobrevivência e o bom funcionamento dos neurônios, sendo cruciais para a plasticidade sináptica e o metabolismo energético do SNC. A GFAP é uma proteína do citoesqueleto amplamente utilizada como marcador de astrócitos. Quando ativados em resposta a um dano celular ou agente nocivo, os astrócitos alteram sua morfologia e aumentam a expressão de GFAP, podendo exacerbar a inflamação e promovendo danos teciduais e neuronais (GUILLAMON-VIVANCOS; GOMEZ-PINEDO; MATIAS-GUIU, 2015). Realizamos a imunomarcção de NeuN e GFAP em fatias hipocâmpais, onde evidencia-se um aumento na área de células com marcação positiva para GFAP de camundongos DM2 na região CA1 (Figura 8B canto superior direito e Figura 8C) e no giro denteado (Figura 8B canto inferior direito e Figura 8D), que indica ativação de astrócitos nessas regiões. Também observamos que o DM2 causou diminuição na área de células marcadas com NeuN no CA1 (Figura 8E canto superior direito e Figura 8F), sem diferenças no giro denteado (Figura 8E canto inferior direito e Figura 8G), indicando uma possível perda neuronal no hipocampo. Ademais, e podemos observar que o modelo de DM2 promove uma redução da população neuronal, a medida que a marcação de astrócitos aumenta, tanto na região CA1 (Figura 8H) quanto no giro denteado (Figura 8I). Nesse cenário, o comprometimento cognitivo configura-se como uma consequência da disfunção mitocondrial e alterações na morfologia e quantidade das populações celulares no hipocampo.



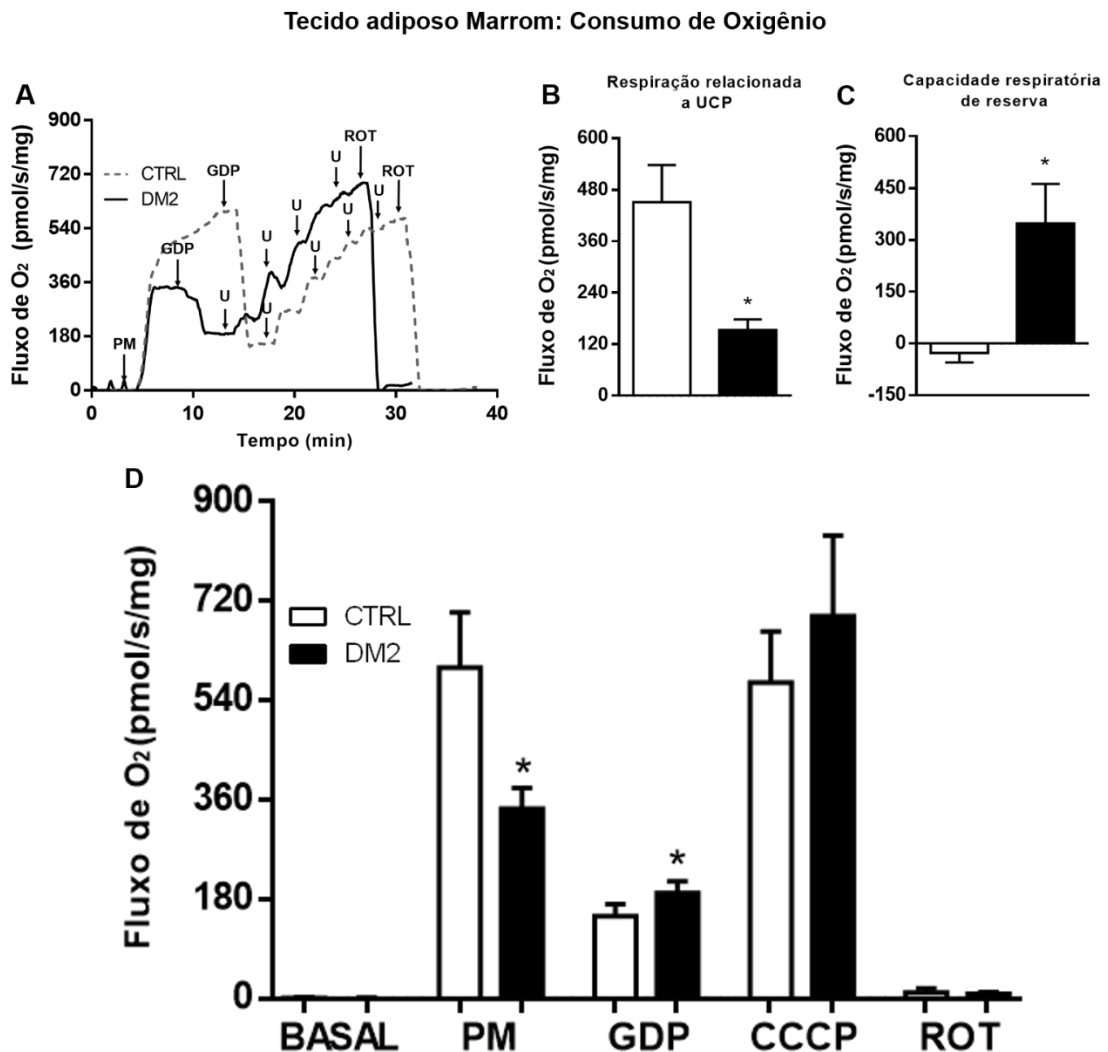
**Figura 8. Efeito do modelo de DM2 nas populações celulares hipocâmpais.** Marcação de GFAP e NeuN em fatias hipocâmpais. (A) Imagens representativas das regiões CA1 e giro denteado (GD). (B) Marcação de GFAP

nas regiões CA1 e GD. Quantificação da área marcada de GFAP nas regiões (C) CA1 e (D) GD. (E) Marcação de NeuN nas regiões CA1 e GD. Quantificação da área marcada de NeuN nas regiões (F) CA1 e (G) GD. Razão das populações celulares de astrócitos e neurônios, calculada pela divisão da quantificação de NeuN/ $\mu\text{m}^2$  pela quantificação de GFAP/ $\mu\text{m}^2$  em (H) CA1 e (I) GD. N=5/grupo. Todos os dados foram expressos por média  $\pm$  EPM. Análise estatística feita por teste *t student*. \* $p < 0.05$  vs grupo controle.

#### **5.4 Função mitocondrial do BAT e fígado são prejudicadas em camundongos DM2 induzido no início da vida**

Com o intuito de avaliar os efeitos do modelo de DM2 em outros tecidos relacionados ao metabolismo, gasto energético e imunidade, avaliamos a fisiologia mitocondrial no BAT (homogenato), fígado e coração (mitocôndrias isoladas). O BAT é um tecido termogênico, relacionado ao gasto de energia e liberação de adipocinas (LEE, J. H. et al., 2019). A principal função do BAT é produzir calor através das propriedades de desacoplamento da UCP-1, dissipando a força próton motriz e aumentando a taxa de oxidação de substratos.

A figura 9A ilustra um traçado representativo dos experimentos. Analisando as oximetrias do BAT, observamos que os camundongos CTRL apresentam um consumo de  $\text{O}_2$  significativamente maior quando adicionados substratos e menor consumo de  $\text{O}_2$  quando o GDP, um inibidor de UCP-1 está no meio de reação, em comparação aos camundongos DM2 (Figura 9D). Como consequência, o consumo de  $\text{O}_2$  relacionado à termogênese diminui significativamente no BAT de camundongos DM2 (Figura 9B). Esses dados indicam que o BAT de camundongos DM2 está consumindo menos  $\text{O}_2$  com a mesma quantidade de substratos, sendo também menos eficiente na produção de calor via UCP-1. Quando desafiamos as mitocôndrias do BAT com um desacoplador, notamos que o BAT CTRL não possui uma capacidade respiratória de reserva como os camundongos DM2 (Figura 9C). Esses dados evidenciam que camundongos CTRL trabalham naturalmente em sua capacidade máxima, sendo a maior parte desse consumo de  $\text{O}_2$  (75%) destinado a termogênese, enquanto os camundongos DM2 normalmente trabalham com apenas 50% de sua capacidade total, e esse consumo de  $\text{O}_2$  é apenas 45% relacionado a termogênese via UCP-1. Nossos dados indicam que a função fisiológica das mitocôndrias do BAT está comprometida pelo DM2 em camundongos jovens.



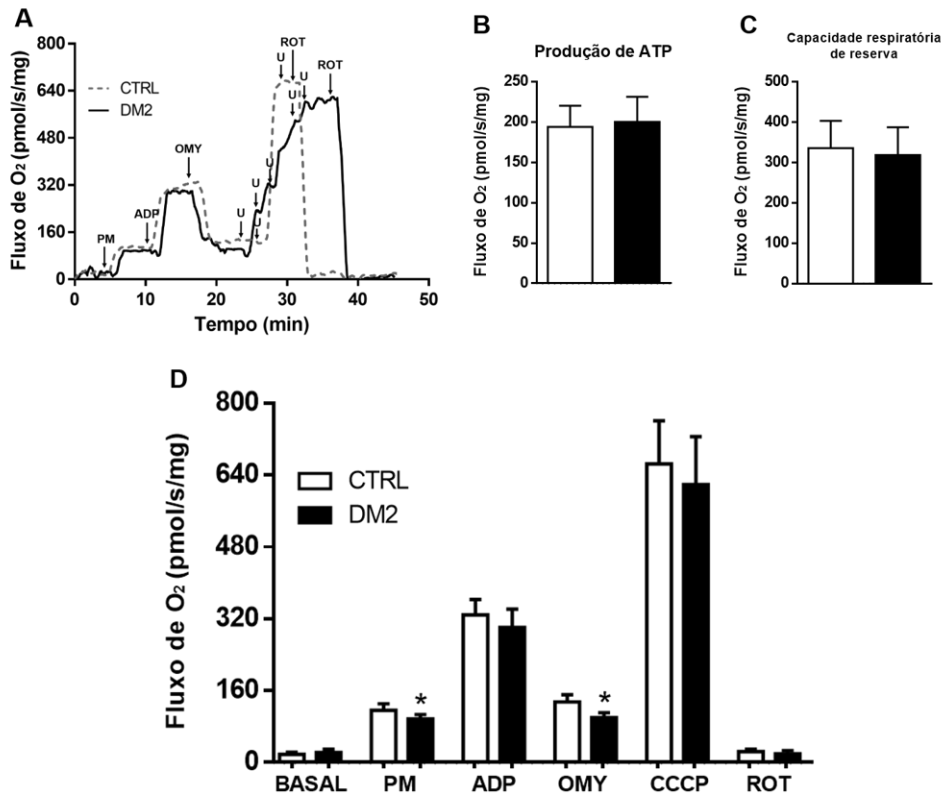
**Figura 9.** Efeito do modelo de DM2 no consumo de O<sub>2</sub> do tecido adiposo marrom. Respirometria de alta resolução para avaliar os estados respiratórios mitocondriais: BASAL (sem substratos), estado 2 (PM), respiração independente de UCP-1 (GDP), estado 4 desacoplado (U=CCCP) e respiração residual (ROT). (A) Traçado representativo do consumo de O<sub>2</sub> pelo tempo ao adicionar os substratos e drogas. (B) Consumo de O<sub>2</sub> relacionada à termogênese via UCP-1, calculado pelo estado 2 - GDP. (C) Capacidade respiratória de reserva, calculada pelo estado 4 desacoplado – estado 2. (D) Fluxo de O<sub>2</sub> (pmol/s/mg) de todos os estados respiratórios. N=6/grupo. Todos os dados expressos por média ± EPM. Análise estatística feita por teste *t student*. \*p<0.05 vs grupo controle.

O fígado é um órgão essencial na regulação da homeostase energética, metabolismo de substâncias e macromoléculas, incluindo carboidratos e lipídios (PETERSEN; VATNER; SHULMAN, 2017). Por ter um papel crucial na homeostase da glicose, também investigamos

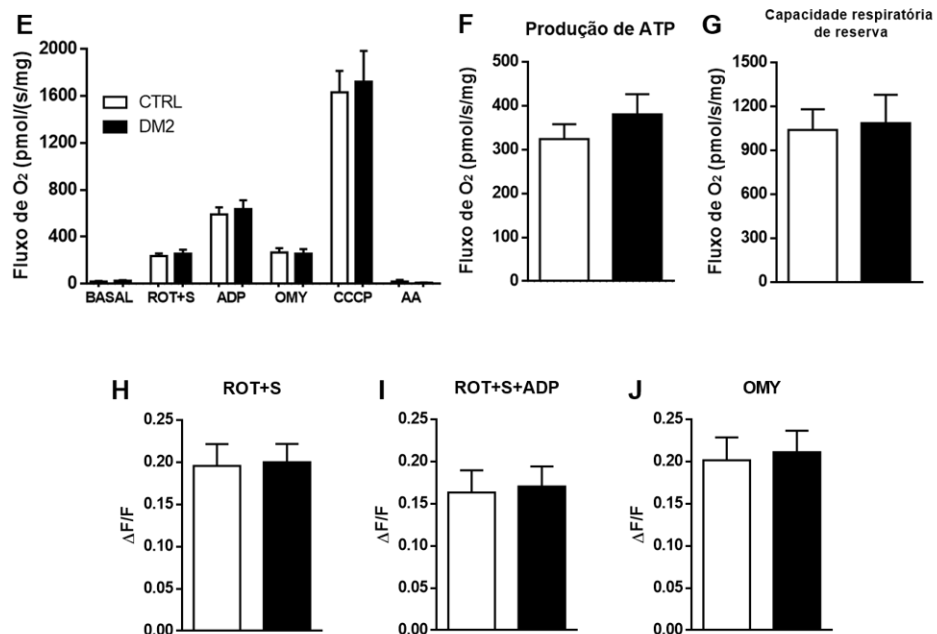
os efeitos do DM2 na bioenergética hepática. As mitocôndrias isoladas foram utilizadas em dois cenários: PM ou ROT+S como substratos. A figura 10A representa o traçado representativo do experimento com substratos relacionados ao complexo 1. Ao utilizar PM, vimos uma redução no consumo de  $O_2$  dos camundongos DM2 nos estados 2 e 4 (Figura 10D), sem diferenças na produção de ATP (Figura 10B) e na capacidade respiratória de reserva (Figura 10C). Esse menor consumo de  $O_2$  no estado 2 revela um possível prejuízo na oxidação de substratos mediada pela NADH desidrogenase. Ao usar ROT+S como substrato, não observamos diferenças no consumo de  $O_2$  (Figura 10G), na produção de ATP (Figura 10E) e na capacidade respiratória de reserva (Figura 10F), reforçando que o problema das mitocôndrias hepáticas de camundongos DM2 jovens pode estar relacionado às enzimas do complexo-1. Também realizamos medições do  $\Delta\psi$  em mitocôndrias hepáticas com substratos ligados ao complexo 2, para avaliar se há algum problema na homeostase da força próton motriz antes do comprometimento do consumo de  $O_2$  neste caso, porém não encontramos diferenças no  $\Delta\psi$  entre camundongos DM2 e CTRL usando ROT+S como substratos (Figuras 10H-J).

## Consumo de oxigênio do fígado

### Substratos relacionados ao complexo 1



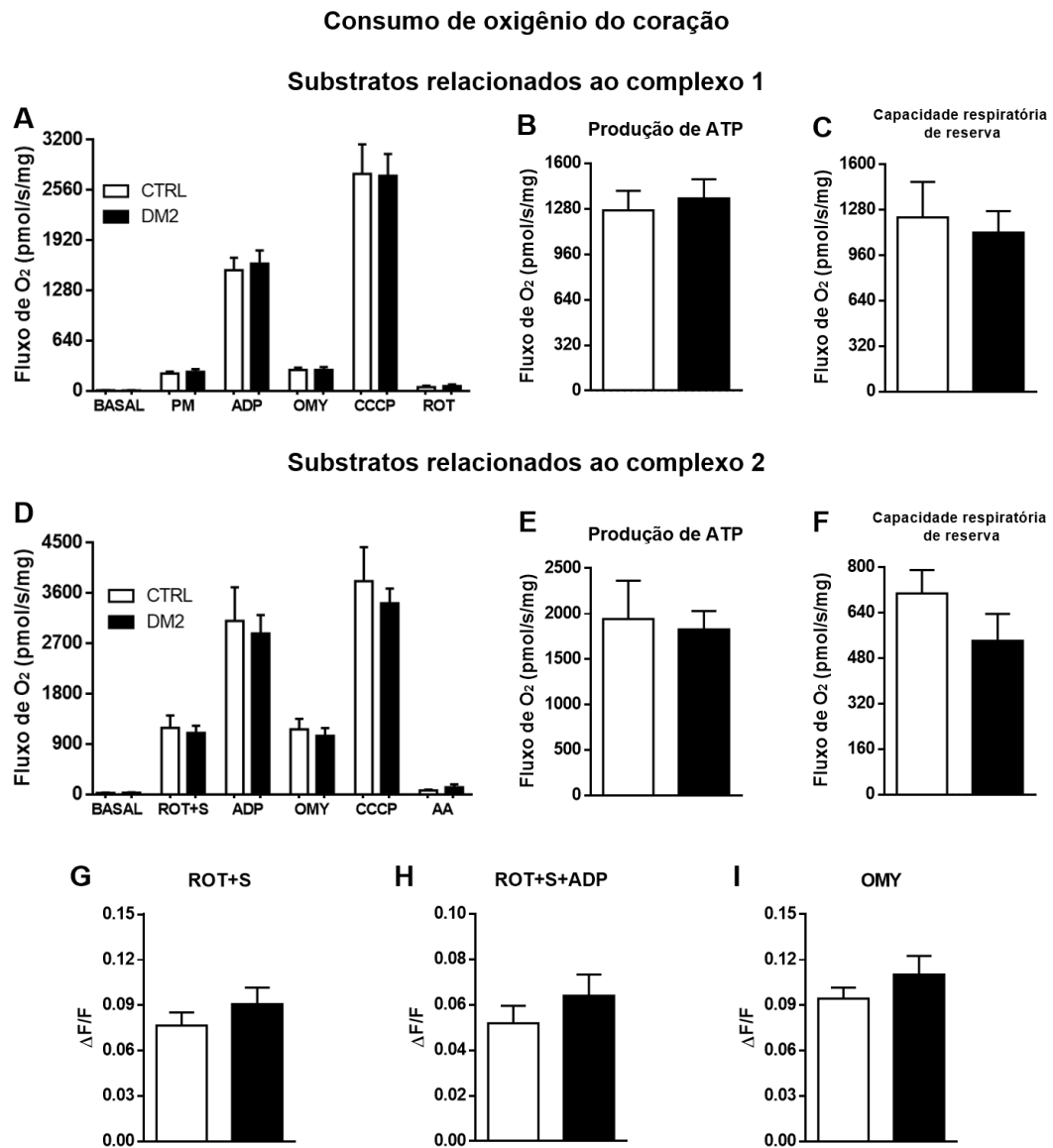
### Substratos relacionados ao complexo 2



**Figura 10.** Efeito do modelo de DM2 no consumo de O<sub>2</sub> de mitocôndrias isoladas do fígado. Respirometria de alta resolução realizada no Oroboros para avaliar os estados respiratórios mitocondriais: BASAL (sem

substrato), estado 2 (PM ou ROT+S), estado 3 (ADP), estado 4 (OMY), estado 4 desacoplado (U = CCCP) e respiração residual (ROT ou AA). (A-D): resultados obtidos com os substratos ligados ao complexo 1 e (E-J) resultados obtidos com os substratos ligados ao complexo 2. (A) Traçado representativo do consumo de O<sub>2</sub> pelo tempo ao adicionar os substratos e drogas relacionados ao complexo 1. (B) e (F) Consumo de O<sub>2</sub> relacionado à produção de ATP, calculado pelo estado 3 - estado 4. (C) e (G) Capacidade respiratória de reserva, calculada pelo estado 4 desacoplado - estado 3. (D) e (E) Fluxo de O<sub>2</sub> (pmol/s/mg) de todos os estados respiratórios. (H-J) – Resultados do potencial de membrana mitocondrial, obtido pela fluorescência da safranina. N=7/grupo para experimentos utilizando substratos ligados ao complexo 1 e N=8/grupo para experimentos utilizando substratos ligados ao complexo 2. Todos os dados expressos por média ± EPM. Análise estatística feita por teste *t student*. \*p<0.05 vs grupo controle.

O coração é um órgão essencial que fornece nutrientes e O<sub>2</sub> aos tecidos via circulação sanguínea. Foi relatado que pessoas diabéticas têm maior risco de insuficiência cardíaca, com disfunção mitocondrial, aumento de ERs, prejuízo no metabolismo de Ca<sup>2+</sup> e na oxidação de ácidos graxos (LEE, W. S.; KIM, 2017). Submetemos mitocôndrias isoladas cardíacas dos camundongos deste estudo com o intuito de saber se essas alterações mitocondriais ocorrem em um modelo de DM2 induzido por DH + STZ precocemente, no início da vida adulta. Não foram encontradas diferenças significativas no consumo de O<sub>2</sub> (Figura 11C), produção de ATP (Figura 11A) e na capacidade de reserva (Figura 11B) de mitocôndrias de ambos os grupos usando PM como substratos. Visto que não encontramos diferenças utilizando PM, investigamos o papel da respiração mediada pelo complexo 2, utilizando ROT+S como substratos, e também não encontramos diferenças no consumo de O<sub>2</sub> (Figura 11F), produção de ATP (Figura 11D) ou capacidade de reserva (Figura 11E), bem como não houve alteração no  $\Delta\psi$  (Figuras 11G-I) indicando que neste modelo de DM2 em camundongos jovens, a bioenergética das mitocôndrias cardíacas parece não ser afetada.



**Figura 11. Efeito do modelo de DM2 no consumo de O<sub>2</sub> de mitocôndrias isoladas do coração.** Respirometria de alta resolução realizada no Oroboros para avaliar os estados respiratórios mitocondriais: BASAL (sem substrato), estado 2 (PM ou ROT+S), estado 3 (ADP), estado 4 (OMY), estado 4 desacoplado (U = CCCP) e respiração residual (ROT ou AA). (A-C): resultados obtidos com os substratos ligados ao complexo 1 e (D-I) resultados obtidos com os substratos ligados ao complexo 2. (A) e (D)- Fluxo de O<sub>2</sub> (pmol/s/mg) de todos os estados respiratórios. (B) e (E)- Consumo de O<sub>2</sub> relacionado à produção de ATP, calculado pelo estado 3 - estado 4. (C) e (F)- Capacidade respiratória de reserva, calculada pelo estado 4 desacoplado - estado 3. (G-I) – Resultados do potencial de membrana mitocondrial, obtido pela fluorescência da safranina. N=9/grupo para experimentos utilizando substratos relacionados ao complexo 1 e N=6/grupo para experimentos utilizando substratos relacionados ao complexo 2. Todos os dados expressos por média ± EPM. Análise estatística feita por teste *t student*. \*p<0.05 vs grupo controle.



## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, induzimos um modelo de DM2, iniciando a alimentação com DH logo após o desmame (D21) e duas doses de STZ nos dias 35 e 36 de vida, para avaliar as consequências de um DM2 induzido muito precocemente em camundongos. Os principais achados deste estudo foram a redução da capacidade cognitiva de camundongos C57BL/6 jovens submetidos ao modelo de DM2, também apresentando alterações neuronais e astrocíticas, associados a alterações na respiração mitocondrial do hipocampo, BAT e fígado.

A reprodução das principais características do DM2 foi eficiente em nosso modelo, visto que o período no qual os camundongos jovens foram expostos à DH (7 semanas), juntamente com as duas doses de STZ culminaram em resistência à insulina e intolerância à glicose, evidenciados pelo TTG, todavia não observamos alteração no peso dos animais e no perfil lipídico.

Apesar de ter sido previamente descrito o aumento do peso corporal com poucas semanas de dieta em animais submetidos a dietas hipercalóricas/hiperlipídicas (JI et al., 2019; LEE, J. H. et al., 2020), outros estudos mostram comprometimento metabólico sem aumento de ganho de peso (DAVIDSON et al., 2012; VINUESA et al., 2019; VINUESA et al., 2016). Além do mais, observamos uma redução no ganho de peso na semana seguinte às injeções de STZ, corroborando dados previamente publicados, que indicam essa perda de peso como consequência à intensa proteólise e lipólise que ocorre em decorrência da substância, especialmente nas células  $\beta$ -pancreáticas (REMOR et al., 2011).

Um fato a ser levado em consideração é que não medimos a adiposidade e os níveis de massa magra dos camundongos. Em nosso modelo, pode estar ocorrendo um remodelamento de massa corporal, com aumento da massa adiposa em detrimento da massa muscular esquelética. Tal remodelamento foi observado em ratos Wistar submetidos a um modelo de DM2 pela ingestão de DH e uma dose 40mg/kg de STZ, que apresentaram uma acentuada redução no peso corporal 3 dias após a injeção de STZ, e após 4 semanas houve um remodelamento de massa corporal, com perda de massa muscular e conteúdo de glicogênio em músculos esqueléticos, em comparação com camundongos submetidos somente à dieta padrão (MAGALHAES et al., 2019). Outros estudos evidenciam intensa perda de até 30% na massa muscular de roedores que receberam doses de STZ (LONDZIN et al., 2018; O'NEILL et al., 2019). Esses dados revelam a relação entre a hiperglicemia e alterações na composição corporal.

Ademais, há uma relação direta entre a redução da massa muscular e a presença de características do DM2. Em humanos, uma maior quantidade de massa muscular relaciona-se com uma menor resistência à insulina (SRIKANTHAN; KARLAMANGLA, 2011).

A DH *per se* provoca alterações na homeostase da glicose e insulina (GAO, P. et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2019). No modelo utilizado em nosso trabalho, além de manter os animais recém desmamados sob DH, também administramos 2 injeções i.p. 40mg/kg de STZ nos dias 35 e 36 de vida, a fim de acelerar o aparecimento das características do DM2 nos camundongos (NATH et al., 2017). A ingestão de DH causa várias alterações metabólicas, que alteram a sensibilidade das ilhotas pancreáticas a agentes tóxicos (NATH; GHOSH; CHOUDHURY, 2017), portanto a ingestão crônica desse tipo de dieta potencializa os efeitos deletérios da STZ. Ademais, doses mais altas de STZ (200mg/kg) causam uma destruição maciça das células  $\beta$ -pancreáticas, sendo um modelo mais parecido com o fenótipo do diabetes mellitus tipo 1 (FURMAN, 2015).

As características de glicemia em jejum elevada e intolerância à glicose, observadas em pacientes diabéticos (KAHN; COOPER; DEL PRATO, 2014), e amplamente descritos em diversos estudos em modelos animais de DM2 (DUTHEIL et al., 2016; SOARES; DUARTE; GRUETTER, 2018; TREVINO et al., 2015; TREVINO et al., 2017) foram reproduzidas no presente modelo de DM2 induzido na infância. Um próximo passo é caracterizar o perfil insulinêmico dos camundongos no modelo de DM2 induzido por DH e STZ. O DM2 é composto por diferentes fases, onde inicialmente ocorre a resistência à insulina e posteriormente pode haver a falência pancreática, com deficiência na secreção da mesma (WEIR; BONNER-WEIR, 2004). Alguns estudos sugerem que pacientes adultos com DM2 são mais propensos a terem resistência à insulina, enquanto pacientes jovens com DM2 não-obesos tem maior tendência a terem uma deficiência na secreção de insulina (CHANG; HALTER, 2003; FINK; KOLTERMAN; OLEFSKY, 1984).

Ademais, alterações na homeostase adiposa podem estar contribuindo diretamente para a hiperglicemia e resistência à insulina, visto que o WAT pode contribuir por cerca de 20% da homeostase glicêmica corporal (MARIN et al., 1987). Quando em dietas hiperlipídicas, o tecido adiposo é capaz de secretar adipocinas inflamatórias e aumentar os níveis de ácidos graxos livres na circulação, prejudicando a cascata de sinalização à insulina e a translocação do receptor GLUT para a membrana, exacerbando a hiperglicemia (MUOIO; NEWGARD, 2008; WHITE, M. F., 2002). Além do mais, curtos períodos de DH promovem

o aumento de ERO no WAT, o que desencadeia a resistência à insulina no tecido acompanhado de hipóxia (LEE, Y. S. et al., 2014; PAGLIALUNGA et al., 2015).

Por outro lado, os níveis lipídicos séricos não foram alterados nos animais DM2. Diversos autores demonstram simultaneamente alterações glicêmicas e lipídicas em modelos de dietas com alta densidade energética (DUTHEIL et al., 2016; MATHE, 1995; NATH et al., 2017; TREVINO et al., 2015), no entanto, alguns autores relataram não haver diferenças no perfil lipídico de animais alimentados com uma DH (WHITE, P. A. et al., 2013), bem como adultos diabéticos não apresentaram alterações no perfil lipídico em comparação com pacientes não-diabéticos (CUI et al., 2019; MOGENSEN et al., 2007; SCHMID et al., 2011).

Interessantemente, alguns autores relataram não haver diferenças no perfil lipídico de roedores que iniciaram a ingestão de DH logo no início da vida, indo de acordo com nossos dados (BOITARD et al., 2014; VINUESA et al., 2016; WHITE, P. A. et al., 2013). Esses dados sugerem que, no início da vida, o animal tenha mecanismos compensatórios que previnam a alteração precoce no perfil lipídico induzidas pela ingesta de DH.

Além disso, o excesso de gorduras ingerido pelos camundongos DM2 pode estar sendo acumulado em outros tecidos além do WAT. Um estudo de Gao e colaboradores realizado em camundongos CD-1 sob DH evidencia o acúmulo de gordura ectópica no BAT e fígado, sem alterações nos níveis de triglicerídeos séricos (GAO, M.; MA; LIU, 2015). É possível que esteja ocorrendo uma realocação de triglicerídeos em nosso modelo, como evidenciado no estudo de Gao e colaboradores. Esse possível acúmulo de gordura no BAT e fígado favorece a disfunção dos mesmos, podendo contribuir diretamente para a manutenção da hiperglicemia através da menor utilização de glicose pelo BAT e maior produção de glicose no fígado (GAO, M. et al., 2015; LAPA et al., 2017; PETERSEN et al., 2017).

### **6.1 Alterações causadas pelo modelo de DM2 no SNC**

Em nosso estudo, observamos que os animais jovens submetidos a uma DH por 7 semanas apresentaram comprometimento cognitivo das memórias de reconhecimento e espacial de curta duração (1,5h entre o treino e o teste) e memória de reconhecimento de longa duração (24h entre o treino e o teste), sem apresentar comportamento tipo-depressivo. A memória de reconhecimento foi avaliada pelo TRNO, na qual o animal possui uma tendência natural de explorar um objeto novo quando este é apresentado simultaneamente com um objeto previamente explorado. Esse tipo de memória está relacionada com a ativação de várias áreas cerebrais, incluindo o córtex pré-frontal e da formação hipocampal (BARKER; WARBURTON, 2011). O TRLO é um teste que nos fornece indicadores qualitativos da

memória espacial, baseado no fato dos animais explorarem por mais tempo um objeto familiar quando está em uma nova localização, e é altamente dependente das funções hipocampais (BACHEVALIER; NEMANIC, 2008).

Embora o peso do cérebro represente apenas 2% da massa corporal total, ele requer aproximadamente 25% de toda a glicose corporal para manter suas funções normais (BELANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011). Vários autores demonstraram a relação entre dietas desequilibradas, sendo elas hipercalóricas (TREVINO et al., 2015), hiperlipídicas (YANG et al., 2019) e dietas ocidentais (HARGRAVE et al., 2016), com o desenvolvimento do comprometimento cognitivo e resistência ou deficiência na sinalização de insulina no SNC (DE LA MONTE; WANDS, 2008; GARCIA-SERRANO; DUARTE, 2020).

O processo de aquisição e armazenamento de informações envolve diversos neurotransmissores e sinapses entre várias estruturas cerebrais, dentre elas o hipocampo, córtex entorrinal e a amígdala. O hipocampo é uma estrutura altamente plástica, muito relacionada com memória, aprendizado e controle emocional, sendo particularmente sensível a estressores ambientais e nutricionais (GARCIA-SERRANO; DUARTE, 2020). O comprometimento de memórias dependente do hipocampo é frequente em modelos de diabetes e/ou DH em roedores, sendo vistos pior desempenho em testes de memória espacial (BOITARD et al., 2014; TREVINO et al., 2015; ZHENG; ZHENG; WANG; et al., 2017), de reconhecimento (DUTHEIL et al., 2016; TREVINO et al., 2017), e na memória aversiva (YANG et al., 2019). Em humanos, o DM2 reduz a memória declarativa verbal, a velocidade de processamento de informações (MANSCHOT et al., 2007), memória visual e o planejamento (MORAN et al., 2013). Nossos dados em camundongos são consistentes com os relatos da associação entre o DM2 e a piora na memória espacial e de reconhecimento.

A DH, obesidade e DM2 também tem sido frequentemente associados à transtornos de humor como ansiedade em depressão, tanto em roedores (DUTHEIL et al., 2016; PAULA, 2020) quanto em humanos (SEMENKOVICH et al., 2015; SIMON et al., 2008). Entretanto, Dutheil e colaboradores evidenciaram que ratos submetidos à DH não apresentaram comportamento tipo depressivo e tipo ansioso após 8 semanas de tratamento. Porém, esses mesmos animais apresentaram essas alterações de humor ao final da décima sexta semana de DH (DUTHEIL et al., 2016). Nesta mesma linha, nosso modelo de DH por 7 semanas não elicitou alterações hedônicas, indicando que talvez estas sejam mais frequentes após um período maior de exposição à DH e a manutenção do quadro diabético.

O comprometimento cognitivo se apresenta como uma consequência de vários eventos celulares intensificados pela hiperglicemia e hiperinsulinemia, que ocorrem por longos

períodos, culminando em perda neuronal, ativação de células inflamatórias e prejuízo na função da barreira hematoencefálica (CALVO-OCHOA et al., 2014). O DM2 e o consumo crônico de DH comprometem a fisiologia de diversos órgãos, como pâncreas (NATH et al., 2017), tecidos adiposos (LUMENG; BODZIN; SALTIEL, 2007) fígado (KOLIAKI et al., 2015; TANG et al., 2017) e cérebro (DUTHEIL et al., 2016), induzindo inflamação local e sistêmica e disfunção mitocondrial (DUTHEIL et al., 2016; KOLIAKI et al., 2015; TREVINO et al., 2015).

Dentre os fatores que contribuem para a disfunção cognitiva, a neuroinflamação, que envolve a ativação de células da glia (astrócitos e micróglia) e elevada expressão de proteínas pró-inflamatórias no SNC, tem sido amplamente apontada como um possível mecanismo indutor de disfunção da barreira hematoencefálica e morte neuronal. Estudos em roedores vem demonstrando a relação de DH e/ou DM2 favorecendo a neuroinflamação (DUTHEIL et al., 2016; TREVINO et al., 2015), bem como perda de plasticidade sináptica e diminuição da ramificação dendrítica (TREVINO et al., 2017; YANG et al., 2019).

Nesse estudo, investigamos a participação do processo neuroinflamatório nas alterações encontradas através da imunomarcagem de astrócitos no hipocampo. A função cerebral requer um suprimento constante de glicose e O<sub>2</sub> e uma regulação metabólica adequada entre neurônios e astrócitos (GARCIA-SERRANO; DUARTE, 2020). O prejuízo na homeostase astrócito-neurônio prejudica o aporte energético e a morfologia neuronal, facilitando o acúmulo de neurotoxinas. Esses fatores combinados contribuem para a manutenção do microambiente inflamatório e disparam a disfunção sináptica e mitocondrial, levando à morte neuronal e alterações fenotípicas cognitivas (GUILLAMON-VIVANCOS et al., 2015). Em nosso modelo, os animais DM2 apresentaram aumento na área marcada de GFAP, proteína do citoesqueleto de astrócitos, nas regiões CA1 e GD hipocampais, o que demonstra uma hiperatividade desses astrócitos. Além disso, menor área marcada de NeuN, proteína específica de neurônios, na região CA1 hipocampal também foi observado em camundongos DM2. A partir desses dados, obtivemos uma razão entre as populações celulares avaliadas neste estudo, e observamos que há uma diminuição da relação proporcional entre a quantidade de neurônios em relação a de astrócitos nas regiões hipocampais, sugerindo que esteja acontecendo um remodelamento celular no hipocampo.

Trevino e colaboradores (2015) evidenciaram maior número de astrócitos reativos no córtex temporal e no hipocampo de ratos Wistar com um modelo de DM2 induzida por dieta hipercalórica, e concomitante prejuízo na memória espacial (TREVINO et al., 2015). Esse processo de astrogliose hipocampal inicia-se pouco tempo após a introdução de um estímulo

estressor, sendo evidentes após 4 semanas de DH em camundongos *swiss* (PAULA, 2020) e após uma semana de DH + frutose em ratos Sprague Dawley (CALVO-OCHOA et al., 2014).

Um estudo de duas décadas atrás avaliou o cérebro *post mortem* de humanos que sofriam de amnésia retrógrada e anterógrada, e além de várias perdas neuronais na região hipocampal, ativação de células da glia se fez presente no núcleo mamilar, globus pallidus e amígdala, estruturas que fazem conexões direta com o hipocampo (REMPEL-CLOWER et al., 1996). Esse excesso de astrócitos reativos pode ser uma consequência de um elevado metabolismo oxidativo, necessário para sustentar a hiper-reatividade dos astrócitos induzida pelo DM2, e apesar desse alto metabolismo, o suporte metabólico de astrócitos para neurônios é inadequado, contribuindo para disfunções sináptica e cognitiva. (GARCIA-SERRANO; DUARTE, 2020).

Além dos astrócitos, nossos dados demonstram que o DM2 provocou alteração na densidade neuronal na região CA1 dos camundongos. A perda de neurônios piramidais na região hipocampal está relacionada com a perda de memória, e dificuldade em armazenar novas informações por períodos prolongados (REMPEL-CLOWER et al., 1996). Além da perda neuronal, outras alterações neuronais hipocampais observadas em modelos de DM2 ou submetidos à DH são a redução de marcadores de sinapse (CARVALHO et al., 2015; PAULA, 2020), redução da ramificação dendrítica (TREVINO et al., 2017) e prejuízo na potenciação de longa duração (YANG et al., 2019). Todo esse comprometimento neuronal prejudica a qualidade das sinapses, que são essenciais para o processo de aquisição, consolidação e evocação de informações, e refletem em uma pior memória e aprendizado (REMPEL-CLOWER et al., 1996; YANG et al., 2019).

A importância da homeostase de glicose cerebral é confirmada em um estudo de Soares e colaboradores, no qual ratos resistentes à insulina demonstraram deficiência no metabolismo de glicogênio em astrócitos hipocampais, dificultando o suprimento energético aos neurônios (SOARES et al., 2019), uma vez que o glicogênio dos astrócitos é necessário para a plasticidade sináptica, formação e consolidação de memórias (DURAN et al., 2013).

Essas deficiências no suprimento energético estão diretamente relacionados com a função mitocondrial, que está alterada em patologias neurodegenerativas (CHEN; TURNBULL; REEVE, 2019; DE LA MONTE; WANDS, 2008; LUQUE-CONTRERAS et al., 2014; TREVINO et al., 2015), e em doenças crônicas, sendo notadas alterações de função mitocondrial bem precoce, antes do aparecimento das características clínicas ou histológicas dessas doenças (KOLIAKI et al., 2015; TREVINO et al., 2015).

O processo energético de produção de ATP a partir de substratos (glicose ou triglicerídeos) ocorre em várias etapas, que convergem na CTE (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012). Em nosso estudo, mostramos que os camundongos DM2 possuem mitocôndrias hipocâmpais menos eficientes, evidenciado pela redução do consumo de O<sub>2</sub> com substratos para o complexo I (piruvato/malato) ou para o complexo II (succinato + rotenona) no estado 3 (fosforilante, na presença de ADP) e 4 desacoplado (CCCP), sem alterações no potencial de membrana mitocondrial. Como consequência, as mitocôndrias hipocâmpais dos camundongos DM2 produzem menos ATP nas mesmas concentrações de substratos que as mitocôndrias CTRL, além de possuírem uma menor capacidade de reserva respiratória, caracterizando um estado de disfunção mitocondrial.

Menor produção de ATP está diretamente relacionado com a disfunção celular e alterações fenotípicas. Os neurônios direcionam o ATP produzido para a formação de sinapses, sendo que a quantidade e força dessas interconexões neuronais definem a plasticidade sináptica, responsável pela função cognitiva (LEJRI et al., 2019). Dados prévios de nosso grupo demonstram uma menor atividade da CTE como um todo, com uma acentuada redução na produção de ATP em células hipocâmpais de camundongos *swiss* submetidos a um mês de DH. Essas alterações mitocondriais foram associadas com disfunção sináptica e cognitiva (PAULA, 2020).

Estudos prévios em roedores demonstram que modelos animais de DM2 apresentam menor atividade do ciclo do ácido cítrico no cérebro (SICKMANN et al., 2010) e, consequentemente, menos NADH e FADH<sub>2</sub> disponíveis para a geração de ATP (ZHENG; ZHENG; ZHAO; et al., 2017). Além disso, camundongos com resistência à insulina apresentaram menor expressão de GLUT1 hipocâmpal (SOARES et al., 2019), e GLUT 3 e 4 neuronal (LIU, Z. et al., 2015). Esses dados sugerem que as alterações na utilização e disponibilidade de glicose celular pode ocasionar um menor metabolismo oxidativo, sendo muito prejudicial ao metabolismo energético neuronal e às sinapses.

Carvalho e colaboradores fizeram experimentos em paralelo em camundongos resistentes à insulina e em um modelo de Alzheimer. A diminuição da produção de ATP e alteração no potencial de membrana mitocondrial cerebral, bem como redução da expressão de proteínas de biogênese mitocondrial e de marcadores sinápticos hipocâmpais foram observados em ambos modelos experimentais (CARVALHO et al., 2015). Nossos dados corroboram a hipótese de que as alterações mitocondriais causadas pelo DM2 estão

associadas ao declínio cognitivo e complicações relacionadas, como menor densidade neuronal e plasticidade sináptica.

Muitas células operam em seu metabolismo basal, solicitando apenas uma parte de sua capacidade energética máxima. Em neurônios, apenas 6% da capacidade respiratória máxima é utilizada em repouso, enquanto neurônios muito ativos utilizam acima de 80% da mesma (SCOTT; NICHOLLS, 1980).

O termo capacidade de reserva respiratória é usado para descrever a quantidade de ATP extra que pode ser produzida pela fosforilação oxidativa no caso de um aumento repentino na demanda energética. Quando a reserva respiratória não é suficiente para fornecer o ATP necessário, a célula é pré-disposta a processos de senescência e morte (DESLER et al., 2012). A exaustão da capacidade de reserva está relacionada com doenças neurodegenerativas (NICHOLLS, 2008), além de serem mais suscetíveis ao estresse oxidativo e metabólico (SRISKANTHADEVAN et al., 2015; YAMAMOTO, H. et al., 2016).

Em nosso estudo, observamos uma redução do consumo de O<sub>2</sub> no estado 4 desacoplado com ambos os substratos, e uma menor reserva respiratória no hipocampo de camundongos DM2. O desacoplamento da fosforilação oxidativa neuronal ocorre fisiologicamente mediado pela proteína desacopladora 2 (*uncoupled protein 2*, UCP-2), e tem sido proposto um papel benéfico da ativação UCP-2 como sendo neuroprotetora, reduzindo o excesso de ER nos neurônios (FISLER; WARDEN, 2006).

Nossos dados sugerem que essa diminuição da capacidade de reserva no homogenato de hipocampo dos camundongos DM2 seja uma consequência da hiperglicemia sustentada e excesso calórico presente em nosso modelo. Dados de Cerqueira e colaboradores dão suporte a essa hipótese, visto que a restrição calórica em camundongos *swiss* aumenta a reserva respiratória em neurônios cerebelares, ressaltando a participação da quantidade calórica ingerida na bioenergética mitocondrial (CERQUEIRA et al., 2012).

A função mitocondrial em neurônios é fundamental para o suporte da maquinaria sináptica, sendo considerada fator limitante da sinaptogênese e plasticidade neuronal (LUQUE-CONTRERAS et al., 2014). Tendo em vista nossos resultados, sugerimos que alterações respiratórias e oxidativas no hipocampo contribuem diretamente para o declínio cognitivo observado nos camundongos DM2.



## 6.2 Alterações causadas pelo modelo de DM2 em tecidos periféricos

Ao contrário do tecido adiposo branco, que armazena energia como gotículas lipídicas e triglicerídeos, o BAT controla o gasto de energia por meio da termogênese, sendo ativado durante a exposição ao frio ou por estímulo  $\beta$ -3 adrenérgico, aumentando a taxa de oxidação de substratos para a geração de calor através da UCP-1 (LEE, J. H. et al., 2019).

Nossos dados de respirometria demonstram um padrão respiratório completamente alterado em homogenato de BAT dos camundongos DM2. Enquanto o consumo de  $O_2$  do BAT dos animais CTRL está destinado a termogênese (observado pela diminuição quase completa da respiração por adição do GDP), o padrão respiratório é completamente diferente em camundongos DM2. Observamos que a respiração do BAT dos animais DM2 não está completamente associada à termogênese, já que após a inibição da UCP-1 (por GDP) ainda existe consumo de  $O_2$  vinculado ao complexo I. Neste sentido, verificamos uma diminuição na termogênese no BAT de camundongos DM2. Além disso, apesar de não haver diferenças na respiração máxima entre ambos os grupos experimentais, constatamos que o BAT dos camundongos DM2 possuem uma reserva respiratória que é inexistente em camundongos CTRL. Outros estudos demonstram uma redução geral do metabolismo mitocondrial do BAT de roedores alimentados com dietas obesogênicas (GAO, P. et al., 2020; PAJUELO et al., 2012).

A UCP-1 é a principal proteína responsável pela termogênese no BAT, e quando ativada permite maior velocidade do fluxo de prótons do EIM para a matriz mitocondrial, o que reduz a produção de EROs, diminui o  $\Delta\psi$  e conseqüentemente aumenta a taxa de oxidação de substratos (BRONDANI et al., 2012; LIU, J. et al., 2013). O consumo de dietas obesogênicas, bem como a obesidade *per se* promove alterações na expressão de UCP-1, refletindo em uma menor capacidade termogênica em roedores (MARTINS et al., 2017; PAJUELO et al., 2012) e em humanos (ORAVA et al., 2013).

As disfunções metabólicas causadas por uma DH são revertidas pela ativação do BAT. O transplante de BAT em camundongos submetidos à DH preveniu o aumento do peso e melhorou a tolerância à glicose nesses animais, com aumento da quantidade do fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21) sérico e no BAT (adipocina liberada pelo BAT quando ativado e essencial para a termogênese) (STANFORD et al., 2013). A infusão de FGF21 no cérebro melhorou a sensibilidade à insulina e taxa metabólica, comprometidas pela obesidade induzida pela dieta (SARRUF et al., 2010). Esses dados demonstram que a modulação do BAT afeta diretamente o metabolismo energético corporal.

A ação fisiológica do BAT é extremamente prejudicada no DM2. Estudos em humanos mostram que a ativação do BAT está relacionada com maior sensibilidade à insulina em pacientes diabéticos (HANSSEN et al., 2015) e maior captação da glicose sanguínea para a termogênese (CHONDRONIKOLA et al., 2014). Em um estudo utilizando um modelo de DM2 em ratos, menor expressão e marcação de UCP-1 e mitocôndrias foram observados nesses animais, além de maior acúmulo de corpúsculos lipídicos no BAT (LAPA et al., 2017).

Considerando que o BAT tem papel hipoglicemiante quando ativado, acreditamos que o DM2 cause uma inativação deste tecido, fazendo com que o BAT contribua para a exacerbação das consequências do DM2 através de uma menor utilização de substratos em seus processos metabólicos e termogênicos.

A maior capacidade de reserva energética no BAT de camundongos DM2 é outro parâmetro que indica disfunção do tecido. Whittle e colaboradores demonstraram que o aumento da respiração desacoplada no BAT de animais alimentados com DH, independente da atividade da UCP-1, é um mecanismo compensatório para evitar ganho de peso e resistência à insulina (WHITTLE; LOPEZ; VIDAL-PUIG, 2011). Porém, como consequência desse mecanismo compensatório, a produção de EROs é aumentada em processos independentes de UCP, o que aumenta a chance de danos às proteínas e peroxidação lipídica (LEE, J. H. et al., 2020).

Tendo em vista que o tecido adiposo é altamente plástico, alguns autores sugerem que o BAT é capaz de se transdiferenciar em WAT, e vice versa, dependendo do estímulo (GESTA; TSENG; KAHN, 2007; GIL et al., 2011). Tendo em vista nossos dados de disfunção do BAT, é possível que esteja ocorrendo o processo de *branqueamento* no BAT de camundongos DM2. Do ponto de vista bioenergético, nesse processo o tecido assume características que o assemelham ao tecido adiposo branco ou bege, tornando-o menos termogênico (PORTER et al., 2016) e aumentando a estocagem de gordura (GAO, P. et al., 2020; LAPA et al., 2017; LEE, J. H. et al., 2019).

Nossos dados sugerem uma conexão entre a disfunção do BAT e as alterações cerebrais que levam à disfunção cognitiva. A disfunção do BAT causada pelo DM2 reduz a utilização de glicose e triglicerídeos, bem como a capacidade termogênica deste tecido, trazendo como consequência a desregulação metabólica. Paralelamente, ocorre ativação inflamatória sistêmica e diminuição do potencial anti-inflamatório do BAT, favorecendo danos sistêmicos e cerebrais causados pela hiperglicemia

Modelos animais de DM2 produzem características histológicas no coração e fígado consistentes com cardiomiopatia e esteatose (NATH et al., 2017). Além disso, a ingestão

prolongada de uma DH causa alterações cardíacas que podem atuar diretamente no coração, alterando o metabolismo cardíaco, ou indiretamente, como resultado de obesidade e patologias associadas, a exemplo de hipertensão e DM2 (LITTLEJOHNS et al., 2014). No coração diabético, arritmias ventriculares são comumente vistas e têm forte ligação com a inflamação, especialmente com a sobrecarga de interleucina-1 $\beta$  devido à inflamação sistêmica de baixo grau (MONNERAT-CAHLI et al., 2014).

Além do cunho imunológico, a disfunção mitocondrial está presente em distúrbios contráteis dos cardiomiócitos. Evidências sugerem que o aumento de EROs mitocondriais, juntamente com maior taxa de desacoplamento da fosforilação oxidativa em cardiomiócitos contribuem para as disfunções contráteis, alterando sua a dinâmica de Ca<sup>2+</sup> (LITTLEJOHNS et al., 2014). Em nosso estudo, não houveram alterações em parâmetros respiratórios de mitocôndrias isoladas do coração de camundongos DM2, comparados com CTRL.

Estudos prévios mostram remodelamento cardíaco pelo excesso de lipídeos no coração de camundongos C57BL/6 alimentados com DH que não se tornam obesos. Esses dados sugerem que as alterações funcionais cardíacas são precedentes à obesidade, sugerindo que ocorra esse remodelamento cardíaco associado a grandes alterações na função energética (LITTLEJOHNS et al., 2014). Os efeitos da DH no coração incluem a redução de proteínas antioxidantes como a SOD2, alterações em proteínas de dinâmica mitocondrial (fissão e fusão) (LITTLEJOHNS et al., 2014), maior produção de EROs, menor produção de ATP (SVERDLOV et al., 2015) e alterações no consumo de O<sub>2</sub> das mitocôndrias cardíacas (COLE et al., 2011).

Cole e colaboradores demonstraram que ratos submetidos à uma DH por 3 semanas tiveram um aumento do consumo de O<sub>2</sub> no coração, utilizando palmitoil carnitina como substratos, sem diferenças no consumo de O<sub>2</sub> quando PM são os substratos disponíveis, o que está de acordo com nossos dados. Esse aumento do consumo de O<sub>2</sub> foi realizado pela proteína desacopladora 3 (UCP-3), o que reduz a eficiência fosforilativa mitocondrial em cardiomiócitos, e pode estar associado à regulação positiva causada pelas enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos, uma vez que há mais lipídeos circulantes devido à dieta (COLE et al., 2011).

Esse deslocamento da utilização de substratos para a preferência pela utilização de substratos lipídicos ao invés de glicose é uma alteração frequente no DM2 em que há resistência à insulina, dificultando ainda mais o metabolismo glicídico. O aumento da

oxidação de ácidos graxos está associado com aumento de EROs e peroxidação lipídica, levando à danos mitocondriais com presença de desacoplamento da fosforilação oxidativa nos cardiomiócitos (LEE, W. S.; KIM, 2017).

Já outros estudos demonstraram não haver diferenças na respirometria cardíaca após 2 (BARBA et al., 2017) ou 15 semanas de ingestão de DH por camundongos (LITTLEJOHNS et al., 2014). Neste sentido, acreditamos que a ausência de alterações respiratórias cardíacas em nosso protocolo experimental pode ser relativa a baixa idade dos animais e ao curto período de exposição à DH. Entender a fisiologia mitocondrial é essencial para entendermos o metabolismo energético e o metabolismo de  $Ca^{2+}$  nessas células metabolicamente ativas, portanto caracterizar o período em que alterações mitocondriais ocorrem no DM2 nos dará um melhor entendimento da cronologia de eventos que precedem as alterações estruturais e funcionais de células cardíacas.

A ingestão de uma DH induz o desenvolvimento de obesidade, hiperinsulinemia, hiperglicemia e dano hepático em animais, fenótipo similar ao visto em humanos (RECENA AYDOS et al., 2019). O fígado é responsável por cerca de 90% de toda a produção endógena de glicose e é essencial para sua homeostase sistêmica (PETERSEN et al., 2017).

Nos casos de DM2 causada por DH, os lipídeos em excesso causam resistência à insulina hepática, elevando a produção hepática de glicose em condições fisiológicas basais. Esse excesso de glicose desregula não apenas o metabolismo glicídico hepático, mas do corpo inteiro. No fígado, maior produção de glicose está diretamente relacionada com a quantidade intra-hepática de triglicerídeos através da lipogênese *de novo*, que eleva os riscos de desenvolver DHGNA devido à exposição prologada de DH (PETERSEN et al., 2017). Os hepatócitos contém em média entre 500 e 4000 mitocôndrias por célula e acredita-se que uma redução na sua capacidade oxidativa, especialmente de ácidos graxos, pode contribuir para a esteatose (MEEX; WATT, 2017).

Em nosso estudo, avaliamos o consumo de  $O_2$  em mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos DM2 adultos. Nossos dados configuram a situação de disfunção mitocondrial hepática induzida pelo DM2. Especificamente, vimos redução no consumo de  $O_2$  vinculado a oxidação de substratos do complexo I (piruvato/malato) no estado 2 (não fosforilante) e estado 4 (após inibição por oligomicina). Jha e colaboradores traçaram um paralelo entre as alterações hepáticas em camundongos *swiss* com obesidade induzida por DH e outro grupo consumindo DH + injeções de STZ. Ambos os camundongos apresentaram alterações em

enzimas hepáticas, menor capacidade antioxidante e menor atividade dos complexos respiratórios, incluindo o complexo 1 (JHA; MITRA MAZUMDER, 2019).

A menor atividade dos complexos, evidenciado no trabalho de Jha e colaboradores, bem como o menor consumo de  $O_2$  com substratos relacionado ao complexo 1, visto em nosso trabalho demonstra uma menor capacidade oxidativa das mitocôndrias hepáticas de camundongos DM2. Esse achado pode ser uma consequência de um deslocamento metabólico para a glicólise e fermentação láctica, reduzindo a eficiência mitocondrial na geração de energia, bem como a maior formação de lactato, que estimula a inflamação periférica e contribui diretamente para o dano tecidual (JHA; MITRA MAZUMDER, 2019).

No estudo de tecidos provenientes de biopsia hepática de humanos, pacientes com obesidade mórbida com ou sem DHGNA apresentaram regulação positiva da respiração mitocondrial, com aumento no consumo de  $O_2$  no estado 3 e no estado 4 desacoplado, tanto em preparações do tipo biopsia quanto em mitocôndrias isoladas. Apesar desse aumento da capacidade oxidativa, essas mitocôndrias apresentam uma menor razão de controle respiratória (razão ADP/OMY) e aumento de peroxidação lipídica, sugerindo que a obesidade diminui a eficiência fosforilativa, aumenta EROs e os danos oxidativos (KOLIAKI et al., 2015).

Além disso, estudos feitos em pacientes com DM2 evidenciam menor produção de ATP hepático em relação a pacientes não-diabéticos, e essa redução aconteceu sem sinais evidentes de qualquer doença hepática (SCHMID et al., 2011; SZENDROEDI et al., 2009).

Dados previamente publicados evidenciaram a redução no consumo de  $O_2$  nos estados 3 e 4 de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos sob uma DH, utilizando tanto substratos glicídicos (derivados do ciclo do ácido cítrico), quanto substratos lipídicos. (HULBERT et al., 2005; RAFFAELLA et al., 2008). Uma redução no estado 4 reflete um menor vazamento de prótons do EIM. Um dos papéis fisiológicos do vazamento de prótons é a manutenção do  $\Delta\psi$  abaixo do limite crítico para a produção de ERs. Embora o gradiente de prótons seja essencial para a formação de ATP, quando a OMY está presente, há maior quantidade de prótons no EIM e conseqüente maior potencial de membrana, o que pode facilitar a reação destes prótons com o  $O_2$ , formando EROs e causando danos diretos à membrana mitocondrial (JASTROCH et al., 2010; KORSHUNOV; SKULACHEV; STARKOV, 1997). Os camundongos DM2 apresentaram uma redução no estado 4 e conseqüente menor vazamento de prótons, o que

pode permitir uma maior susceptibilidade à formação de ERs devido a maior quantidade de prótons no EIM.

Todos esses estudos em pacientes diabéticos e em modelos animais submetidos à uma DH com presença de resistência à insulina demonstram que há um comprometimento mitocondrial, especialmente na produção de ATP e EROs hepático de pacientes e em animais adultos. Este trabalho traz evidências de que redução da capacidade respiratória no estado 2 de mitocôndrias hepáticas alimentadas com PM acomete camundongos DM2 adultos, submetidos a uma DH iniciada muito precocemente na vida do animal. Nossos dados sugerem um possível papel da NADH desidrogenase (enzima do complexo 1) na patogênese da disfunção mitocondrial hepática no modelo de DM2 precoce, uma vez que não houve alteração no consumo de O<sub>2</sub> quando utilizados substratos que atuam diretamente no complexo 2 da cadeia respiratória. Essas alterações no metabolismo energético hepático e resistência à insulina no fígado podem preceder o desenvolvimento de esteatose no fígado de pacientes com DM2 (SZENDROEDI et al., 2009).

Este trabalho reitera os impactos negativos da ingesta de DH prolongada, e um conseqüente DM2, em diversos tecidos, e especialmente a associação da disfunção de tecidos periféricos com a disfunção observada no SNC. É importante ressaltar que essas alterações ocorrem de maneira precoce, se a introdução de uma DH também ocorre nos estágios iniciais da vida. Nosso trabalho evidencia alterações na energética celular central e periférica causadas pela hiperglicemia, e destaca a importância de uma maior exploração da fisiologia mitocondrial, já que sua função aparenta ser amplamente modificada no organismo devido às características do DM2.

## 7 CONCLUSÃO

Com este trabalho podemos concluir que animais recém desmamados quando submetidos à um modelo de DM2 até a fase de jovens adultos apresentam disfunção do metabolismo de glicose e resistência à ação da insulina, sem alteração no peso corpóreo e no perfil lipídico. Esses animais não apresentam comportamento tipo depressivo, todavia demonstraram pior memória espacial e de reconhecimento, altamente dependentes das funções hipocâmpais, além de maior área de astrócitos e menor área de neurônios, acompanhados de disfunção mitocondrial no hipocampo.

Além disso, os camundongos DM2 apresentaram disfunções mitocondriais em tecidos essenciais na regulação do gasto e homeostase de moléculas energéticas no organismo, como o BAT e o fígado, sem apresentarem alterações mitocondriais cardíacas. Visto que o DM2 afeta diversos tecidos, neste estudo demonstramos um papel integrado de alteração em tecidos periféricos e como essas alterações exacerbam os danos causados pelo DM2 no SNC. A perspectiva para continuidade desse estudo é a caracterização do perfil inflamatório desses tecidos, bem como propor uma intervenção direcionada à mitocondria, que atue em tecidos periféricos, reduzindo a inflamação e disfunção tecidual periférica, e com isso, reverter, pelo menos parcialmente, os danos cognitivos e celulares causados pelo DM2 no SNC.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINGE, J. A. et al. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. **Behav Brain Res**, v. 167, n. 1, p. 183-95, Feb 15 2006.
- ALZOUBI, K. H. et al. Melatonin prevents memory impairment induced by high-fat diet: Role of oxidative stress. **Behav Brain Res**, v. 336, p. 93-98, Jan 15 2018.
- BACHEVALIER, J.; NEMANIC, S. Memory for spatial location and object-place associations are differently processed by the hippocampal formation, parahippocampal areas TH/TF and perirhinal cortex. **Hippocampus**, v. 18, n. 1, p. 64-80, 2008.
- BARBA, I. et al. High-fat diet induces metabolic changes and reduces oxidative stress in female mouse hearts. **J Nutr Biochem**, v. 40, p. 187-193, Feb 2017.
- BARKER, G. R.; WARBURTON, E. C. When is the hippocampus involved in recognition memory? **J Neurosci**, v. 31, n. 29, p. 10721-31, Jul 20 2011.
- BAUER, C. C. et al. Child overweight and obesity are associated with reduced executive cognitive performance and brain alterations: a magnetic resonance imaging study in Mexican children. **Pediatr Obes**, v. 10, n. 3, p. 196-204, Jun 2015.
- BELANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metab**, v. 14, n. 6, p. 724-38, Dec 7 2011.
- BIRD, C. M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 3, p. 182-94, Mar 2008.
- BODEN, G.; CHEN, X. Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. **J Clin Invest**, v. 96, n. 3, p. 1261-8, Sep 1995.
- BODEN, G. et al. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. **J Clin Invest**, v. 93, n. 6, p. 2438-46, Jun 1994.
- BODEN, G. et al. FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 1, p. E12-9, Jul 2002.
- BOITARD, C. et al. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. **Brain Behav Immun**, v. 40, p. 9-17, Aug 2014.



BOITARD, C. et al. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. **Hippocampus**, v. 22, n. 11, p. 2095-100, Nov 2012.

BRONDANI, L. A. et al. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 56, n. 4, p. 215-25, Jun 2012.

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. 1001-8, Jun 2014.

CARVALHO, C. et al. Alzheimer's disease and type 2 diabetes-related alterations in brain mitochondria, autophagy and synaptic markers. **Biochim Biophys Acta**, v. 1852, n. 8, p. 1665-75, Aug 2015.

CASTRO, A. V. et al. Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 58, n. 6, p. 600-9, Aug 2014.

CERQUEIRA, F. M. et al. Calorie restriction increases cerebral mitochondrial respiratory capacity in a NO\*-mediated mechanism: impact on neuronal survival. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 7, p. 1236-41, Apr 1 2012.

CHANG, A. M.; HALTER, J. B. Aging and insulin secretion. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, n. 1, p. E7-12, Jan 2003.

CHEN, C.; TURNBULL, D. M.; REEVE, A. K. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease-Cause or Consequence? **Biology (Basel)**, v. 8, n. 2, May 11 2019.

CHONDRONIKOLA, M. et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. **Diabetes**, v. 63, n. 12, p. 4089-99, Dec 2014.

COLE, M. A. et al. A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart. **Basic Res Cardiol**, v. 106, n. 3, p. 447-57, May 2011.

CORREA, L. H.; HEYN, G. S.; MAGALHAES, K. G. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. **Cells**, v. 8, n. 7, Jun 30 2019.

CRAIG, A.; PARVEZ, F.; ISSBERNER, J. A systematic literature review of the effect of insulin sensitizers on the cognitive symptoms of Alzheimer's Disease in transgenic mice. **Behav Brain Res**, v. 372, p. 112015, Oct 17 2019.

CUI, D. et al. Subcortical gray matter structural alterations in prediabetes and type 2 diabetes. **Neuroreport**, v. 30, n. 6, p. 441-445, Apr 10 2019.

CZECH, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nat Med**, v. 23, n. 7, p. 804-814, Jul 11 2017.

DAVIDSON, T. L. et al. The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. **Physiol Behav**, v. 107, n. 1, p. 26-33, Aug 20 2012.

DAVIS, C. L.; COOPER, S. Fitness, fatness, cognition, behavior, and academic achievement among overweight children: do cross-sectional associations correspond to exercise trial outcomes? **Prev Med**, v. 52 Suppl 1, p. S65-9, Jun 2011.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. **J Diabetes Sci Technol**, v. 2, n. 6, p. 1101-13, Nov 2008.

DESHPANDE, A. D.; HARRIS-HAYES, M.; SCHOOTMAN, M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. **Phys Ther**, v. 88, n. 11, p. 1254-64, Nov 2008.

DESLER, C. et al. Is There a Link between Mitochondrial Reserve Respiratory Capacity and Aging? **J Aging Res**, v. 2012, p. 192503, 2012.

DOLCOS, F.; LABAR, K. S.; CABEZA, R. Interaction between the amygdala and the medial temporal lobe memory system predicts better memory for emotional events. **Neuron**, v. 42, n. 5, p. 855-63, Jun 10 2004.

DURAN, J. et al. Impairment in long-term memory formation and learning-dependent synaptic plasticity in mice lacking glycogen synthase in the brain. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 33, n. 4, p. 550-6, Apr 2013.

DUTHEIL, S. et al. High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 7, p. 1874-87, Jun 2016.

FEDERATION, I. D. Diabetes. 2020. Disponível em: < <https://www.idf.org/> >. Acesso em: 13 de setembro de 2020.

FIGUEIRA, T. R. et al. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. **Methods Mol Biol**, v. 810, p. 103-17, 2012.

FINK, R. I.; KOLTERMAN, O. G.; OLEFSKY, J. M. The physiological significance of the glucose intolerance of aging. **J Gerontol**, v. 39, n. 3, p. 273-8, May 1984.

FISLER, J. S.; WARDEN, C. H. Uncoupling proteins, dietary fat and the metabolic syndrome. **Nutr Metab (Lond)**, v. 3, p. 38, Sep 12 2006.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 335-43, Jan 16 2014.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Curr Protoc Pharmacol**, v. 70, p. 5 47 1-5 47 20, Sep 1 2015.

GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119784, 2015.

GAO, P. et al. Inhibition of Mitochondrial Calcium Overload by SIRT3 Prevents Obesity- or Age-Related Whitening of Brown Adipose Tissue. **Diabetes**, v. 69, n. 2, p. 165-180, Feb 2020.

GARCIA-SERRANO, A. M.; DUARTE, J. M. N. Brain Metabolism Alterations in Type 2 Diabetes: What Did We Learn From Diet-Induced Diabetes Models? **Front Neurosci**, v. 14, p. 229, 2020.

GE, X. et al. Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes. **J Biol Chem**, v. 286, n. 40, p. 34533-41, Oct 7 2011.

GESTA, S.; TSENG, Y. H.; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242-56, Oct 19 2007.

GHASEMI, R. et al. Insulin in the brain: sources, localization and functions. **Mol Neurobiol**, v. 47, n. 1, p. 145-71, Feb 2013.

GIL, A. et al. Is adipose tissue metabolically different at different sites? **Int J Pediatr Obes**, v. 6 Suppl 1, p. 13-20, Sep 2011.

GIRALT, M.; GAVALDA-NAVARRO, A.; VILLARROYA, F. Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity. **Mol Cell Endocrinol**, v. 418 Pt 1, p. 66-73, Dec 15 2015.

GUILLAMON-VIVANCOS, T.; GOMEZ-PINEDO, U.; MATIAS-GUIU, J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. **Neurologia**, v. 30, n. 2, p. 119-29, Mar 2015.

GUSEL'NIKOVA, V. V.; KORZHEVSKIY, D. E. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. **Acta Naturae**, v. 7, n. 2, p. 42-7, Apr-Jun 2015.

HALEEM, D. J.; MAHMOOD, K. Brain serotonin in high-fat diet-induced weight gain, anxiety and spatial memory in rats. **Nutr Neurosci**, p. 1-10, May 22 2019.

HANSEN, M. J. et al. Short-term cold acclimation improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus. **Nat Med**, v. 21, n. 8, p. 863-5, Aug 2015.

HARGRAVE, S. L. et al. Western diets induce blood-brain barrier leakage and alter spatial strategies in rats. **Behav Neurosci**, v. 130, n. 1, p. 123-35, Feb 2016.

HUANG, S.; MILLAR, A. H. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. **Curr Opin Plant Biol**, v. 16, n. 3, p. 344-9, Jun 2013.

HULBERT, A. J. et al. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 80, n. 1, p. 155-69, Feb 2005.

HUTTER, E. et al. High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. **Exp Gerontol**, v. 41, n. 1, p. 103-9, Jan 2006.

ISHIMOTO, T. et al. High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. **Hepatology**, v. 58, n. 5, p. 1632-43, Nov 2013.

JANSEN, P. et al. Impaired mental rotation performance in overweight children. **Appetite**, v. 56, n. 3, p. 766-9, Jun 2011.

JASTROCH, M. et al. Mitochondrial proton and electron leaks. **Essays Biochem**, v. 47, p. 53-67, 2010.

JHA, D.; MITRA MAZUMDER, P. High fat diet administration leads to the mitochondrial dysfunction and selectively alters the expression of class 1 GLUT protein in mice. **Mol Biol Rep**, v. 46, n. 2, p. 1727-1736, Apr 2019.

Jl, S.; WANG, L.; LI, L. Effect of Metformin on Short-Term High-Fat Diet-Induced Weight Gain and Anxiety-Like Behavior and the Gut Microbiota. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 10, p. 704, 2019.

JOKINEN, E. Obesity and cardiovascular disease. **Minerva Pediatr**, v. 67, n. 1, p. 25-32, Feb 2015.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **Lancet**, v. 383, n. 9922, p. 1068-83, Mar 22 2014.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Curr Biol**, v. 25, n. 23, p. R1116-21, Dec 7 2015.

KOLIAKI, C. et al. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. **Cell Metab**, v. 21, n. 5, p. 739-46, May 5 2015.

KORSHUNOV, S. S.; SKULACHEV, V. P.; STARKOV, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Lett**, v. 416, n. 1, p. 15-8, Oct 13 1997.

LAPA, C. et al. Whitening and Impaired Glucose Utilization of Brown Adipose Tissue in a Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 16795, Dec 1 2017.

LEE, J. H. et al. Isocitrate dehydrogenase 2 protects mice from high-fat diet-induced metabolic stress by limiting oxidative damage to the mitochondria from brown adipose tissue. **Exp Mol Med**, v. 52, n. 2, p. 238-252, Feb 2020.

LEE, J. H. et al. The Role of Adipose Tissue Mitochondria: Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 19, Oct 4 2019.

LEE, M. W.; LEE, M.; OH, K. J. Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Adipokines and MicroRNAs. **J Clin Med**, v. 8, n. 6, Jun 14 2019.

LEE, W. S.; KIM, J. Diabetic cardiomyopathy: where we are and where we are going. **Korean J Intern Med**, v. 32, n. 3, p. 404-421, May 2017.

LEE, Y. S. et al. Increased adipocyte O<sub>2</sub> consumption triggers HIF-1 $\alpha$ , causing inflammation and insulin resistance in obesity. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1339-1352, Jun 5 2014.

LEIPNITZ, G. et al. Evaluation of mitochondrial bioenergetics, dynamics, endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk, and reactive oxygen species in fibroblasts from patients with complex I deficiency. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 1165, Jan 18 2018.

LEJRI, I. et al. Mitochondria- and Oxidative Stress-Targeting Substances in Cognitive Decline-Related Disorders: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidence. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2019, p. 9695412, 2019.

LINDQVIST, A. et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. **Eur J Neurol**, v. 13, n. 12, p. 1385-8, Dec 2006.

LITTLEJOHNS, B. et al. Hearts from mice fed a non-obesogenic high-fat diet exhibit changes in their oxidative state, calcium and mitochondria in parallel with increased susceptibility to reperfusion injury. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100579, 2014.

LIU, J. et al. The role of uncoupling proteins in diabetes mellitus. **J Diabetes Res**, v. 2013, p. 585897, 2013.

LIU, Z. et al. High-fat diet induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic plasticity. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0128274, 2015.

LOGAN, D. C. The mitochondrial compartment. **J Exp Bot**, v. 57, n. 6, p. 1225-43, 2006.

LONDZIN, P. et al. Phloridzin, an Apple Polyphenol, Exerted Unfavorable Effects on Bone and Muscle in an Experimental Model of Type 2 Diabetes in Rats. **Nutrients**, v. 10, n. 11, Nov 7 2018.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175-84, Jan 2007.

LUQUE-CONTRERAS, D. et al. Oxidative stress and metabolic syndrome: cause or consequence of Alzheimer's disease? **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 497802, 2014.

MAGALHAES, D. A. et al. High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. **An Acad Bras Cienc**, v. 91, n. 1, p. e20180314, Mar 21 2019.

MANNA, P.; ACHARI, A. E.; JAIN, S. K. Vitamin D supplementation inhibits oxidative stress and upregulate SIRT1/AMPK/GLUT4 cascade in high glucose-treated 3T3L1 adipocytes and in adipose tissue of high fat diet-fed diabetic mice. **Arch Biochem Biophys**, v. 615, p. 22-34, Feb 1 2017.

MANSCHOT, S. M. et al. Metabolic and vascular determinants of impaired cognitive performance and abnormalities on brain magnetic resonance imaging in patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 11, p. 2388-97, Nov 2007.

MARIN, P. et al. Glucose uptake in human adipose tissue. **Metabolism**, v. 36, n. 12, p. 1154-60, Dec 1987.

MARTINS, F. F. et al. Thermogenesis, fatty acid synthesis with oxidation, and inflammation in the brown adipose tissue of ob/ob (-/-) mice. **Ann Anat**, v. 210, p. 44-51, Mar 2017.

MASSAAD, C. A.; KLANN, E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 10, p. 2013-54, May 15 2011.

MATHE, D. Dyslipidemia and diabetes: animal models. **Diabete Metab**, v. 21, n. 2, p. 106-11, Apr 1995.

MCDONALD, A. J.; MOTT, D. D. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory. **J Neurosci Res**, v. 95, n. 3, p. 797-820, Mar 2017.

MEEH, R. C. R.; WATT, M. J. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 9, p. 509-520, Sep 2017.

MOGENSEN, M. et al. Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1592-9, Jun 2007.

MONNERAT-CAHLI, G. et al. Toll-like receptor 4 activation promotes cardiac arrhythmias by decreasing the transient outward potassium current (I<sub>to</sub>) through an IRF3-dependent and MyD88-independent pathway. **J Mol Cell Cardiol**, v. 76, p. 116-25, Nov 2014.

MORAN, C. et al. Brain atrophy in type 2 diabetes: regional distribution and influence on cognition. **Diabetes Care**, v. 36, n. 12, p. 4036-42, Dec 2013.

MORRISON, C. D. et al. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. **J Neurochem**, v. 114, n. 6, p. 1581-9, Sep 2010.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 193-205, Mar 2008.

MURAI, T. et al. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. **Physiol Behav**, v. 90, n. 1, p. 116-24, Jan 30 2007.

NATH, S.; GHOSH, S. K.; CHOUDHURY, Y. A murine model of type 2 diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 84, p. 20-30, Mar - Apr 2017.

NICHOLLS, D. G. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1147, p. 53-60, Dec 2008.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1145-59, Mar 16 2012.

O'NEILL, B. T. et al. FoxO Transcription Factors Are Critical Regulators of Diabetes-Related Muscle Atrophy. **Diabetes**, v. 68, n. 3, p. 556-570, Mar 2019.

OLIVEIRA, T. E. et al. Fish Oil Protects Wild Type and Uncoupling Protein 1-Deficient Mice from Obesity and Glucose Intolerance by Increasing Energy Expenditure. **Mol Nutr Food Res**, v. 63, n. 7, p. e1800813, Apr 2019.

ORAVA, J. et al. Blunted metabolic responses to cold and insulin stimulation in brown adipose tissue of obese humans. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 11, p. 2279-87, Nov 2013.

OSELLAME, L. D.; BLACKER, T. S.; DUCHEN, M. R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 26, n. 6, p. 711-23, Dec 2012.

PAGLIALUNGA, S. et al. In adipose tissue, increased mitochondrial emission of reactive oxygen species is important for short-term high-fat diet-induced insulin resistance in mice. **Diabetologia**, v. 58, n. 5, p. 1071-80, May 2015.

PAJUELO, D. et al. Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of brown adipose tissue caused by diet-induced obesity in Wistar rats. **Br J Nutr**, v. 107, n. 2, p. 170-8, Jan 2012.

PARK, H. S.; CHO, H. S.; KIM, T. W. Physical exercise promotes memory capability by enhancing hippocampal mitochondrial functions and inhibiting apoptosis in obesity-induced insulin resistance by high fat diet. **Metab Brain Dis**, v. 33, n. 1, p. 283-292, Feb 2018.

PAULA, G. C. D. **A modulação do balanço energético no SNC: dos Hábitos Alimentares aos Circuitos Neuroendócrinos**. 2020. 102 Tese (Doutorado em Bioquímica) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PETERSEN, M. C.; VATNER, D. F.; SHULMAN, G. I. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 10, p. 572-587, Oct 2017.

PETROV, D. et al. High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. **Biochim Biophys Acta**, v. 1852, n. 9, p. 1687-99, Sep 2015.

PHELPS, E. A. Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. **Curr Opin Neurobiol**, v. 14, n. 2, p. 198-202, Apr 2004.

PINTANA, H. et al. DPP-4 inhibitors improve cognition and brain mitochondrial function of insulin-resistant rats. **J Endocrinol**, v. 218, n. 1, p. 1-11, Jul 2013.

POLYZOS, A. A.; MCMURRAY, C. T. The chicken or the egg: mitochondrial dysfunction as a cause or consequence of toxicity in Huntington's disease. **Mech Ageing Dev**, v. 161, n. Pt A, p. 181-197, Jan 2017.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, Apr 21 1977.

PORTER, C. et al. Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. **Cell Metab**, v. 24, n. 2, p. 246-55, Aug 9 2016.

POSNER, B. I. Insulin Signalling: The Inside Story. **Can J Diabetes**, v. 41, n. 1, p. 108-113, Feb 2017.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, Feb 28 2003.

PULLAGURLA, S. R. et al. Current and future bioanalytical approaches for stroke assessment. **Bioanalysis**, v. 7, n. 8, p. 1017-35, 2015.



RAFFAELLA, C. et al. Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. **Obesity (Silver Spring)**, v. 16, n. 5, p. 958-64, May 2008.

RECENA AYDOS, L. et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models. **Nutrients**, v. 11, n. 12, Dec 16 2019.

REMOR, A. P. et al. Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: involvement of advanced glycosylated end products. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 11, p. 1460-71, Nov 2011.

REMPEL-CLOWER, N. L. et al. Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. **J Neurosci**, v. 16, n. 16, p. 5233-55, Aug 15 1996.

RUEGSEGGER, G. N. et al. Exercise and metformin counteract altered mitochondrial function in the insulin-resistant brain. **JCI Insight**, v. 4, n. 18, Sep 19 2019.

SANTOMAURO, A. T. et al. Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. **Diabetes**, v. 48, n. 9, p. 1836-41, Sep 1999.

SARRUF, D. A. et al. Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. **Diabetes**, v. 59, n. 7, p. 1817-24, Jul 2010.

SAÚDE, O. M. D. Diabetes. 2020. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> >. Acesso em: 08 de agosto de 2020.

SCHMID, A. I. et al. Liver ATP synthesis is lower and relates to insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 2, p. 448-53, Feb 2011.

SCHULTZ, C.; ENGELHARDT, M. Anatomy of the hippocampal formation. **Front Neurol Neurosci**, v. 34, p. 6-17, 2014.

SCOTT, I. D.; NICHOLLS, D. G. Energy transduction in intact synaptosomes. Influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. **Biochem J**, v. 186, n. 1, p. 21-33, Jan 15 1980.

SEMENKOVICH, K. et al. Depression in type 2 diabetes mellitus: prevalence, impact, and treatment. **Drugs**, v. 75, n. 6, p. 577-87, Apr 2015.

SICKMANN, H. M. et al. Obesity and type 2 diabetes in rats are associated with altered brain glycogen and amino-acid homeostasis. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 30, n. 8, p. 1527-37, Aug 2010.

SIMON, G. E. et al. Association between obesity and depression in middle-aged women. **Gen Hosp Psychiatry**, v. 30, n. 1, p. 32-9, Jan-Feb 2008.

SOARES, A. F.; DUARTE, J. M. N.; GRUETTER, R. Increased hepatic fatty acid polyunsaturation precedes ectopic lipid deposition in the liver in adaptation to high-fat diets in mice. **MAGMA**, v. 31, n. 2, p. 341-354, Apr 2018.

SOARES, A. F. et al. Glycogen metabolism is impaired in the brain of male type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **J Neurosci Res**, v. 97, n. 8, p. 1004-1017, Aug 2019.

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

SOKOLOWSKI, K.; CORBIN, J. G. Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. **Front Mol Neurosci**, v. 5, p. 55, 2012.

SOLIMAN, A. T.; YASIN, M.; KASSEM, A. Leptin in pediatrics: A hormone from adipocyte that wheels several functions in children. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 16, n. Suppl 3, p. S577-87, Dec 2012.

SPAUWEN, P. J. et al. Associations of advanced glycation end-products with cognitive functions in individuals with and without type 2 diabetes: the maastricht study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 100, n. 3, p. 951-60, Mar 2015.

SPORNS, O.; TONONI, G.; KOTTER, R. The human connectome: A structural description of the human brain. **PLoS Comput Biol**, v. 1, n. 4, p. e42, Sep 2005.

SRIKANTHAN, P.; KARLAMANGLA, A. S. Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 9, p. 2898-903, Sep 2011.

SRISKANTHADEVAN, S. et al. AML cells have low spare reserve capacity in their respiratory chain that renders them susceptible to oxidative metabolic stress. **Blood**, v. 125, n. 13, p. 2120-30, Mar 26 2015.

STANFORD, K. I. et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. **J Clin Invest**, v. 123, n. 1, p. 215-23, Jan 2013.

STEFAN, N.; HARING, H. U.; CUSI, K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 7, n. 4, p. 313-324, Apr 2019.

SVERDLOV, A. L. et al. High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II. **J Mol Cell Cardiol**, v. 78, p. 165-73, Jan 2015.

SZENDROEDI, J. et al. Abnormal hepatic energy homeostasis in type 2 diabetes. **Hepatology**, v. 50, n. 4, p. 1079-86, Oct 2009.

TANG, L. et al. Dapagliflozin slows the progression of the renal and liver fibrosis associated with type 2 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 313, n. 5, p. E563-E576, Nov 1 2017.

TREVINO, S. et al. A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. **Synapse**, v. 69, n. 9, p. 421-33, Sep 2015.

TREVINO, S. et al. Metabolic syndrome causes recognition impairments and reduced hippocampal neuronal plasticity in rats. **J Chem Neuroanat**, v. 82, p. 65-75, Jul 2017.

TURNER, N. et al. Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. **Diabetologia**, v. 56, n. 7, p. 1638-48, Jul 2013.

VINUESA, A. et al. Early Exposure to a High-Fat Diet Impacts on Hippocampal Plasticity: Implication of Microglia-Derived Exosome-like Extracellular Vesicles. **Mol Neurobiol**, v. 56, n. 7, p. 5075-5094, Jul 2019.

VINUESA, A. et al. Juvenile exposure to a high fat diet promotes behavioral and limbic alterations in the absence of obesity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 72, p. 22-33, Oct 2016.

WAISE, T. M. Z. et al. One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 464, n. 4, p. 1157-1162, Sep 4 2015.

WARD, M. A. et al. The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. **BMC Neurol**, v. 5, p. 23, Dec 2 2005.

WEIR, G. C.; BONNER-WEIR, S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 3, p. S16-21, Dec 2004.

WHITE, M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 3, p. E413-22, Sep 2002.

WHITE, P. A. et al. [Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 57, n. 5, p. 339-45, Jul 2013.

WHITMER, R. A. Type 2 diabetes and risk of cognitive impairment and dementia. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 7, n. 5, p. 373-80, Sep 2007.

WHITTLE, A. J.; LOPEZ, M.; VIDAL-PUIG, A. Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. **Trends Mol Med**, v. 17, n. 8, p. 405-11, Aug 2011.

YAMAMOTO, H. et al. Amla Enhances Mitochondrial Spare Respiratory Capacity by Increasing Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Systems in a Murine Skeletal Muscle Cell Line. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1735841, 2016.

YAMAMOTO, M. et al. Endothelial Adora2a Activation Promotes Blood-Brain Barrier Breakdown and Cognitive Impairment in Mice with Diet-Induced Insulin Resistance. **J Neurosci**, v. 39, n. 21, p. 4179-4192, May 22 2019.

YANG, Y. et al. Early-life high-fat diet-induced obesity programs hippocampal development and cognitive functions via regulation of gut commensal *Akkermansia muciniphila*. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 12, p. 2054-2064, Nov 2019.

YARLAGADDA, A.; ALFSON, E.; CLAYTON, A. H. The blood brain barrier and the role of cytokines in neuropsychiatry. **Psychiatry (Edgmont)**, v. 6, n. 11, p. 18-22, Nov 2009.

ZHENG, H. et al. Analysis of neuron-astrocyte metabolic cooperation in the brain of db/db mice with cognitive decline using <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 37, n. 1, p. 332-343, Jan 2017.

ZHENG, H. et al. Cognitive decline in type 2 diabetic db/db mice may be associated with brain region-specific metabolic disorders. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1863, n. 1, p. 266-273, Jan 2017.

ZLOKOVIC, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. **Neuron**, v. 57, n. 2, p. 178-201, Jan 24 2008.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R.; AMARAL, D. G. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. **J Neurosci**, v. 6, n. 10, p. 2950-67, Oct 1986.



## 9 ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 09 de agosto de 2019.

### *DECLARAÇÃO*

Declaramos que o projeto intitulado “**PAPEL DO COMPLEXO DO INFLAMASSOMA SOBRE A COGNIÇÃO E PERFIL BIOENERGÉTICO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A MODELO DE OBESIDADE.**”. Protocolo n.º 60/2019, sob responsabilidade da Professora Andreza Fabro de Bem foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (288 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/08/2019 a 01/07/2025.



Prof. Dr. Cássio José da Silva  
Coordenador da CEUA – UnB

