



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – *CAMPUS* TRINDADE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Eslen Delanogare

**Disfunções metabólicas e alterações comportamentais: evidências de associação e estratégias de tratamento em camundongos**

Florianópolis

2024

Eslen Delanogare

**Disfunções metabólicas e alterações comportamentais: evidências de associação e estratégias de tratamento em camundongos**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira.

Florianópolis

2024

Delanogare, Eslen

Disfunções metabólicas e alterações comportamentais: evidências de associação e estratégias de tratamento em camundongos / Eslen Delanogare ; orientador, Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, 2024.

122 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. metabolismo;. 3. comportamento; . 4. diabetes; . 5. hipercolesterolemia. I. Moreira, Eduardo Luiz Gasnhar. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

Nome completo: Eslen Delanogare

**Título:** Disfunções metabólicas e alterações comportamentais: evidências de associação e estratégias de tratamento em camundongos

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 26 de março de 2024, pela banca avaliadora:

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger – FMC/CCB/UFSC (Membro Titular - Interno)

Prof. Dr. Alex Rafacho – CFS/CCB/UFSC (Membro Titular - Externo)

Prof. Dr. Eduardo Zimmer – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS (Membro Titular - Externo)

Certificamos que essa é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para a obtenção do título de Doutor em Neurociências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (orientador)

Florianópolis, 2024

Este trabalho é dedicado às pessoas que acreditaram em mim, em especial aos meus queridos pais.

## AGRADECIMENTOS

Uma jornada só termina após inúmeras batalhas pessoais e profissionais. Jamais teria defendido o presente trabalho sem o apoio de tantas pessoas que me auxiliaram direta e indiretamente. Evitando cometer alguma injustiça e deixar alguém de fora, quero desde já agradecer a todos que estiveram, em algum momento, presentes nessa trajetória da minha vida, seja na concepção, realização ou apresentação deste trabalho. Se você, que está lendo isso, esteve comigo em algum momento, mas não foi citado, sinta-se abraçado. Você fez diferença no meu futuro.

Em especial, quero agradecer aos meus queridos pais que, mesmo sem terem frequentado uma universidade, nunca mediram esforços para me ajudar nos estudos e sempre encararam a educação como algo necessário em minha vida. Obrigado. Sem vocês tudo isso não seria possível.

Estendo esse agradecimento ao meu orientador, professor Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, que me deu autonomia e liberdade para seguir a minha curiosidade acadêmica, mas, ao mesmo tempo, corrigiu a rota sempre que a criatividade extrapolava as barreiras do racional. Você impactou positivamente em minha vida, para sempre. Obrigado.

Digo o mesmo para os demais professores e professoras que abriram não só as portas de seus laboratórios, mas também estiveram abertos e abertas para discussões acadêmicas engrandecedoras. Em um cenário no qual a academia é cada vez mais atacada e desprestigiada, só quem vive em um ambiente acadêmico com tantas pessoas brilhantes consegue perceber como um simples cafezinho na copa se transforma em uma excelente oportunidade de aprendizados engrandecedores. Obrigado.

Também não posso deixar de citar meus estimados colegas de laboratório, que me auxiliaram no desenvolvimento desta tese, em especial a Sara, o Wellington e a Scheila, que me acompanharam por inúmeros e inúmeros finais de semana rodando experimento. Estendo este agradecimento aos servidores da UFSC, que me auxiliaram sempre que possível.

Ademais, agradeço à sociedade brasileira pela bolsa que me foi disponibilizada via CAPES. Sem ela, nada disso seria viável. Obrigado.

*“Eu gostaria de dizer duas coisas, uma intelectual e uma moral. A coisa intelectual que eu gostaria de dizer é a seguinte: quando você estiver estudando algum assunto, ou considerando qualquer filosofia, pergunte-se apenas quais são os fatos e qual é a verdade que os fatos corroboram. Nunca se deixe desviar pelo que você deseja acreditar, ou pelo que você acha que teria efeitos sociais benéficos se fosse acreditado. Mas veja apenas, e unicamente, quais são os fatos. Essa é a coisa intelectual que eu gostaria de dizer. A coisa moral que eu gostaria de dizer é: o amor é sábio, o ódio é tolo. Neste mundo que está cada vez mais estreitamente interligado, temos que aprender a tolerar uns aos outros, temos que aprender a aturar o fato de que algumas pessoas dizem coisas que não gostamos [...].”*

***Sir Bertrand Arthur William Russell***

## RESUMO

Não há como dissociar a evolução humana da evolução do comportamento alimentar. Entretanto, o surgimento recente de alimentos industrializados, caracterizados por sua alta palatabilidade e densidade calórica, tem contribuído para o aparecimento de disfunções metabólicas sem precedentes na história. Dados indicam um aumento exponencial nos casos de sobrepeso, obesidade, diabetes e dislipidemia desde a década de oitenta, especialmente devido ao balanço energético positivo resultante do consumo de alimentos ricos em açúcares e gorduras. Estudos recentes têm demonstrado que as disfunções metabólicas periféricas, como hiperglicemia e hiperlipidemia, não se limitam aos prejuízos tradicionalmente associados, como problemas cardiovasculares, mas também afetam o Sistema Nervoso Central, especialmente em indivíduos geneticamente suscetíveis. Contudo, os mecanismos neurobiológicos subjacentes a esses eventos ainda são em grande parte desconhecidos. Diante desse cenário, este estudo teve como objetivo aprofundar o conhecimento sobre como disfunções metabólicas periféricas se relacionam com o desenvolvimento de prejuízos comportamentais. Os resultados da presente tese mostram que o tratamento com o fármaco hipoglicemiante metformina foi capaz de atenuar a alodinia mecânica e anedonia induzida pelo tratamento com estreptozotocina (STZ) em camundongos *Swiss*, um modelo experimental de diabetes do tipo 1 (DM1). Ademais, atenuou o aumento de peso, a hipercolesterolemia, a intolerância à glicose, o comportamento do tipo depressivo e a alodinia mecânica em camundongos *Swiss* alimentados com uma dieta rica em gordura saturada e frutose. Nesta tese, também foi demonstrado que a administração oral do extrato aquoso obtido das folhas da planta *Cissus verticillata* (popularmente conhecida como insulina vegetal) não demonstrou efeitos hipoglicêmicos, nas doses de 30 e 300 mg/kg, tanto no modelo experimental de DM1 em camundongos quanto em camundongos expostos à dieta rica em gordura saturada e frutose. No entanto, observou-se que o referido extrato foi capaz de aumentar o limiar de sensibilidade à dor, o qual tinha se mostrado reduzido em ambos os modelos experimentais. Além disso, os efeitos de uma dieta rica em gordura saturada e frutose sobre o comportamento e marcadores de plasticidade sináptica foram avaliados em camundongos nocautes para o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar. Constatou-se que a presença de disfunções metabólicas, como a hipercolesterolemia, implicou disfunções comportamentais e cognitivas, como déficit de memória, comportamento do tipo ansioso e do tipo depressivo. Contudo, não foram observadas disfunções morfológicas em neurônios hipocâmpais de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>. Esses camundongos apresentaram maior imunoconteúdo de proteínas pré-sinápticas, como GluA1, PSD-95 e sinapsina, além de um número maior de dendritos na região do giro denteado do hipocampo, mesmo apresentando déficits comportamentais e cognitivos. Em conclusão, os resultados da presente tese permitem perceber como a interação entre abordagens ambientais, via dietas hipercalóricas, e genéticas resultam em diferentes desregulações metabólicas, cognitivas, comportamentais, neuroquímicas e neuromorfológicas em camundongos.

**Palavras-chave:** metabolismo; comportamento; cognição; diabetes; hipercolesterolemia; neuroquímica.

## ABSTRACT

We cannot dissociate human evolution from the evolution of eating behavior. However, the recent emergence of industrialized foods, characterized by their high palatability and caloric density, has contributed to the appearance of metabolic dysfunctions unprecedented in history. Data indicate an exponential increase in cases of overweight, obesity, diabetes and dyslipidemia since the eighties, especially due to the positive energy balance resulting from the consumption of foods rich in sugars and fats. Recent studies have demonstrated that peripheral metabolic dysfunctions, such as hyperglycemia and hyperlipidemia, are not limited to traditionally associated losses, such as cardiovascular problems, but also affect the Central Nervous System, especially in genetically susceptible individuals. However, the neurobiological mechanisms underlying these events are still largely unknown. Given this scenario, this study aimed to deepen knowledge about how peripheral metabolic dysfunctions are related to the development of behavioral impairments. The results of the present thesis show that treatment with the hypoglycemic drug metformin was able to attenuate mechanical allodynia and anhedonia induced by treatment with streptozotocin (STZ) in *Swiss* mice, an experimental model of type 1 diabetes (DM1). Furthermore, it attenuated weight gain, hypercholesterolemia, glucose intolerance, depressive-like behavior and mechanical allodynia in *Swiss* mice fed a diet rich in saturated fat and fructose. In this work, it was also demonstrated that the oral administration of the aqueous extract obtained from the leaves of the *Cissus verticillata* plant (popularly known as vegetable insulin) did not demonstrate hypoglycemic effects, at doses of 30 and 300 mg/kg, in both the experimental model of DM1 in mice and in mice exposed to a diet rich in saturated fat and fructose. However, it was observed that this extract could increase the pain sensitivity threshold, which had been shown to be reduced in both experimental models. Furthermore, the effects of a diet rich in saturated fat and fructose on behavior and markers of synaptic plasticity were evaluated in low-density lipoprotein (LDL) receptor knockout mice, LDLr<sup>-/-</sup> mice, an experimental model of hypercholesterolemia familiar. It was found that the presence of metabolic dysfunctions, such as hypercholesterolemia, resulted in behavioral and cognitive dysfunctions, such as memory deficits, anxious-like and depressive-like behavior. However, no morphological dysfunctions were observed in hippocampal neurons of LDLr<sup>-/-</sup> mice. These mice had a higher immunocontent of presynaptic proteins, such as GluA1, PSD-95 and synapsin, in addition to a greater number of dendrites in the dentate gyrus of the hippocampus, even with behavioral and cognitive deficits. In conclusion, the results of this thesis allow us to understand how the interaction between environmental approaches, via high-calorie diets, and genetics result in different metabolic, cognitive, behavioral, neurochemical and neuromorphological dysregulations in mice.

**Keywords:** metabolism; behavior; cognition; diabetes; hypercholesterolemia; neurochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desenho experimental 1: modelo de diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina .....	31
<b>Figura 2.</b> Desenho experimental 2: modelo de disfunções metabólicas induzidas por dieta rica em gordura e frutose. ....	31
<b>Figura 3.</b> Efeitos do tratamento com metformina nas alterações metabólicas induzidas por STZ em camundongos <i>Swiss</i> machos. ....	36
<b>Figura 4.</b> Efeitos do tratamento com metformina nas alterações neurocomportamentais induzidas por STZ. ....	37
<b>Figura 5.</b> Efeitos do tratamento com metformina nas alterações metabólicas induzidas por HFFD em camundongos <i>Swiss</i> machos. ....	39
<b>Figura 6.</b> Efeitos do tratamento com metformina nas alterações neurocomportamentais induzidas por HFFD. ....	41
<b>Figura 7.</b> Efeitos do tratamento com metformina nas alterações dos níveis de pGSK-3 $\beta$ no cérebro induzidas por HFFD em camundongos <i>swiss</i> machos. ....	42
<b>Figura 8.</b> Escores z metabólicos e neurocomportamentais de camundongos injetados com STZ e camundongos alimentados com HFFD. ....	44
<b>Figura 9.</b> Efeitos do tratamento com extrato aquoso da <i>Cissus verticillata</i> em modelo animal de DM1. ....	55
<b>Figura 10.</b> Efeitos do tratamento com extrato aquoso da <i>Cissus verticillata</i> em modelo animal de disfunção metabólica induzida por dieta. ....	55
<b>Figura 11.</b> UPLC-ESI(+)-QToF BPI cromatograma do extrato aquoso da <i>Cissus verticillata</i> . ....	60
<b>Figura 12.</b> Efeitos do tratamento com o Extrato Aquoso da <i>Cissus verticillata</i> (AECv) em diferentes doses sobre as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pelo tratamento com STZ em camundongos. ....	62
<b>Figura 13.</b> Efeitos do tratamento com o Extrato Aquoso da <i>Cissus verticillata</i> (AECv) sobre as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos. ....	63
<b>Figura 14.</b> Desenho experimental: efeitos de uma dieta hipercalórica em animais LDLr <sup>-/-</sup> . .	77
<b>Figura 15.</b> Alterações metabólicas e comportamentais induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr <sup>-/-</sup> . ....	84

<b>Figura 16.</b> Alterações comportamentais induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr/-.....	85
<b>Figura 17.</b> Alterações cognitivas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr/-.....	87
<b>Figura 18.</b> Alterações neuroquímicas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr/-.....	88
<b>Figura 19.</b> Alterações neuroquímicas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr/-.....	89
<b>Figura 20.</b> Alterações neuroquímicas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr/-.....	90
<b>Figura 21.</b> Alterações neuroquímicas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr/-.....	90
<b>Figura 22.</b> Alterações neuromorfológicas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr/-.....	91

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Compostos identificados no extrato da <i>Cissus verticillata</i> encontrados por UPLC-HRMS e espectrometria de massa. ....	60
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1C	Hemoglobina Glicada
AChE	Acetilcolinesterase
AECv	Aqueous Extract <i>Cissus verticillata</i>
AGE	Advanced Glycation End-Products
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina
ANOVA	Análise de Variância
AUC	Área Sob a Curva
BCAA	Branched-Chain Amino Acides
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BPI	Íons de Pico de Base
CAT	Catalase
CGA	Ácido Clorogênico
DA	Doença de Alzheimer
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DO	Densidade Óptica
DP	Dieta Padrão
EPM	Erro Padrão da Média
ESI	Ionização por Electrospray
GD	Giro Denteado do Hipocampo
GLO1	Glioxalase 1
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSK-3 $\beta$	Glycogen Synthase Kinase 3 beta
GST	Glutathione S-transferase
GTT	Teste de Tolerância à Glicose
HDL	High Density Lipoprotein
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HFFD	High-Fat-Fructose Diet

IRS-1	Substrato do Receptor de Insulina 1
KV	Canais de Potássio Dependentes de Voltagem
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LTP	Long-Term Potentiation
MG	Metilglioxal
MHC	Major Histocompatibility Complex
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
PDA	Detector de Arranjo de Diodos
PFA	Paraformaldeído
RAGE	Receptor Advanced Glycation End Products
RBP-4	Retinol-Binding Protein 4
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
STZ	Streptozotocin
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TLR-4	Toll Like Receptor 4
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
TRPV1	Canal Catiônico de Potencial Receptor Transitório
VF	Teste de Von Frey
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	SOBREPESO, OBESIDADE E DISLIPIDEMIA.....	17
1.2	DIABETES MELLITUS .....	18
1.3	PROBLEMAS METABÓLICOS E DISFUNÇÕES COGNITIVAS .....	22
<b>2</b>	<b>AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DO FÁRMACO HIPOGLICEMIANTE METFORMINA EM ALTERAÇÕES METABÓLICAS, COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS POR UMA DIETA RICA EM GORDURA E FRUTOS, E EM MODELO DE DIABETES TIPO 1 INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ) EM CAMUNDONGOS</b> .....	26
2.1	INTRODUÇÃO.....	26
2.2	OBJETIVOS.....	28
<b>2.2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	28
<b>2.2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	28
2.3	ANIMAIS .....	29
2.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
2.5	EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS, METABÓLICOS E NEUROQUÍMICOS.....	32
<b>2.5.1</b>	<b>Teste do Campo Aberto</b> .....	32
<b>2.5.2</b>	<b>Teste de Suspensão pela Cauda</b> .....	32
<b>2.5.3</b>	<b>Teste da Borrifagem de Sacarose</b> .....	32
<b>2.5.4</b>	<b>Análise da alodinia mecânica pelo Teste de Von Frey</b> .....	33
<b>2.5.5</b>	<b>Análise dos parâmetros de glicose e colesterol</b> .....	33
<b>2.5.6</b>	<b>Imunodeteção de proteínas usando a técnica ELISA</b> .....	34
<b>2.5.7</b>	<b>Escores Z</b> .....	34
2.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	35

2.7	RESULTADOS .....	35
2.8	DISCUSSÃO .....	44
<b>3</b>	<b>AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DO EXTRATO AQUOSO DA PLANTA <i>Cissus verticillata</i> EM ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR UMA DIETA RICA EM GORDURA E FRUTOSE EM CAMUNDONGOS.....</b>	<b>51</b>
3.1	INTRODUÇÃO .....	51
3.2	OBJETIVOS .....	52
<b>3.2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>53</b>
3.3	ANIMAIS .....	53
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	54
3.5	PREPARAÇÃO DO EXTRATO, EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS E METABÓLICOS.....	56
<b>3.5.1</b>	<b>Preparação do extrato aquoso da <i>Cissus verticillata</i>.....</b>	<b>56</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Análise qualitativa do extrato por UPLC-HRMS.....</b>	<b>56</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Teste do Campo Aberto.....</b>	<b>57</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Teste do Nado Forçado.....</b>	<b>57</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Teste da Borrifagem de Sacarose .....</b>	<b>58</b>
<b>3.5.6</b>	<b>Análise da alodinia mecânica pelo Teste de Von Frey .....</b>	<b>58</b>
<b>3.5.7</b>	<b>Análise dos parâmetros de glicose.....</b>	<b>59</b>
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	59
3.7	RESULTADOS .....	59
3.8	DISCUSSÃO .....	63
<b>4</b>	<b>AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS, COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS POR DIETA RICA EM GORDURA SATURADA E FRUTOSE EM UM MODELO</b>	

	<b>ANIMAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR E EM ANIMAIS SELVAGENS</b> .....	72
4.1	INTRODUÇÃO .....	72
4.2	OBJETIVOS .....	74
4.2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	74
4.2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	75
4.3	ANIMAIS .....	75
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	76
4.5	EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS, METABÓLICOS E NEUROQUÍMICOS .....	77
4.5.1	<b>Teste do Campo Aberto</b> .....	78
4.5.2	<b>Teste do Reconhecimento de Objeto</b> .....	78
4.5.3	<b>Teste do Nado Forçado</b> .....	78
4.5.4	<b>Teste da Esquiva Inibitória do tipo <i>step-down</i></b> .....	79
4.5.5	<b>Parâmetros metabólicos</b> .....	79
4.5.6	<b>Imunodeteção de proteínas por meio da técnica de Western Blotting</b> .....	80
4.5.7	<b>Processamento do encéfalo para a impregnação com Golgi</b> .....	81
4.5.8	<b>Análise de Sholl</b> .....	81
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	82
4.7	RESULTADOS .....	82
4.8	DISCUSSÃO .....	92
5	<b>CONCLUSÃO GERAL DA TESE</b> .....	98
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	100

## 1 INTRODUÇÃO

A evolução humana aconteceu em paralelo com a evolução do comportamento alimentar, e dois eventos parecem ter sido particularmente importantes para a interdependência desses fenômenos. O primeiro aconteceu há aproximadamente 790 mil anos, quando os homínídeos começaram a controlar o fogo, conforme apontam evidências obtidas de sementes, madeiras e pedras queimadas na região de Israel (Goren-Inbar *et al.*, 2004). Estudos que visam entender a evolução do cérebro humano creditam ao controle do fogo — e à possibilidade de induzir mudanças térmicas e calóricas nos alimentos — a desproporcional complexidade desse órgão nos humanos, afinal, mesmo com um corpo médio, possuímos o maior cérebro entre os primatas, incluindo os grandes macacos (Fonseca-Azevedo; Herculano-Houzel, 2012). Embora essa linha de pensamento seja apoiada por parte das evidências da literatura, não há total concordância. Por exemplo, outra linha sugere que, na verdade, o repertório de caça e coleta (forrageamento) dos homínídeos se aperfeiçoou, possibilitando ingestão de alimentos mais calóricos, como sementes e carnes (Cornélio *et al.*, 2016), potencializando a encefalização.

O segundo evento ocorreu há mais ou menos 10-12 mil anos, quando os *sapiens* descobriram, provavelmente devido à maior complexidade cerebral, que plantar sementes e procriar animais era energeticamente menos custoso do que caçar e coletar, criando, então, o que seria uma das maiores revoluções da história: a agricultura (Luca *et al.*, 2010). Desde a evolução do gênero *Homo*, que ocorreu há cerca de 2,5 milhões de anos (Dunsworth, 2010), até o desenvolvimento da agricultura, nossos ancestrais viveram basicamente como caçadores-coletores. Estimativas apontam que isso corresponde a aproximadamente 84 mil gerações (Fenner, 2005) e que, durante esse período de caça e coleta, nosso organismo interagia com os alimentos de forma diferente do que acontece hoje.

Devido à incapacidade de armazenar alimentos por falta de tecnologia, naquela época, a interação com a comida era intermitente, frequentemente ocorrendo períodos de jejum, o que provavelmente despertava mudanças neuroquímicas que induziam a busca por alimento. Por exemplo, o neurotransmissor dopamina, amplamente conhecido pelo envolvimento no comportamento motivado, é bem caracterizado como fundamental para o comportamento alimentar (Volkow; Wang; Baler, 2011). Em um estado de fome, neurônios dopaminérgicos localizados na área tegmentar ventral com projeções para o núcleo accumbens (via mesolímbica) apresentam aumento de atividade, o que está associado com o comportamento de

busca pelo alimento (Martel; Fantino, 1996). O reforço da obtenção do alimento foi importante para a seleção desse sistema, que é evolutivamente conservado entre diversas espécies devido ao seu papel fundamental para a sobrevivência, permitindo a reprodução destas.

Nossos ancestrais, na intermitência da disponibilidade alimentar, viviam períodos com menor ingestão calórica associados a momentos de atividade física como um comportamento obrigatório para busca alimentar, resultando, portanto, em maior gasto calórico diário. Atualmente, no entanto, o advento dos alimentos industrializados, em especial os ultraprocessados, permite o aumento do aporte calórico sem esforço, resultando em excesso no consumo calórico com baixo gasto energético. Essa incompatibilidade evolutiva, isto é, um sistema que foi selecionado em um ambiente e transitou rapidamente (em termos evolutivos) para outro, é questão-chave no número cada vez maior de pessoas com sobrepeso, obesidade e doenças associadas ao sedentarismo (Sapolsky, 2021).

## 1.1 SOBREPESO, OBESIDADE E DISLIPIDEMIA

O número de pessoas com sobrepeso e obesidade, caracterizados pelo excesso de gordura corporal que causa prejuízos à saúde, vem aumentando exponencialmente nos últimos anos em todo o mundo (Ng *et al.*, 2014; NCD Risk Factor Collaboration, 2017). Dados epidemiológicos indicam que o sobrepeso e a obesidade<sup>1</sup>, juntos, afetam 1/3 da população mundial (Koliaki; Dalamaga; Liatis, 2023). Resultado de um desequilíbrio energético, isto é, maior quantidade de calorias ingeridas do que gastas, o sobrepeso e a obesidade apresentam estreita relação com a crescente epidemia de disfunções metabólicas, como disfunções cardiovasculares, dislipidemia e diabetes mellitus (Rutledge; Adeli, 2007). Além disso, recentemente outros fatores têm se mostrado importantes na fisiopatologia do sobrepeso e da obesidade, como, por exemplo, alterações na microbiota (Liu *et al.*, 2021) e privação de sono (Cooper *et al.*, 2018).

O perfil clínico do sobrepeso e da obesidade é diretamente influenciado pela forma com que o organismo estoca energia. Se o excesso de energia resultar em hiperplasia do tecido adiposo subcutâneo (crescimento do tecido devido ao número de células), ocorrerá uma

---

<sup>1</sup>O critério para definir a obesidade é o IMC<sup>1</sup> (Índice de Massa Corporal), que varia entre baixo peso (<18,5 kg/m<sup>2</sup>) até obesidade grave ou mórbida (≥40 kg/m<sup>2</sup>), embora outros fatores sejam importantes, e.g., circunferência abdominal (WHO, 2000).

adaptação metabólica funcional, pois o crescimento desse tecido atuará como um “dreno metabólico”, impedindo que a gordura seja armazenada em tecidos magros, como fígado, coração e rins, atenuando potenciais riscos gerados pelo acúmulo de gordura. No entanto, o tecido adiposo pode sofrer hipertrofia, isto é, ocorre o armazenamento da gordura em adipócitos, que, com o tempo, podem romper-se, gerando o recrutamento de macrófagos e/ou aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, de modo a conferir um perfil de risco cardiometabólico ao indivíduo e favorecendo o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), problemas vasculares e dislipidemia (González-Muniesa *et al.*, 2017).

A dislipidemia é caracterizada por hipertrigliceridemia, aumento da secreção hepática de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *Very Low Density Lipoprotein*) e redução da lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoprotein*). No sobrepeso e na obesidade descompensados, frente a uma alimentação desbalanceada, o triglicerídeo, que deveria ser captado por quilomícrons e hidrolisado, acaba extravasando para a circulação sistêmica, favorecendo a síntese de VLDL pelo fígado e, por consequência, a dislipidemia (Yki *et al.*, 2019).

## 1.2 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia ocasionada pela deficiência na secreção ou resistência à ação da insulina (American Diabetes Association, 2015). Os principais tipos dessa doença incluem diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e diabetes mellitus gestacional (Saeedi *et al.*, 2019). A previsão é que o número de pessoas com diabetes no mundo cresça nos próximos anos, podendo chegar a 11,3% em 2030 (International Diabetes Federation, 2022).

O diagnóstico da DM é clínico e envolve a análise de marcadores que indicam hiperglicemia. Segundo a *American Diabetes Association*, o diagnóstico de diabetes é feito analisando os seguintes marcadores:

- Hemoglobina glicada (A1C): menos ou até 5,7% (normal), 5,7% a 6,4% (pré-diabetes) e 6,5% ou mais (diabético);
- Glicose sanguínea em jejum: menos que 99 mg/dL (normal), de 100 mg/dL até 125 mg/dL (pré-diabetes) e 126 mg/dL ou mais (diabetes); e

- Teste oral de tolerância à glicose: menos que 140 mg/dL (normal), de 140 mg/dL até 200 mg/dL (pré-diabetes) e 200 mg/dL ou mais (diabetes).

A DM2, responsável por aproximadamente 90% dos casos de diabetes (Saeedi *et al.*, 2019), surge de um desequilíbrio entre a secreção, depuração e ação da insulina em tecidos sensíveis a ela (Zheng *et al.*, 2018). Os principais propulsores da epidemia global de DM2 incluem o envelhecimento populacional, o sedentarismo e a disponibilidade de alimentos ultraprocessados, caracterizados por terem alta densidade energética, serem gordurosos e açucarados, e com elevada capacidade obesogênica e diabetogênica (American Diabetes Association, 2015; Zheng *et al.*, 2018). O sobrepeso e a obesidade favorecem o aparecimento da DM2 por diversas formas, e, classicamente, o aumento da resistência da ação da insulina, o baixo colesterol HDL, o VLDL alto e os triglicerídeos totais elevados são indicadores de risco para eventos de doença cardíaca coronária em pacientes com DM2 (Mooradian *et al.*, 2009).

Em termos fisiológicos, a disfunção na sinalização da insulina é resultado de um desequilíbrio na fosforilação de seus substratos, sendo que maior fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) em tirosina inicia a cascata de sinalização intracelular, ao passo que maior fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina atenua a via de sinalização (Petersen; Shulman, 2018). O aumento da fosforilação em resíduos de serina não tem explicação única, podendo ser consequência de inúmeros fatores. Porém, dados apontam que o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha*) dentre outros, podem atuar no aumento da fosforilação em serina, indicando que mediadores inflamatórios têm um papel na homeostase sistêmica de glicose (Hotamisligil *et al.*, 1996; Horng; Hotamisligil, 2011).

Uma das vias que favorecem o aparecimento da inflamação sistêmica de baixo grau é a hipertrofia dos adipócitos, justificando, do ponto de vista mecanicista, como o sobrepeso e a obesidade aumentam o risco de desenvolvimento de DM2 (DeFronzo *et al.*, 2015). Após a hipertrofia do adipócito, uma série de fatores pró-inflamatórios é liberada, como interleucina-6, TNF- $\alpha$ , proteína ligante de retinol 4 (RBP-4, do inglês *Retinol-Binding Protein 4*), dentre outros. O prejuízo funcional aparece quando esse perfil pró-inflamatório sinaliza receptores que, em última instância, favorecem a fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina, atenuando

a via de sinalização intracelular da insulina. Outros mecanismos, como estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, também atuam em conjunto nesse contexto (DeFronzo *et al.*, 2015).

Clinicamente, os tratamentos de entrada para a DM2 envolvem a mudança no estilo de vida e o fármaco metformina. A metformina é um medicamento amplamente prescrito para a DM2. Seu mecanismo de ação primário não é totalmente elucidado, mas sabe-se que envolve a ativação da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), uma enzima envolvida no balanço energético celular. Essa ativação reduz a glicose no sangue, predominantemente por diminuir a produção hepática, aumentando a captação de glicose independente da insulina nos tecidos periféricos, o que melhora a sensibilidade à insulina (Rena *et al.*, 2017) e promove o metabolismo dos ácidos graxos (Zang *et al.*, 2004). Diferentemente da DM1, a DM2 pode ser manejada, em estágios não graves, sem a necessidade da reposição de insulina. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, cerca de 1 em cada 10 adultos vive com a diabetes (10,5%), sendo que desse total cerca de 10% apresentam DM1.

A DM1 é uma doença crônica autoimune caracterizada por aumento dos níveis de glicose sanguínea (hiperglicemia), resultado da deficiência insulínica proveniente da perda de massa pancreática (Katsarou *et al.*, 2017). Os fatores de risco para a DM1 são uma combinação que envolve predisposição genética associada a fatores ambientais que promovem a destruição autoimune específica de células beta pancreáticas produtoras de insulina (Atkinson; Eisenbarth, 2001).

Embora o evento desencadeante da DM1 seja desconhecido, por se tratar de uma doença imunomediada, o mecanismo é relativamente conhecido. As células betas pancreáticas produtoras de insulina interagem com células T CD4<sup>+</sup> do sistema imunológico e acredita-se que algum fator ambiental, possivelmente um vírus (Katsarou *et al.*, 2017), desencadeie uma resposta imunológica contra as células beta pancreáticas. A produção de anticorpos e o recrutamento de células do sistema imunológico resultam no ataque às células produtoras de insulina. Além disso, embora normalmente nosso organismo possua um sistema de histocompatibilidade mediado pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) que forma uma barreira protetora frente às reações autoimunes, dados indicam que na DM1 esse complexo está disfuncional, favorecendo a destruição de células beta pancreáticas pelo sistema imunológico do indivíduo (Katsarou *et al.*, 2017).

Classicamente, a DM1 é dividida em três grandes estágios. O estágio 1 é caracterizado pela presença de anticorpos, perda de células beta pancreáticas, mas ausência de hiperglicemia. O estágio 2 compreende a presença de anticorpos, aumento da perda de células beta pancreáticas e início da hiperglicemia, que se agravará no estágio 3 (clínico), quando os sintomas clássicos da DM1 surgem. O pico de diagnósticos de DM1, indicando presença do estágio 3, ocorre por volta dos 10 aos 14 anos de idade (Katsarou *et al.*, 2017). Devido à perda das células beta pancreáticas produtoras de insulina, o tratamento envolve majoritariamente a reposição de insulina. Graças ao advento da tecnologia, atualmente temos diferentes categorias de insulina com diferentes tempos de ação (Pathak *et al.*, 2019).

Entre as complicações da diabetes, a neuropatia diabética é uma condição clinicamente comum tanto na DM1 quanto na DM2. Caracterizada por danos aos nervos periféricos, a neuropatia diabética pode ocorrer em até metade dos pacientes com diabetes (Feldman *et al.*, 2019) e seu mecanismo patogênico, tendo como principal alvo neurônios sensoriais, envolve diversas vias. Por exemplo, a hiperglicemia e a dislipidemia, associadas à sinalização disfuncional da insulina, favorecem a atividade de diversas vias nocivas para os neurônios sensoriais periféricos, como vias inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo), estresse osmótico, danos ao DNA, disfunção mitocondrial e apoptose (Feldman *et al.*, 2019). Alguns lipídios, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), são oxidados pelas espécies reativas de oxigênio e ativam uma série de cascatas de sinalização intracelular, favorecendo a lesão nervosa progressiva (Vincent *et al.*, 2009). Paralelamente, a hiperglicemia e a dislipidemia atuam aumentando os produtos de glicação avançada (AGE, do inglês *Advanced Glycation End-products*), que se ligam a um receptor específico (RAGE), favorecendo a sinalização inflamatória.

É importante ressaltar que a presença de dano tecidual não necessariamente significa dor. Dos pacientes com neuropatia diabética, aproximadamente 30-50% deles desenvolvem dor neuropática (Abbott *et al.*, 2011). A dor pode ser constante e acompanhada de alodinia cutânea, ou seja, dor causada por estímulo que normalmente não geraria dor, afetando substancialmente a qualidade de vida dos pacientes (Schreiber *et al.*, 2015). Os mecanismos da dor neuropática ainda estão em investigação, mas um dos potenciais caminhos envolve o aumento do metilglioxal, um potente precursor dos AGEs. Por exemplo, Bierhaus *et al.* (2012) mostraram que pacientes com diabetes e dor neuropática apresentavam maior concentração plasmática de metilglioxal que pacientes diabéticos sem dor (Bierhaus *et al.*, 2012). Além disso, os autores

mostraram que a administração de metilglioxal em modelos animais de dor neuropática induzida por estreptozotocina aumentou a ativação de canais de sódio voltagem-dependentes, facilitando potenciais de ação em neurônios nociceptivos, possivelmente sendo essa a via pela qual a dor é facilitada (Bierhaus *et al.*, 2012).

Apesar das complicações bem conhecidas relacionadas ao diabetes, i.e., neuropatia diabética, lesões vasculares e renais, arteriosclerose etc., evidências convergentes indicam que tanto a DM1 quanto a DM2 provocam alterações ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC) (Wrighten *et al.*, 2009; Pruzin *et al.*, 2018). Por exemplo, sabe-se que elevações persistentes na glicemia, quadro frequentemente observado em pacientes com sobrepeso, obesidade e diabetes, são um fator de risco para demência, mesmo entre pessoas sem diabetes (Crane *et al.*, 2013). Além disso, observou-se que elevação pontual na glicemia<sup>2</sup> foi capaz de reduzir a aprendizagem dependente de hipocampo em sujeitos saudáveis não obesos (Attuquayefio *et al.*, 2017).

### 1.3 PROBLEMAS METABÓLICOS E DISFUNÇÕES COGNITIVAS

As primeiras evidências de que disfunções metabólicas se correlacionam com disfunções cognitivas surgiram na década de 90, quando se observou que pacientes com DM2 apresentavam maiores riscos de desenvolver demência (Ott *et al.*, 1996; Ott *et al.*, 1999). Subseqüentes estudos epidemiológicos confirmaram essa associação (Crane *et al.*, 2013) e demonstraram que alterações metabólicas, como hiperglicemia ou resistência à insulina, definida aqui como baixa responsividade celular à insulina, correlacionam-se positivamente com o desenvolvimento de demência, a exemplo da doença de Alzheimer (Okereke *et al.*, 2008).

Estudos adicionais demonstraram que pacientes com diabetes apresentam mais comumente transtornos psiquiátricos (Maia *et al.*, 2012), como ansiedade (Grigsby *et al.*, 2002) e depressão. Por exemplo, Anderson *et al.* (2001) revisaram estudos da literatura e mostraram que a probabilidade de pacientes com diabetes desenvolverem depressão é duas vezes maior quando comparados aos seus controles. Por outro lado, há evidências que sugerem não haver associação entre ambas as patologias e que a presença de diabetes não prediz o aparecimento de sintomas de depressão e ansiedade (Engum, 2007). Além disso, Palinkas *et al.* (2004)

---

<sup>2</sup>Quatro dias de um café hipercalórico. Calorias do café da manhã do grupo experimental: 3658 kJ - Calorias do café da manhã do grupo controle: 2941 kJ.

mostraram que a presença de sintomas de depressão prediz o aparecimento de sintomas diabéticos, mas não o contrário.

Os mecanismos pelos quais as disfunções metabólicas levam ao desenvolvimento de problemas cognitivos, comportamentais e aumento da sensibilidade à dor não foram totalmente elucidados. Estudos com modelos animais de disfunções metabólicas induzidas por dietas hipercalóricas sugerem diversos mecanismos envolvidos. Por exemplo, no contexto da perda de memória, Moreira *et al.* (2014) mostraram que camundongos *Swiss* alimentados com dieta rica em gordura/colesterol por 8 semanas apresentaram aumento das concentrações plasmáticas de colesterol, triglicerídeos e prejuízo na memória espacial, além do aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase, alvo de medicamentos visando ao tratamento paliativo da Doença de Alzheimer (DA). Adicionalmente, Braga *et al.* (2021) mostraram que camundongos C57Bl/6 fêmeas submetidas a uma dieta hipercalórica (61% rica em gordura saturada) desenvolveram disfunções metabólicas, como intolerância à glicose, hiperlipidemia e aumento do peso, bem como disfunções comportamentais, como comportamento do tipo depressivo.

Nessa linha, de Souza *et al.* (2021) mostraram que camundongos *Swiss* fêmeas e machos alimentados com uma dieta rica em frutose apresentam alterações metabólicas, como intolerância à glicose, aumento do peso, aumento do colesterol e triglicerídeos, bem como disfunções comportamentais do tipo depressivo e ansioso. Ademais, nosso laboratório mostrou que camundongos nocautes para o receptor LDL (LDLr<sup>-/-</sup>), um modelo experimental de hipercolesterolemia familiar, de meia-idade são mais suscetíveis a um déficit de memória de curto e longo prazo avaliados no teste de esquiva inibitória do tipo *step-down*, associado ao aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no córtex pré-frontal, quando comparado à animais controles para genótipo (Moreira *et al.*, 2012).

Adicionalmente, nosso grupo mostrou que o comprometimento cognitivo em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> foi acompanhado por uma exacerbação da apoptose neuronal em regiões cerebrais relacionadas à formação de memória, mas não por alterações no processamento ou nos níveis de  $\beta$ -amiloide (de Oliveira *et al.*, 2020), um peptídeo relacionado com a neurobiologia da DA. Além disso, estudos demonstraram que o encéfalo afetado pela DA, principal tipo de doença neurodegenerativa caracterizada por causar perda de memória e alteração do humor, apresenta disfunções e alterações na cascata de sinalização da insulina semelhantes àquelas vistas nos tecidos periféricos de pacientes com DM2 (Bomfim *et al.*, 2012; Talbot *et al.*, 2012), sugerindo que as patologias possam compartilhar mecanismos semelhantes.

Nesse contexto, abordagens terapêuticas usando drogas antidiabéticas para melhorar a sinalização da insulina poderiam prevenir as disfunções cognitivas e comportamentais induzidas por DM1 e DM2.

Embora exista um grande avanço no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos que associam a DM a outras patologias, os estudos ainda buscam entender a relação entre os dois fenômenos. No contexto da neuropatia diabética, por exemplo, estudos com modelos animais procuram entender como a hiperglicemia afeta o organismo tanto a nível periférico quanto a nível central. Nesses estudos, a DM1 é comumente induzida via administração de estreptozotocina (STZ, do inglês *Streptozotocin*), uma toxina que destrói células beta pancreáticas secretoras de insulina, causando deficiência nesse hormônio, o que resulta em uma fisiopatologia semelhante à DM1. No modelo animal de DM1, a hiperglicemia gerada via administração de STZ é feita usando um dos dois paradigmas recomendados: uma única dose alta (aproximadamente 150 mg/kg) ou múltiplas doses baixas consecutivas (aproximadamente 50 mg/kg/dia por 5 dias) de STZ (O'Brien, P. *et al.*, 2014). Por exemplo, o estudo de Kellog e Pop-Busui (2005) mostrou que o tratamento de camundongos C57Bl/6 com 40 mg/kg de STZ por quatro dias foi suficiente para induzir aumento de até 4x na glicemia. Além disso, os autores mostraram que os animais desenvolveram neuropatia diabética com esse mesmo protocolo de tratamento.

Diferentemente do modelo de DM1 no qual a destruição química das células produtoras de insulina resulta em hiperglicemia semelhante à condição humana, no DM2 existem diferentes tipos de modelos que podem abranger distintos níveis de resistência à insulina de acordo com o comprometimento metabólico. Por exemplo, existe o modelo que envolve modificações nos genes que codificam a leptina, um hormônio responsável pela regulação energética e saciedade. Mutações nesse gene resultam na impossibilidade de produção da leptina, gerando aumento do consumo calórico, que, em última análise, ocasiona obesidade grave e disfunções metabólicas severas observadas na DM2 avançada em humanos (Drel *et al.*, 2006).

Estratégias dietéticas, no entanto, são também usadas para induzir modelos animais de DM2 naqueles sem alterações genéticas. Nesses casos, os animais são expostos a uma dieta rica em açúcar e/ou gordura capaz de induzir disfunções metabólicas semelhantes às encontradas em pacientes com DM2, como resistência à ação da insulina e hiperglicemia. Interessantemente, os animais nesse padrão dietético apresentam um início gradual de

desequilíbrios metabólicos que são característicos da condição humana, como ganho de peso, aumento da adiposidade, hiperinsulinemia moderada, intolerância à glicose e neuropatia diabética (Obrosova *et al.*, 2007; Guilford *et al.*, 2011).

A nível de SNC, essas alterações metabólicas induzidas por dieta hipercalórica podem gerar uma série de complicações, a saber: aumento do estresse oxidativo (Fuentes *et al.*, 2023), inflamação (Elzinga *et al.*, 2022), redução da plasticidade sináptica (González *et al.*, 2023), disfunção mitocondrial (Langley *et al.*, 2020), dentre outras. Os tratamentos atuais para complicações decorrentes de um estilo de vida desadaptativo têm em sua maioria alvos periféricos. Dadas as complicações centrais, é importante entender como a terapêutica age a nível de SNC, bem como investigar novas possibilidades interventivas.

Diante desse cenário, este estudo empregou uma combinação de abordagens ambientais e genéticas para induzir disfunções metabólicas em camundongos, procurando relacioná-las com o desenvolvimento de prejuízos comportamentais, cognitivos e neuroquímicos, buscando também avaliar potenciais intervenções farmacológicas. Aqui, temos a hipótese de que as disfunções metabólicas se relacionam com prejuízos comportamentais, possuindo correlatos neurobiológicos, o que será exacerbado por vulnerabilidades genéticas.

Para melhor organização e entendimento do conteúdo, a presente Tese foi dividida em três diferentes seções, estruturadas e discutidas de forma independente. Na seção dois, tivemos como objetivo caracterizar a presença de prejuízos metabólicos e comportamentais em camundongos modelos de diabetes tipo 1 e de disfunções metabólicas induzidas por dieta rica em gordura saturada e frutose, bem como avaliar os potenciais efeitos preventivos do fármaco metformina. Na seção três, usando os mesmos modelos animais, procuramos avaliar os potenciais efeitos preventivos do extrato aquoso da planta *Cissus verticillata*, popularmente usada como insulina vegetal. Por fim, na seção quatro, procuramos avaliar os efeitos de uma dieta rica em gordura saturada e frutose em parâmetros metabólicos e comportamentais, buscando correlacioná-los com marcadores de plasticidade sináptica, tanto em nível neuroquímico quanto morfológico, em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> e camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem.

## **2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DO FÁRMACO HIPOGLICEMIANTE METFORMINA EM ALTERAÇÕES METABÓLICAS, COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS POR UMA DIETA RICA EM GORDURA E FRUTOSE, E EM MODELO DE DIABETES TIPO 1 INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ) EM CAMUNDONGOS**

Considerando dados da literatura mostrando que (i) ambas as formas de DM alteram o comportamento e o metabolismo dos camundongos, (ii) que os medicamentos antidiabéticos podem prevenir lesões cerebrais induzidas pelo DM e (iii) que a metformina é um medicamento amplamente prescrito para DM2, a presente seção teve como objetivo determinar se a metformina exerce efeitos benéficos sobre os desfechos metabólicos e comportamentais no modelo T1D induzido por STZ e no modelo de disfunção metabólica induzida por HFFD em camundongos e sua relação com o metabolismo periférico da glicose.

### **2.1 INTRODUÇÃO**

O Diabetes Mellitus é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia devido à secreção ou ação prejudicada da insulina (American Diabetes Association, 2015). Os principais tipos desta doença incluem diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e diabetes mellitus gestacional (Saeedi *et al.*, 2019). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (2021), a prevalência mundial estimada de diabetes (DM1 e DM2 combinadas) em pessoas com idade entre 20 e 79 anos aumentou de 151 milhões em 2000 para 463 milhões em 2019 e 537 milhões em 2021. A DM1 resulta da combinação de uma predisposição genética associada a fatores ambientais que promovem a destruição autoimune específica das células beta pancreáticas produtoras de insulina (Atkinson; Eisenbarth, 2001). Por outro lado, o DM2, que é responsável por aproximadamente 90% dos casos (Saeedi *et al.*, 2019), surge de um desequilíbrio entre a ação da insulina nos tecidos sensíveis a ela (resistência à insulina), a sua secreção (disfunção das células beta no DM2) e a sua depuração (Zheng *et al.*, 2018).

Apesar das complicações bem reconhecidas relacionadas ao diabetes, evidências convergentes indicam que tanto o DM1 quanto o DM2 têm impacto significativo na plasticidade

cerebral e na neurotransmissão, levando a comorbidades (Wrighten *et al.*, 2009; Pruzin *et al.*, 2018). Em particular, as taxas de depressão entre indivíduos com DM1 ou DM2 ao longo da vida são duas vezes mais altas do que na população em geral (Ducat *et al.*, 2014). Além disso, a neuropatia diabética também é uma complicação comum de DM1 e DM2 (Feldman *et al.*, 2019).

A dor pode ser constante e acompanhada de alodinia cutânea, afetando substancialmente a qualidade de vida dos pacientes (Schreiber *et al.*, 2015). Adicionalmente às evidências clínicas, estudos pré-clínicos demonstraram que roedores alimentados com uma dieta ocidental (HFFD), rica em gordura e açúcar, apresentam deficiências metabólicas e comportamentais, como, por exemplo, obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e comportamentos depressivos e ansiosos (Zemdegs *et al.*, 2016; Hassan *et al.*, 2019; De Souza *et al.*, 2021). Além disso, evidências pré-clínicas sugerem que o DM1 induzido por STZ está associado a deficiências comportamentais em camundongos, por exemplo, comportamentos semelhantes à ansiedade e ao tipo depressivo (Yuan *et al.*, 2019). Modelos de camundongos com obesidade induzida por dieta e DM1 induzido por STZ em camundongos também estão associados ao fenótipo de neuropatia (O'Brien *et al.*, 2018).

É digno de nota que várias linhas de evidência apontam para o desenvolvimento de resistência cerebral à insulina como uma possível ligação entre diabetes e distúrbios neuropsiquiátricos (Rasgon; Kenna, 2005). Nesse contexto, abordagens terapêuticas utilizando medicamentos antidiabéticos para melhorar a sinalização da insulina poderiam prevenir a disfunção cerebral induzida por DM1 e DM2. A metformina, por exemplo, é um medicamento amplamente prescrito para DM2. Seu principal mecanismo de ação envolve a ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), uma enzima relacionada ao equilíbrio energético celular e de todo o organismo. Essa ativação diminui a glicose no sangue, predominantemente regulando de modo negativo a produção do fígado, o que aumenta a captação de glicose independente da insulina nos tecidos periféricos, diminuindo os níveis circulantes de insulina (Rena *et al.*, 2017) e promovendo o metabolismo dos ácidos graxos (Zang *et al.*, 2004).

A existência de dados que sugerem associação entre DM, transtornos psiquiátricos e neurológicos levou ao interesse em entender os efeitos da metformina no SNC. De fato, estudos já demonstraram potencial efeito terapêutico do fármaco em pessoas diagnosticadas com depressão. Por exemplo, Guo *et al.* (2014) recrutaram 58 participantes com diagnóstico de

depressão e DM2, e dividiram em dois grupos, um tratado com metformina e outro tratado com placebo, durante 24 semanas. Como resultado, notou-se que o tratamento crônico com metformina melhorou o desempenho cognitivo em pacientes deprimidos com DM2. Além disso, os sintomas depressivos foram negativamente correlacionados com o desempenho cognitivo nos participantes tratados com metformina, levantando a possibilidade de que a administração suplementar de medicamentos antidiabéticos pode melhorar a recuperação da depressão em pacientes com essas duas patologias.

Na mesma direção, dados mostraram que pacientes com DM2 que usaram metformina como tratamento apresentaram redução do declínio das funções cognitivas na velhice e apresentaram menor risco de desenvolver demência quando comparado aos que não usaram metformina (Samaras *et al.*, 2020). Em modelos animais, os efeitos da metformina a nível de SNC são estudados visando encontrar os potenciais mecanismos que explicam tais efeitos terapêuticos. Por exemplo, Fang *et al.* (2020) mostraram que camundongos C57Bl/6 tratados com metformina apresentaram melhora dos comportamentos depressivos induzidos por estresse social e apontaram como potencial mecanismo para esse efeito o aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, da sigla em inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*). Além disso, outros estudos avaliaram diversos potenciais alvos terapêuticos da metformina no SNC em contextos de disfunções comportamentais, a exemplo da diminuição da inflamação (Du *et al.*, 2022), das alterações em nível mitocondrial (Lin *et al.*, 2022) e modificações no padrão de aminoácidos circulantes (Zemdegs *et al.*, 2016).

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Objetivo geral

Caracterizar, em camundongos *Swiss*, a presença de prejuízos metabólicos e comportamentais em modelo de diabetes do tipo 1 induzido por STZ e de disfunções metabólicas induzida por uma dieta rica em gordura saturada e frutose, avaliando os potenciais efeitos preventivos do fármaco hipoglicemiante metformina.

### 2.2.2 Objetivos específicos

Avaliar os parâmetros:

a) Metabólicos:

- Acompanhamento da massa corporal dos animais.
- Medidas da concentração plasmática de colesterol total, glicose e insulina.
- Mensuração indireta da secreção de insulina por meio do Teste de Tolerância à Glicose.

b) Comportamentais:

- Locomoção espontânea e comportamento do tipo ansioso no Teste do Campo Aberto.
- Avaliação do comportamento do tipo depressivo no Teste da Suspensão pela Cauda.
- Avaliação do comportamento do tipo anedônico por meio do Teste de Borrifagem de Sacarose.
- Mensuração do limiar de alodinia mecânica por meio do Teste de Von Frey.

c) Neuroquímicos:

- Quantificação do imunoconteúdo da enzima GSK-3 $\beta$  fosforilada no hipocampo e no córtex pré-frontal.

### 2.3 ANIMAIS

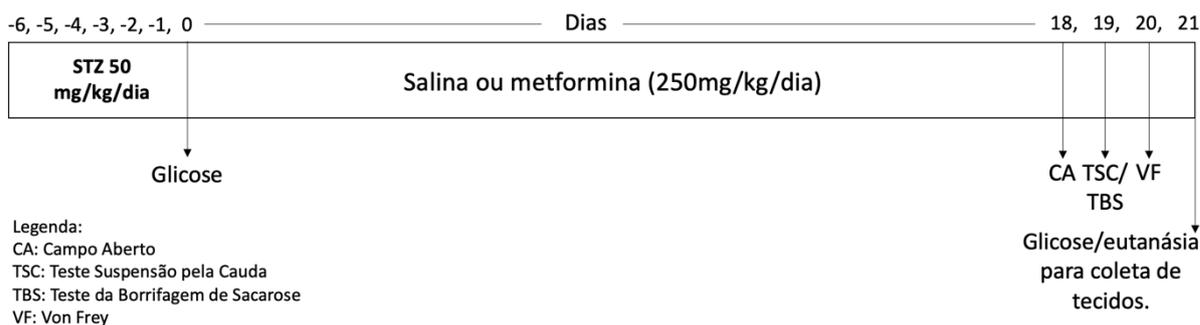
Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com três meses de idade ao início dos protocolos, provenientes do biotério central da universidade. Inicialmente os animais foram alojados em gaiolas coletivas, mantidos em um ambiente de temperatura controlada entre 22 e 24 graus, de acordo com as recomendações do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica do CONCEA (Resolução Normativa 13, 2013). Todos os animais tiveram livre acesso a água e comida. O ciclo de luminosidade claro/escuro foi de 12h, iniciando o ciclo claro às 6h da manhã. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC), de acordo com a Lei Federal 11.794, de 2008, sob o número 3143051019.

Em todos os delineamentos experimentais, de todas as seções da presente tese, onde constar a administração de fármacos e/ou drogas por meio da via intraperitoneal (i.p.), um

volume de administração de 0,1 mL por 10 gramas de peso corporal dos animais foi respeitado. Os animais foram monitorados em suas gaiolas-moradias diariamente e, na presença de sinais clínicos indicativos de dor ou estresse — ambulação prejudicada, não permitindo aos animais acesso a comida e água; excessiva perda de peso; prolongada dificuldade de se manter na posição vertical, dentre outros sinais indicativos de um estado moribundo —, os animais foram imediatamente excluídos do estudo sendo realizada a eutanásia destes (*humane endpoint*), de acordo com Stokes (2002). Nestes casos, os animais foram eutanasiados por meio de administração de dose excessiva de uma mistura dos anestésicos cetamina (150 mg/kg; i.p.) e xilazina (30 mg/kg; i.p.). A análise dos parâmetros de eutanásia humanitária teve como base o documento ENV/JM/MONO(2000) da OECD “*GUIDANCE DOCUMENT ON THE RECOGNITION, ASSESSMENT, AND USE OF CLINICAL SIGNS AS HUMANE ENDPOINTS FOR EXPERIMENTAL ANIMALS USED IN SAFETY EVALUATION*”.

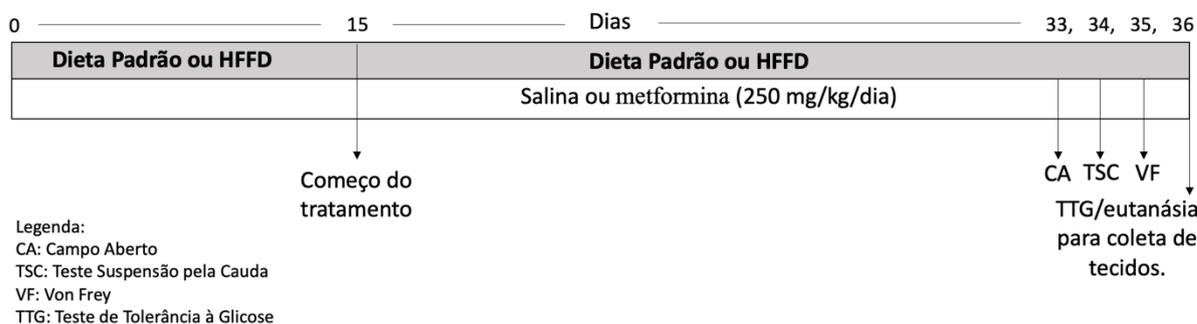
#### 2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.

A DM1 foi induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de STZ (50 mg/kg, Sigma-Aldrich, EUA), dissolvida em tampão citrato 1 M, pH 4,5, por cinco dias consecutivos (Like; Rossini, 1976). A glicemia foi monitorada dentro de dois dias após a última injeção de STZ, e os animais com glicemia  $\geq 250$  mg/dL por dois testes consecutivos foram considerados diabéticos. Na sequência, camundongos controle e diabéticos (N 6-7) foram tratados por 21 dias com veículo ou metformina, na dose de 200 mg/kg/dia, via gavagem oral (o.g.) todos os dias. Após dezoito dias de tratamentos, uma bateria de testes comportamentais relacionados ao fenótipo do tipo ansiogênico, depressivo e limiar de alodinia mecânica foi conduzida da seguinte forma: Teste do Campo Aberto (dia 18), Teste da Suspensão pela Cauda/Teste da Borrifagem de Sacarose (dia 19) e Teste de Von Frey (dia 20). O Teste da Borrifagem de Sacarose foi realizado com um grupo independente de animais e apenas nos animais modelos de DM1, visto que a presença de frutose na água de beber pode enviesar o dado no modelo de disfunção metabólica induzida por dieta. Um dia depois do último teste, os animais foram privados de comida por seis horas, foi realizada a dosagem da glicose dos animais e, em seguida, eles foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg; i.p.) e xilazina (10 mg/kg; i.p.) para coleta de material.



**Figura 1.** Desenho experimental 1: modelo de diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina.

Para induzir alterações metabólicas via dieta, dois grupos de camundongos (N 18) foram separados de modo aleatório e alimentados diariamente com diferentes dietas por 15 dias: dieta padrão (DP) para roedores (Nuvilab CR1, Nuvital; 137 Quimtia Nutrientes SA, Brasil) ou dieta rica em gordura saturada (60%) (PragSoluções) mais água potável filtrada contendo 10% de frutose (p/v; LabSynth, Brasil) (HFFD, do inglês *High-Fat-Fructose Diet*) conforme anteriormente padronizado por nosso grupo (Veloso *et al.*, 2021). A água contendo frutose foi renovada a cada dois dias. Na sequência, ambos os grupos foram tratados, por 21 dias, com veículo ou metformina, na dose de 200 mg/kg/dia todos os dias via o.g. Após 17 dias de tratamentos, iniciou-se uma bateria de testes comportamentais, composta pelo Teste do Campo Aberto (dia 33), Teste de Suspensão da Cauda (dia 34) e o Teste de Von Frey (dia 35). Um dia após o último teste, os camundongos foram privados de comida por seis horas, e o Teste de Tolerância à Glicose foi realizado (dia 37). Um dia depois, os camundongos foram novamente privados de comida por seis horas, anestesiados para coleta de sangue via punção cardíaca e posteriormente o córtex pré-frontal e o hipocampo foram dissecados para determinar os níveis de pGSK-3 $\beta$ .



**Figura 2.** Desenho experimental 2: modelo de disfunções metabólicas induzidas por dieta rica em gordura e frutose.

## 2.5 EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS, METABÓLICOS E NEUROQUÍMICOS

Para todos os parâmetros comportamentais analisados, ressalta-se que os pesquisadores estavam em uma sala separada avaliando o comportamento dos animais por meio de uma *webcam* colocada na sala experimental e completamente cegos aos grupos experimentais. Os experimentos foram realizados no horário da manhã, entre 9 e 12h, em uma sala com temperatura controlada em 22 graus e com luminosidade em torno de 20-30 lux (luz vermelha).

### 2.5.1 Teste do Campo Aberto

O campo aberto foi usado para avaliar as atividades locomotoras e exploratórias induzidas por um novo ambiente. O aparelho, feito de madeira e revestido com fórmica impermeável, tinha 50 cm de largura × 50 cm de profundidade × 40 cm de altura. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e permitiu explorar o aparelho por 5 minutos livremente. Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: % de cruzamentos no centro, tempo no centro e número total de cruzamentos.

### 2.5.2 Teste de Suspensão pela Cauda

Desenvolvido por Steru *et al.* (1985), este teste parte da premissa de que um animal submetido a uma situação estressante e inevitável apresenta dois tipos de comportamentos: a agitação característica da tentativa de fuga da situação estressante e a imobilidade. Os camundongos, isolados tanto acusticamente quanto visualmente, foram suspensos 30 cm acima do chão por fita adesiva colocada a aproximadamente 1 cm da ponta da cauda. O tempo para a primeira imobilidade e o tempo total de imobilidade foi registrado manualmente durante um período de 6 minutos por um observador experiente.

### 2.5.3 Teste da Borrifagem de Sacarose

Este teste seguiu o protocolo descrito por Isingrini *et al.* (2010) com pequenas modificações. Especificamente, ele consistiu em esguichar uma solução de sacarina a 10% no dorso de um camundongo colocado individualmente em sua gaiola. Por causa de sua viscosidade, a solução de sacarina suja a pele do camundongo e os animais iniciam o comportamento de autolimpeza. Após a aplicação da solução de sacarina, o tempo de autolimpeza e a latência foram registrados por um período de 5 min como um índice de autocuidado e comportamento motivacional, considerado paralelo a alguns sintomas de depressão, como o comportamento apático.

#### **2.5.4 Análise da alodinia mecânica pelo Teste de Von Frey**

A alodinia mecânica foi avaliada de acordo com o método descrito por Chaplan *et al.* (1994). Os camundongos foram aclimatados por uma hora em caixas de acrílico em uma plataforma elevada com o chão composto de tela de arame para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras. Filamentos de Von Frey (0,02; 0,07; 0,16; 0,4; 1,4; 4,0; 8,0 gramas) foram aplicados verticalmente sobre a superfície plantar da pata traseira direita até observar sua curvatura sutil. O primeiro filamento usado foi de 0,4 g e o próximo filamento foi aumentado ou diminuído de acordo com a resposta de retirada da pata. A frequência de resposta é considerada após 6 aplicações dos filamentos de Von Frey, e o limiar mediano de retirada da pata foi determinado usando uma adaptação do método de Dixon.

#### **2.5.5 Análise dos parâmetros de glicose e colesterol**

A tolerância à glicose foi avaliada após seis horas de jejum calórico (das 06:00 às 12:00) e uma injeção i.p. de 2 g/kg de glicose (Sigma Aldrich). A glicose no sangue foi retirada através de um pequeno corte na ponta da cauda após 0, 15, 30, 60 e 120 minutos usando um glicosímetro (Accu-check, Roche Diagnostic). A área sob a curva para glicose no sangue (AUC) foi calculada após a normalização pelos valores de linha de base (tempo 0). O colesterol total foi medido no plasma por meio do kit enzimático de acordo com as instruções do fabricante (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Brasil). Os resultados foram expressos em mg/dL. Os níveis de insulina no plasma em jejum foram quantificados pelo sistema AlphaLisa® (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA, cat. No. AL204) de acordo com as instruções do fabricante.

### 2.5.6 Imunodeteção de proteínas usando a técnica ELISA

Os cérebros foram removidos e o hipocampo e o córtex pré-frontal foram imediatamente dissecados e homogeneizados com tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 20 IU de aprotinina A. Os homogenatos foram centrifugados a  $3000 \times g$  por 10 min e os sobrenadantes foram armazenados em um freezer com temperatura em  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até os ensaios para a determinação dos níveis de pGSK-3 $\beta$  serem realizados. Os níveis de pGSK-3 $\beta$  foram avaliados usando kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems, EUA), e os resultados são expressos em picogramas por miligrama de proteína em cada amostra. O conteúdo de proteína foi avaliado pelo método de Bradford.

### 2.5.7 Escores Z

A normalização Z é uma metodologia que padroniza as observações obtidas em diferentes momentos e em diferentes coortes, permitindo assim a sua comparação e/ou compilação. Ferramentas matemáticas foram usadas para normalizar os dados brutos metabólicos e comportamentais para a média dos grupos controle dentro de cada coorte experimental. Os dados foram então integrados em um único valor denominado escores z metabólicos e neurocomportamentais, respectivamente. Seus valores foram obtidos subtraindo a média das observações em uma população do valor individual de cada animal e dividindo essa diferença pelo desvio padrão da população, conforme descrito anteriormente (Zemdegs *et al.*, 2016). Esse tipo de normalização permite que dados em diferentes escalas sejam comparados.

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

$x$  = valor individual de cada animal;

$\mu$  = média da população;

$\sigma$  = desvio padrão da população.

O escore z metabólico para o modelo DM1 induzido por STZ e o modelo de disfunção metabólica induzida por HFFD incluiu glicemia, variação de massa corporal e níveis de

colesterol e insulina no plasma. O escore z neurocomportamental para o modelo DM1 induzido por STZ e o modelo de disfunção metabólica induzida por HFFD incluiu os parâmetros medidos em campo aberto (porcentagem de cruzamentos de centro e tempo de centro em segundos), Teste de Suspensão de Cauda (latência para imobilidade e tempo de imobilidade) e Teste de Von Frey (limiar mecânico de 50%). Vale ressaltar que, para evitar qualquer efeito ponderado dos testes com mais de um parâmetro medido, calculamos a média desses parâmetros comportamentais normalizados nos testes para obter um único valor por animal e teste comportamental.

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

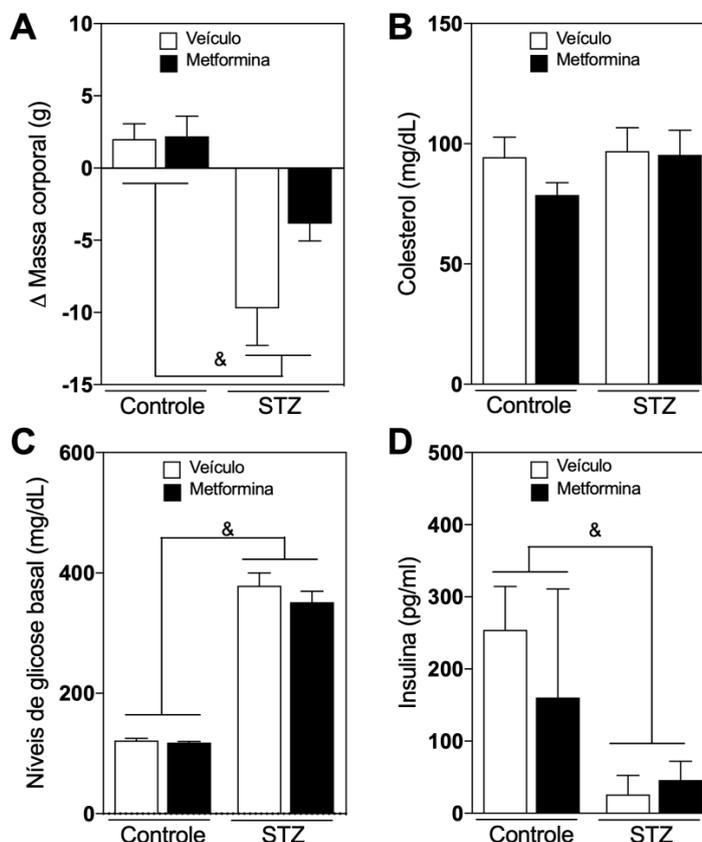
Os dados são expressos como média + erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por meio de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (fatores: modelo, tratamento), com medidas repetidas quando apropriado. Após efeitos de interação significativos, testes *post-hoc* foram realizados (Teste de Newman-Keuls). A relação linear entre os escores z metabólicos e neurocomportamentais foi analisada pelo *r* de Pearson após um teste de normalidade de Shapiro-Wilk. O nível de significância aceito para todos os testes foi  $p \leq 0,05$ . Todos os testes foram realizados com o pacote de *software* STATISTICA® (StatSoft Inc, Tulsa, OK, EUA).

## 2.7 RESULTADOS

### *Modelo de DM1 induzido por STZ*

Na primeira parte do estudo, o DM1 foi induzido por múltiplas injeções de STZ em camundongos. Após isso, foram avaliados os efeitos da administração crônica de metformina em desfechos metabólicos e comportamentais. A ANOVA de duas vias indicou que camundongos tratados com STZ exibiram perda de peso corporal [efeito principal significativo de STZ,  $F(1,21) = 24,97$ ,  $p \leq 0,0001$ ; Fig. 3A]. Como esperado, os camundongos tratados com STZ apresentaram níveis mais elevados de glicose no sangue [efeito principal significativo de STZ,  $F(1,21) = 236,47$ ,  $p \leq 0,00001$ ; Fig. 3C] e níveis mais baixos de insulina no plasma [efeito principal significativo de STZ,  $F(1,21) = 6,11$ ,  $p \leq 0,05$ ; Fig. 3D], enquanto a metformina não

afetou ambos os parâmetros. Além disso, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos nos níveis de colesterol no plasma (Fig. 3B).

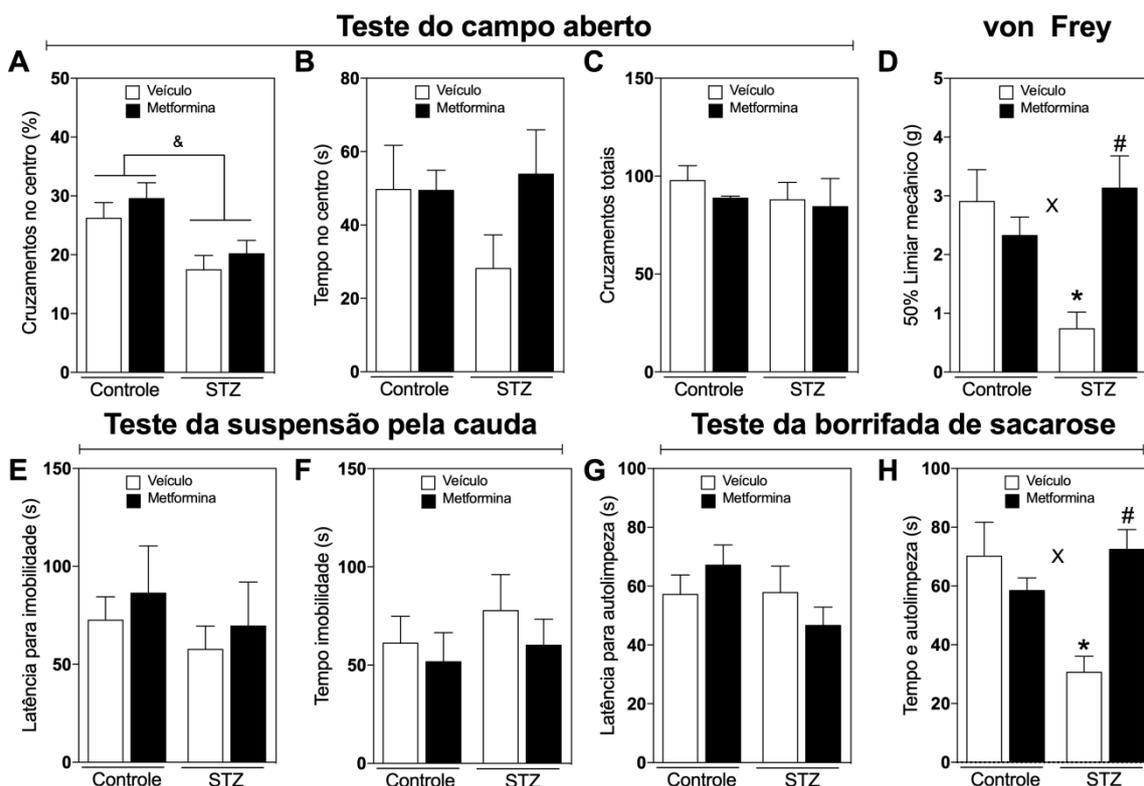


**Figura 3.** Efeitos do tratamento com metformina nas alterações metabólicas induzidas por STZ em camundongos Swiss machos. (A) Variação da massa corporal (g), (B) Níveis de colesterol plasmático total, (C) Níveis basais de glicose em jejum e (D) Níveis de insulina no plasma em jejum. Os dados são expressos como média + EPM (n = 6-7 animais por grupo). & denota o efeito principal de STZ por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ).

Em relação aos resultados comportamentais, a ANOVA de duas vias indicou que camundongos tratados com STZ apresentaram uma diminuição na porcentagem de cruzamentos centrais no Teste do Campo Aberto [efeito significativo para o tratamento com STZ,  $F(1,21) = 13,86$ ,  $p \leq 0,005$ ; Fig. 4A], embora a ANOVA não tenha indicado efeitos significativos no tempo no centro (Fig. 4B) e nos cruzamentos totais (Fig. 4C). Além disso, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos na latência para imobilidade (Fig. 4E) e no tempo de imobilidade total no Teste de Suspensão pela Cauda (Fig. 4F). Finalmente, a ANOVA de duas vias indicou um efeito principal para a interação entre STZ e metformina [ $F(1,21) = 11,20$ ,  $p \leq 0,005$ ] na alodinia mecânica, caracterizado pela redução do limiar de retirada da pata. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram aumento da alodinia mecânica de camundongos tratados com

STZ em comparação com o grupo controle tratado com veículo ( $p \leq 0,05$ ), sendo que o tratamento com metformina reverteu esse fenômeno ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 4D).

Em uma coorte experimental separada, o Teste da Borrifagem de Sacarose foi usado para avaliar o comportamento de autocuidado em camundongos. A ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos na latência para o comportamento de autolimpeza (Fig. 4G). Por outro lado, a ANOVA de duas vias indicou um efeito principal para a interação entre o tratamento com STZ o tratamento com metformina [ $F(1,20) = 13,26, p \leq 0,005$ ] no tempo de autolimpeza. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram menor tempo de autolimpeza, indicativo de comportamento do tipo depressivo, em camundongos veículo tratados com STZ quando comparados com seu grupo controle ( $p \leq 0,05$ ) e em comparação com camundongos tratados com STZ e tratados com metformina ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 4H), indicando que o tratamento com metformina reverteu o fenótipo do tipo depressivo induzido pelo tratamento com STZ.



**Figura 4.** Efeitos do tratamento com metformina nas alterações neurocomportamentais induzidas por STZ. Teste do Campo Aberto (A-C), no Teste de Von Frey (D), no Teste de Suspensão pela Cauda (E-F) e no Teste da Borrifada de Sacarose (G-H) em camundongos *Swiss* machos. (A) Cruzamentos do centro (%), (B) Tempo do centro (%), (C) Cruzamentos totais, (D) Limiar mecânico de 50% (g), (E) Latência para imobilidade (s), (F) Tempo de imobilidade (s), (G) Latência para autolimpeza (s) e (H) Tempo de autolimpeza (s). Os dados são expressos como média + EPM ( $n = 6-7$  animais por grupo). & denota o efeito principal de STZ por ANOVA de duas vias

( $p \leq 0,05$ ), X indica interação STZ-metformina significativa por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); “\*”  $P \leq 0,05$  vs. grupo veículo controle, “#”  $p \leq 0,05$  vs. grupo STZ veículo (Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

*Modelo de obesidade induzida por dieta rica em gorduras saturadas e rica em frutose (HFFD)*

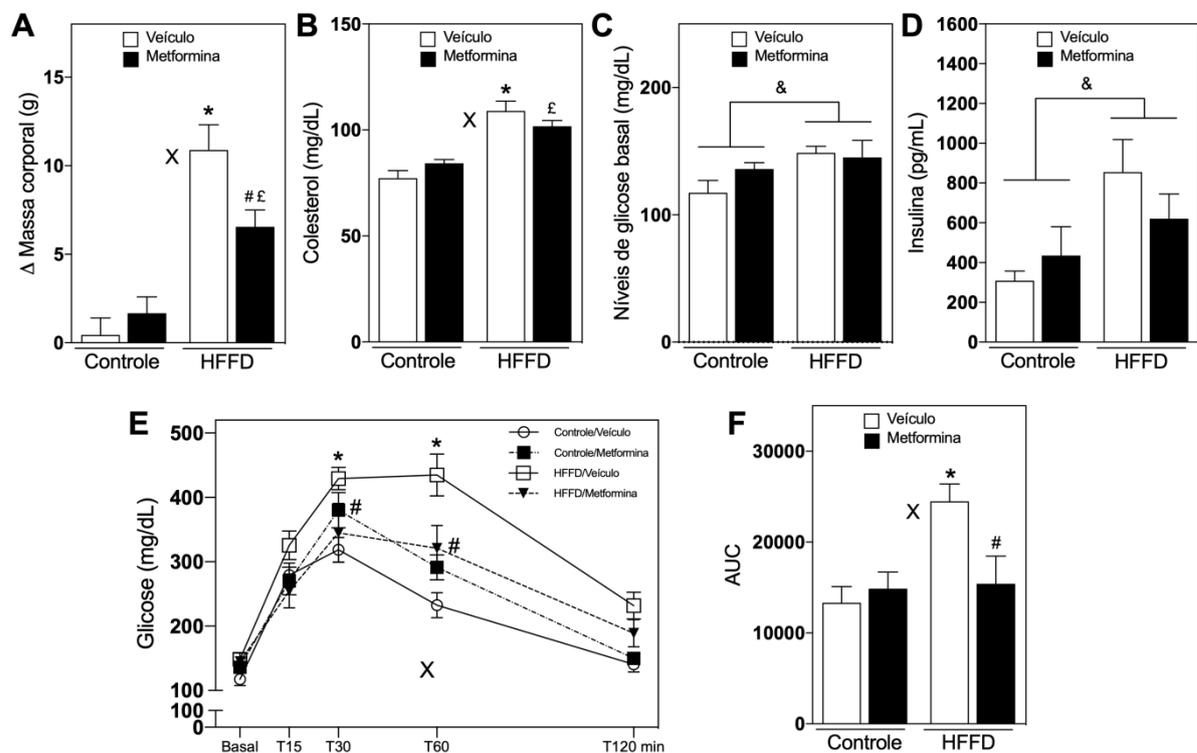
Em um novo conjunto de experimentos, disfunções metabólicas foram induzidas pela alimentação com dieta rica em gorduras saturadas e em frutose (HFFD) por quinze dias. Em seguida, procuramos determinar os efeitos da administração crônica de metformina em desfechos metabólicos, comportamentais e neuroquímicos em camundongos alimentados em suas respectivas dietas por mais 21 dias. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para a interação entre dieta e metformina [ $F(1,32) = 6,55, p \leq 0,05$ ] no ganho de peso corporal. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram maior ganho de peso corporal de camundongos alimentados com HFFD quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão. Além disso, houve maior ganho de peso corporal em camundongos alimentados com HFFD e tratados com veículo em comparação com camundongos alimentados com HFFD e tratados com metformina ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 5A). Camundongos alimentados com HFFD e tratados com metformina apresentaram maior ganho de peso corporal quando comparados aos animais tratados com metformina e alimentados com dieta padrão ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 5A).

A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para a interação entre dieta e metformina [ $F(1,32) = 4,49, p \leq 0,05$ ] nos níveis de colesterol plasmático. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram níveis mais elevados de colesterol no plasma de camundongos alimentados com HFFD tratados com veículo comparado aos animais tratados com veículo e alimentados com dieta padrão ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 5B). Camundongos alimentados com HFFD tratados com metformina também apresentaram níveis mais elevados de colesterol no plasma quando comparado aos animais tratados com metformina e alimentados com dieta padrão ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 5B).

A alimentação com HFFD resultou em níveis mais elevados de glicose no sangue [efeito principal significativo da dieta,  $F(1,32) = 4,98, p \leq 0,05$ ; Fig. 5C] e níveis mais elevados de insulina no plasma [efeito principal significativo da dieta,  $F(1,32) = 8,14, p \leq 0,01$ ; Fig. 5D] em camundongos. No Teste de Tolerância à Glicose, por outro lado, a ANOVA de duas vias indicou um efeito principal para dieta [ $F(1,32) = 9,42, p \leq 0,005$ ], para a interação entre dieta e metformina [ $F(1,32) = 7,56, p \leq 0,01$ ], para repetição [ $F(4,128) = 133,33, p \leq 0,00005$ ], bem como para interação de tratamento e dieta [ $F(4,128) = 6,04, p \leq 0,0005$ ], e para interação entre

repetição, dieta e tratamento [ $F(4,128) = 3,69, p \leq 0,01$ ]. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram níveis mais elevados de glicose no sangue nos camundongos alimentados com HFFD e tratados com veículo quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão e tratados com veículo ( $p \leq 0,05$ ).

Ainda, aqueles animais alimentados com HFFD e tratados com veículo apresentaram níveis mais elevados de glicose no sangue quando comparados aos animais alimentados com HFFD, mas tratados com metformina, nos tempos 30 e 60 minutos após a administração de glicose ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 5E). A ANOVA de duas vias também indicou um efeito principal para a interação entre dieta e metformina [ $F(1,32) = 5,80, p \leq 0,05$ ] nos valores de AUC dos níveis de glicose no sangue em camundongos. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram valores de AUC mais elevados em camundongos alimentados com HFFD e tratados com veículo quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão e tratados com veículo ( $p \leq 0,05$ ). Os animais alimentados com HFFD e tratados com metformina apresentaram diminuição da AUC quando comparados aos animais HFFD tratados com veículo ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 5F).



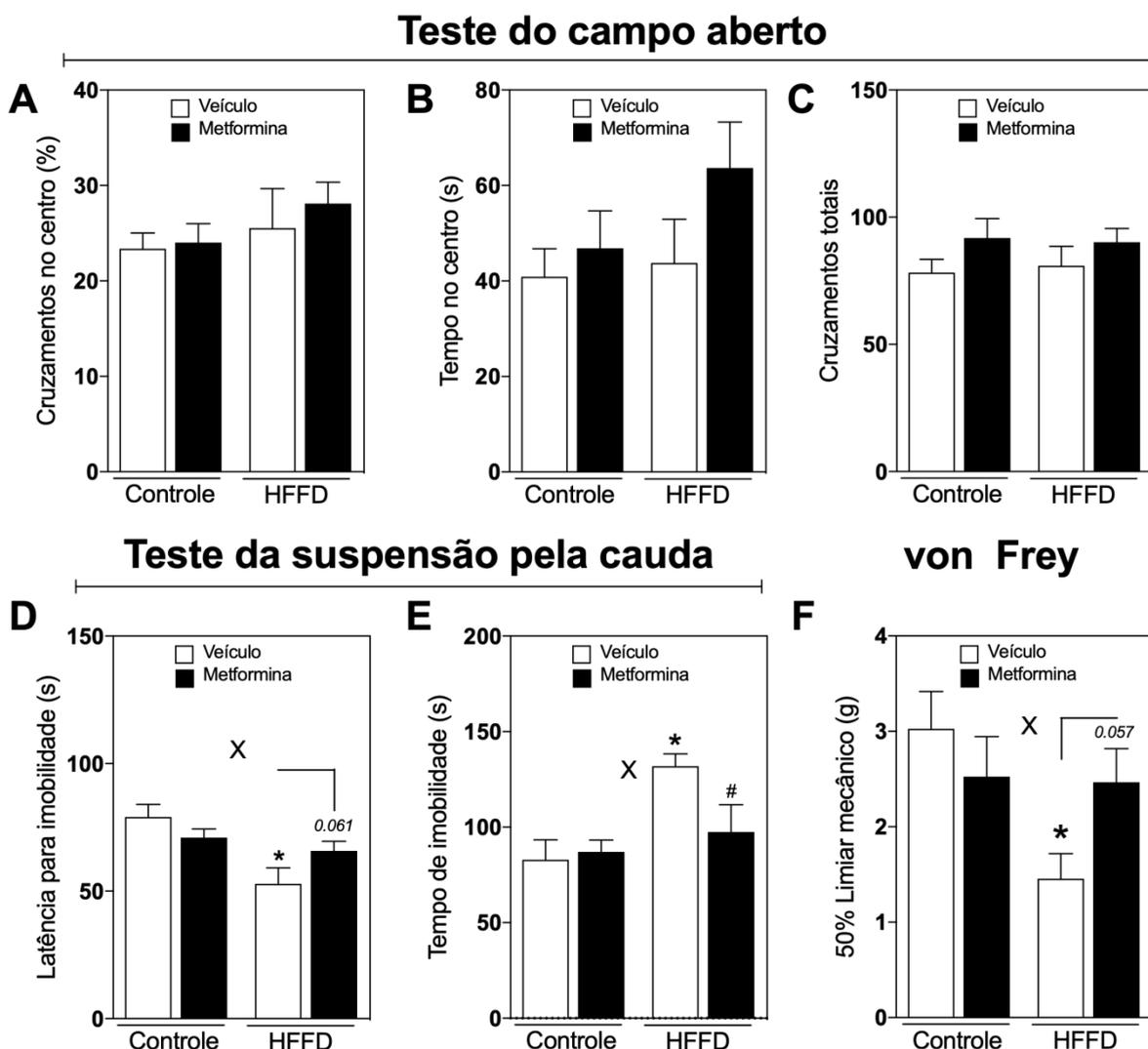
**Figura 5.** Efeitos do tratamento com metformina nas alterações metabólicas induzidas por HFFD em camundongos *Swiss* machos. Efeitos do tratamento com metformina nas alterações metabólicas induzidas por HFFD em camundongos *Swiss* machos. (A) Variação da massa corporal (g), (B) Níveis de colesterol no plasma, (C) Níveis basais de glicose em jejum, (D) Níveis de insulina no plasma em jejum, (E) Teste de Tolerância à Glicose e (F) Área sob a curva de glicose no teste de tolerância. Os dados são expressos como média + EPM ( $n =$

9 animais por grupo). & denota o efeito principal de HFFD por ANOVA de dois fatores ( $p \leq 0,05$ ), X indica interação significativa de HFFD e metformina por ANOVA de duas vias (ou repetição significativa por HFFD por interação da metformina) ( $p \leq 0,05$ ); “\*”  $P \leq 0,05$  vs. veículo grupo controle, “#”  $p \leq 0,05$  vs. HFFD veículo, “£”  $p \leq 0,05$  vs. metformina grupo controle (Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Além disso, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos na porcentagem de cruzamentos de centro (Fig. 6A), no tempo no centro (Fig. 6B) e nos cruzamentos totais (Fig. 6C) no Teste do Campo Aberto. Por outro lado, a ANOVA de duas vias indicou um efeito principal para a interação entre dieta e tratamento [ $F(1,32) = 4,98, p \leq 0,05$ ] na latência para imobilidade no Teste de Suspensão pela Cauda. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram menor latência para imobilidade de camundongos alimentados com HFFD tratados com veículo quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão e tratados com veículo ( $p \leq 0,05$ ).

Além disso, a ANOVA de duas vias também indicou um efeito principal para a interação entre dieta e metformina [ $F(1,32) = 3,81, p \leq 0,05$ ] no tempo total de imobilidade. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram maior tempo de imobilidade, indicativo de comportamento passivo de enfrentamento ao estresse, em camundongos alimentados com HFFD tratados com veículo em comparação com os animais tratados com dieta padrão e tratados com veículo ( $p \leq 0,05$ ). Além disso, as análises mostraram que os animais alimentados com HFFD, mas tratados com metformina, apresentaram reversão no tempo de imobilidade quando comparados aos animais alimentados com HFFD e tratados com veículo ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 6E).

Finalmente, a ANOVA de duas vias também indicou um efeito principal para a interação entre dieta e tratamento [ $F(1,32) = 4,37, p \leq 0,005$ ] na alodinia mecânica. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram alodinia mecânica aumentada de camundongos alimentados com HFFD e tratados com veículo em comparação aos animais alimentados com dieta padrão e tratados com veículo ( $p \leq 0,05$ ). Além disso, os animais tratados com metformina e alimentados com HFFD apresentaram uma tendência na reversão do aumento da alodinia mecânica quando comparado aos animais alimentados com HFFD e tratados com veículo ( $p = 0,057$ ; Fig. 6F).

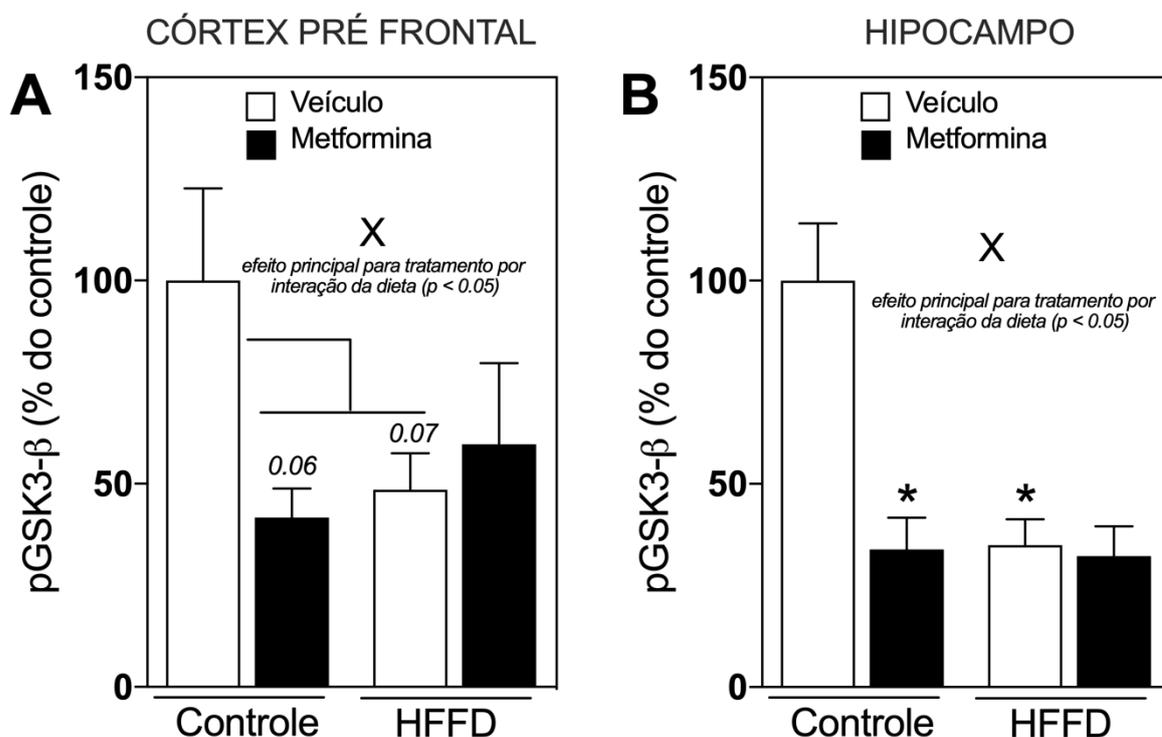


**Figura 6.** Efeitos do tratamento com metformina nas alterações neurocomportamentais induzidas por HFFD. Teste do Campo Aberto (A-C), no Teste de Suspensão pela Cauda (D-E) e no Teste de Von Frey (F). (A) Cruzamentos do centro (%), (B) Tempo do centro (s), (C) Cruzamentos totais, (D) Latência para imobilidade (s), (E) Tempo de imobilidade (s) e (F) 50% Limiar mecânico (g). Os dados são expressos como média + EPM (n = 9 animais por grupo). X indica interação HFFD-por-metformina significativa na ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); “\*”  $p \leq 0,05$  vs. grupo controle tratado com veículo, “#”  $p \leq 0,05$  vs. grupo HFFD tratado com veículo (Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Em seguida, determinamos se os efeitos comportamentais resultantes da alimentação com HFFD foram acompanhados por modificações no status de fosforilação do GSK-3 $\beta$  no córtex pré-frontal e no hipocampo. A ANOVA de duas vias indicou um efeito principal para a interação entre dieta e metformina [ $F(1,32) = 4,66, p \leq 0,005$ ] nos níveis de pGSK-3 $\beta$  no córtex pré-frontal. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram uma tendência de níveis mais baixos de pGSK-3 $\beta$  em camundongos alimentados com HFFD tratados com veículo quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão e tratados com veículo ( $p = 0,07$ ). Além

disso, revelou uma tendência de níveis mais baixos de pGSK-3 $\beta$  em camundongos do grupo alimentado com dieta padrão e tratado com metformina em comparação ao grupo alimentado com dieta padrão e tratado com veículo ( $p = 0,06$ ; Fig. 7A).

A ANOVA de duas vias também indicou um efeito principal para a interação da dieta com a metformina [ $F(1,32) = 11,36, p \leq 0,005$ ] nos níveis de pGSK-3 $\beta$  no hipocampo. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram níveis mais baixos de pGSK-3 $\beta$  em camundongos alimentados com HFFD tratados com veículo comparados aos animais alimentados com dieta padrão e tratados com metformina ( $p \leq 0,0005$ ). Além disso, revelou níveis mais baixos de pGSK-3 $\beta$  em camundongos do grupo controle tratado com metformina quando comparado ao grupo controle tratado com veículo ( $p \leq 0,0005$ ; Fig. 7B).



**Figura 7.** Efeitos do tratamento com metformina nas alterações dos níveis de pGSK-3 $\beta$  no cérebro induzidas por HFFD em camundongos *Swiss* machos. (A) Níveis de pGSK-3 $\beta$  (% do controle) no córtex pré-frontal e (B) Níveis de pGSK-3 $\beta$  (% do controle) no hipocampo. Os dados são expressos como média + EPM ( $n = 9$  animais por grupo). X indica interação significativa de HFFD e metformina na ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ); “\*”  $p \leq 0,05$  vs. grupo controle tratado com veículo (Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

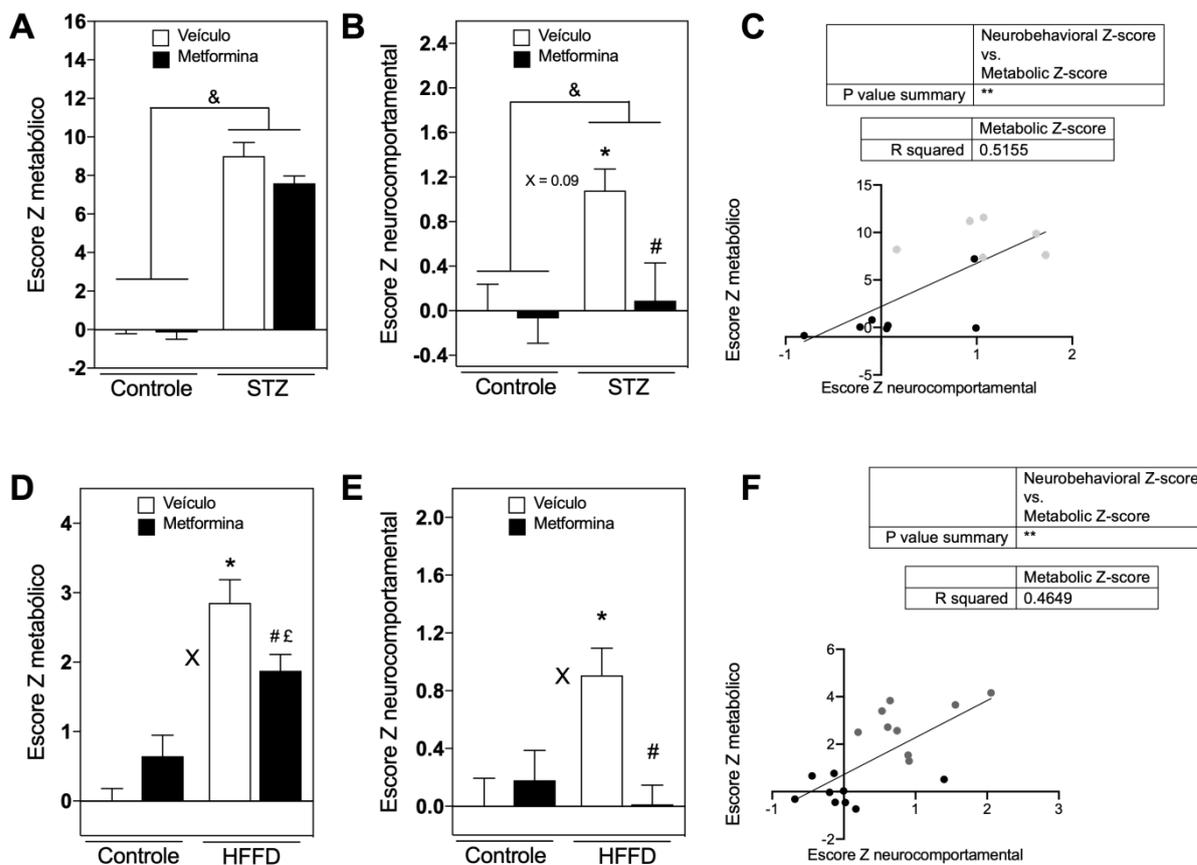
#### *Escores Z metabólicos e neurocomportamentais*

Os escores Z metabólicos e neurocomportamentais que normalizam cada dado bruto para a média do grupo controle e integram todos os parâmetros em um único valor também

foram estabelecidos para ambos os protocolos experimentais. A ANOVA de duas vias indicou que o tratamento com STZ resultou em um aumento geral no escore Z metabólico [efeito principal significativo de STZ,  $F(1,21) = 294,06$ ,  $p \leq 0,00001$ ; Fig. 8A]. Além disso, a ANOVA de duas vias indicou que o tratamento com STZ também resultou em um aumento geral no escore Z neurocomportamental [efeito principal significativo de STZ,  $F(1,21) = 5,40$ ,  $p \leq 0,05$ ; Fig. 8B]. A interação entre o tratamento com STZ e metformina não foi significativa [ $F(1,21) = 2,98$ ,  $p = 0,09$ ]. As comparações *post-hoc* subsequentes foram realizadas e revelaram um escore Z neurocomportamental mais alto de camundongos tratados com STZ e com veículo em comparação com animais tratados com salina e veículo ( $p \leq 0,05$ ) e com camundongos tratados com STZ e metformina ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 8B).

Além disso, a ANOVA de duas vias indicou um efeito para a interação entre dieta e tratamento com metformina [ $F(1,32) = 9,06$ ,  $p \leq 0,01$ ] no escore Z metabólico. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram uma pontuação Z metabólica mais alta de camundongos alimentados com HFFD e tratados com veículo em comparação com os animais alimentados com dieta padrão e tratados com veículo ( $p \leq 0,05$ ), e com camundongos alimentados com HFFD e tratados com metformina ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 8C). Camundongos alimentados com HFFD e tratados com metformina apresentaram um escore Z metabólico mais alto do que seu respectivo grupo controle ( $p \leq 0,05$ ; Fig. 8C).

A ANOVA de duas vias também indicou um efeito principal para a interação entre dieta e metformina [ $F(1,32) = 8,58$ ,  $p \leq 0,01$ ] no escore Z neurocomportamental. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram um escore Z neurocomportamental mais alto de camundongos alimentados com HFFD e tratados com veículo em comparação com os animais alimentados com dieta padrão e tratados com veículo ( $p \leq 0,01$ ), e com camundongos alimentados com HFFD e tratados com metformina ( $p \leq 0,005$ ; Fig. 8D). Além disso, uma correlação positiva significativa entre os escores Z metabólicos e neurocomportamentais foi revelada após o modelo DM1 induzido por STZ (Pearson  $r = 0,5155$ ,  $p \leq 0,01$ ; Fig. 8C) e o modelo de obesidade induzida por HFFD (Pearson  $r = 0,4649$ ,  $p \leq 0,005$ ; Fig. 8F).



**Figura 8.** Escores z metabólicos e neurocomportamentais de camundongos injetados com STZ e camundongos alimentados com HFFD. Correlação entre escores z metabólicos e emocionais em camundongos injetados com STZ (C) e camundongos alimentados com HFFD (F). Os dados são expressos como média + EPM (n = 6-9 animais por grupo). & denota o efeito principal de HFFD por ANOVA de dois fatores ( $p \leq 0,05$ ). & denota o efeito principal de STZ por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ), X indica interação significativa de HFFD por metformina por ANOVA de duas vias (ou repetição significativa por HFFD por interação de metformina) ( $p \leq 0,05$ ); “\*”  $p \leq 0,05$  vs. grupo controle relacionado ao veículo, “#”  $p \leq 0,05$  vs. grupo HFFD relacionado ao veículo, “£”  $p \leq 0,05$  vs. grupo controle relacionado à metformina (Teste *post-hoc* de Newman-Keuls). (C, F) Os pontos pretos correspondem aos camundongos veículo/controle e os pontos cinzas, aos camundongos STZ/controle ou HFFD/controle.

## 2.8 DISCUSSÃO

A presente seção teve como objetivo determinar os efeitos da metformina em desfechos metabólicos e neurocomportamentais em modelo experimental de DM1, induzida por STZ, e em modelo experimental de disfunções metabólicas induzidas por dieta hipercalórica, ambos em camundongos *Swiss* machos. Os dados mostram que o tratamento com STZ induziu hipoinsulinemia e hiperglicemia em jejum, perda de massa corporal, alodinia mecânica, comportamento do tipo ansioso e diminuição do comportamento de autocuidado. Nos animais alimentados com HFFD, observou-se aumento da massa corporal, hipercolesterolemia, hiperinsulinemia e hiperglicemia em jejum, intolerância à glicose, alodinia

mecânica e comportamento passivo de enfrentamento ao estresse (tipo-depressivo). No modelo STZ, a metformina reverteu os déficits neurocomportamentais sem efeitos benéficos nos parâmetros metabólicos. Por outro lado, atenuou o ganho de massa corporal, a hipercolesterolemia, a intolerância à glicose e os déficits comportamentais nos animais alimentados com HFFD.

Evidências clínicas indicam que pacientes com DM1 e DM2 apresentam comorbidades psiquiátricas, como transtornos de humor (Anderson *et al.*, 2001; Khaledi *et al.*, 2019). Um estudo de meta-análise conduzido por Lustman *et al.* (2000) mostrou que a depressão está associada à hiperglicemia em pacientes com DM1 ou DM2. Além disso, Phillips e Perry (2015) mostraram que indivíduos com obesidade e distúrbios metabólicos apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de ansiedade e sintomas depressivos quando comparados aos indivíduos obesos sem disfunções metabólicas. Na mesma linha dos estudos clínicos, a DM1 induzida por STZ e disfunções metabólicas induzidas por HFFD são capazes de induzir alterações comportamentais em modelos animais, como comportamento do tipo ansioso e depressivo (Huang *et al.*, 2016; Vagena *et al.*, 2019). No entanto, no presente estudo, a metformina reverteu o comportamento passivo de enfrentamento ao estresse, mesmo que não tenha modificado a hiperinsulinemia e hiperglicemia em jejum induzida por HFFD. Além disso, o tratamento com metformina reverteu o comportamento do tipo anedônico induzido por STZ, sem alterar os parâmetros metabólicos nos animais modelos de DM1.

Considerando que a inflamação sistêmica é uma característica-chave na fisiopatologia da depressão, Mudgal *et al.* (2019) mostraram que a metformina reduziu a neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo administrado intraperitonealmente em camundongos. Nesse sentido, poderia se especular que a HFFD induziu um quadro de neuroinflamação nesses animais (Cavaliere *et al.*, 2019). Na mesma linha, Zemdegs *et al.* (2016) mostraram que camundongos machos C57Bl/6 alimentados com dieta hipercalórica (45% de gordura) por 16 semanas apresentaram uma redução significativa no tempo de autolimpeza no Teste da Borrifagem de Sacarose e que esse fenótipo foi revertido pela metformina.

Embora a propriedade anti-inflamatória da metformina também possa explicar esses efeitos benéficos, hipóteses alternativas têm sido propostas. Nesse estudo em particular, foi demonstrado que camundongos alimentados com dieta rica em gordura exibiram resistência à insulina e elevados níveis circulantes de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs). Como os BCAAs regulam o influxo de triptofano no encéfalo, o trabalho mostrou que camundongos

alimentados com a dieta rica em gordura exibiram prejuízo na atividade elétrica dos neurônios serotoninérgicos da rafe dorsal, bem como diminuição nas concentrações de serotonina extracelular do hipocampo. Notavelmente, o tratamento crônico com metformina reduziu os níveis circulantes de BCAAs e estimulou a liberação de serotonina no hipocampo ventral, promovendo, assim, efeitos do tipo antidepressivo em camundongos alimentados com a dieta rica em gordura (Zemdegs *et al.*, 2016). Esses efeitos benéficos ecoam descobertas recentes que mostram que a administração aguda de metformina (50, 100 e 200 mg/kg; i.p.) induziu efeitos do tipo antidepressivo em camundongos (Ai *et al.*, 2020). Os autores relataram que os efeitos da metformina foram de ação rápida e duraram pelo menos cinco dias após uma única injeção. Mecanicamente, eles relataram que o efeito do tipo antidepressivo foi dependente da atividade da AMPK (Ai *et al.*, 2020).

Em relação ao modelo DM1, nossos resultados indicaram que o tratamento com STZ não influenciou o tempo de imobilidade total no Teste de Suspensão pela Cauda. Vale ressaltar que estudos anteriores mostraram que camundongos tratados com STZ apresentaram um fenótipo semelhante à depressão no referido teste (Ho *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016). Assim, considerando que nosso resultado não deve descartar a possibilidade de que o tratamento com STZ possa resultar em sintomas depressivos em camundongos, reforçamos nossa abordagem avaliando, em uma coorte separada, um comportamento distinto, mas complementar, ou seja, o comportamento de autocuidado no Teste da Borrifagem de Sacarose.

Nossos resultados indicaram que os animais tratados com STZ apresentaram redução no comportamento de autolimpeza e que o tratamento com metformina reverteu esse fenótipo. Em semelhante direção, Ho *et al.* (2012) mostraram que o fenótipo do tipo depressivo induzido por STZ foi normalizado pela administração subcutânea de insulina crônica, que também reverteu a hiperglicemia induzida por STZ e perda de peso corporal. Por outro lado, Huang *et al.* (2016) mostraram que a rosiglitazona, uma droga anti-hiperglicêmica e sensibilizadora à insulina, falhou em reverter a hiperglicemia induzida por STZ e o fenótipo do tipo depressivo.

Considerando que aqui a metformina também falhou em reverter a hiperglicemia induzida por STZ, pode-se supor que seus efeitos semelhantes aos antidepressivos fossem independentes da ação sobre a glicose periférica. No entanto, embora nossos achados reforcem o potencial terapêutico da metformina para depressão associada ao DM1 e DM2, mais estudos são necessários para caracterizar os mecanismos subjacentes. Notavelmente, também há evidências clínicas que apoiam um papel adjuvante da metformina no tratamento do transtorno

depressivo maior em pacientes adultos sem outras comorbidades, como diabetes (Abdallah *et al.*, 2020).

Em relação à ansiedade, analisada no Teste do Campo Aberto, que usa a aversão natural dos animais por espaços abertos desconhecidos, não observamos nenhuma diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados em camundongos alimentados com HFFD. Por outro lado, observamos que o tratamento com STZ induziu uma diminuição na porcentagem de cruzamentos centrais, indicativo de comportamento do tipo ansiogênico, embora a metformina não tenha revertido tal comprometimento. Estudos publicados em ambos os modelos apresentam resultados mistos.

Gupta *et al.* (2014) mostraram que camundongos com DM1 induzida por STZ apresentaram fenótipos semelhantes à ansiedade no Teste de Labirinto em Cruz Elevado. Zemdegs *et al.* (2016) mostraram que camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta rica em gordura apresentaram um comportamento semelhante à ansiedade no Teste do Campo Aberto. Por outro lado, Ho *et al.* (2012) mostraram que camundongos com DM1 induzida por STZ não apresentaram fenótipos semelhantes à ansiedade no Teste do Labirinto em Cruz Elevado. No Teste do Campo Aberto, O'Flaherty *et al.* (2019) também mostraram que ratos alimentados com alto teor de frutose não tiveram aumento de comportamento semelhante ao de ansiedade.

Embora essas diferenças sejam difíceis de conciliar com nossas descobertas e com elas mesmas, elas podem estar ligadas a diferenças nas espécies e linhagens animais ou a procedimentos experimentais diferentes (por exemplo, duração da exposição à dieta). No entanto, vale ressaltar que Zemdegs *et al.* (2016) mostraram que as respostas do tipo ansiogênico induzidas pela dieta rica em gordura em camundongos foram parcialmente revertidas pela metformina.

Também observamos que tanto o modelo animal de DM1 quanto o de DM2 exibiram alodinia mecânica, enquanto a administração de metformina produziu efeitos analgésicos em ambas as condições. É importante ressaltar que uma proporção considerável de pacientes diabéticos sofre de alodinia e hiperalgesia graves (Didangelos *et al.*, 2014). Em concordância com nossas observações, Dias *et al.* (2019) mostraram que camundongos tratados com STZ apresentavam alodinia mecânica e à temperatura em 6 semanas após a indução do diabetes. Da mesma forma, Cooper *et al.* (2017) demonstraram que camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta rica em gordura também desenvolveram alodinia mecânica, e os autores associaram essa

hipersensibilidade à expressão elevada de RNAm do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) no gânglio da raiz dorsal.

Vale ressaltar que Wang *et al.* (2018) lançaram luz sobre uma ligação funcional entre AMPK e TRPA1 nos neurônios ganglionares da raiz dorsal, em que a ativação da AMPK resulta na regulação negativa do TRPA1 associado à membrana e sua atividade de canal. Além disso, Chowdhury *et al.* (2013) mostraram que a hiperglicemia altera o perfil energético dos neurônios ganglionares da raiz dorsal, levando à regulação negativa da expressão, fosforilação e atividade da AMPK. Notavelmente, o tratamento com metformina, um ativador de AMPK, inibiu a ativação de TRPA1 induzida por alta glicose em cultura de neurônios ganglionares da raiz dorsal (Wang *et al.*, 2018).

Com base em tais evidências, e considerando que a metformina falhou em reverter a hiperglicemia induzida pelo tratamento com STZ e HFFD, pode-se supor que a ativação de AMPK induzida por metformina apoiaria os efeitos analgésicos desta em ambos os modelos, conforme aqui observado. De acordo com esses resultados, estudos pré-clínicos demonstraram os efeitos antinociceptivos da metformina em roedores (Baeza-Flores *et al.*, 2020), que parece ser independente do controle glicêmico (Price *et al.*, 2016).

Os efeitos benéficos da metformina no metabolismo periférico foram atribuídos a vários processos periféricos, incluindo a ativação da via AMPK, redução na gliconeogênese hepática e estimulação da captação de glicose no músculo esquelético (Rena *et al.*, 2017). Além disso, Patané *et al.* (2000) apresentaram evidências de que a metformina também tem um efeito benéfico direto sobre o metabolismo e a função das células  $\beta$ -pancreáticas expostas a concentrações elevadas de lipídios ou glicose. No entanto, ao contrário de outros estudos (Zemdegs *et al.*, 2016), a metformina falhou em restaurar a hiperinsulinemia e a hiperglicemia em jejum em camundongos alimentados com HFFD, embora tenha melhorado a tolerância à glicose.

Com base nessa observação, pode-se supor que a metformina, um agente de sensibilização à insulina com ações atribuídas à ativação de sinalização da AMPK (Zhou *et al.*, 2001), provavelmente agiu aumentando a captação de glicose nos tecidos periféricos, de forma independente da insulina, em face a um desafio de glicose. No entanto, mais estudos são necessários para analisar os níveis de insulina no sangue durante o Teste de Tolerância à Glicose e realizar um teste de tolerância à insulina. Também mostramos que a metformina atenuou o ganho de peso corporal e a hipercolesterolemia induzida pelo HFFD. A esse respeito, Zang *et*

*al.* (2004) mostraram que a AMPK regula negativamente a atividade da acetil-CoA carboxilase e o conteúdo de lipídios hepáticos.

Com base no método do escore Z, normalizamos cada parâmetro a partir da média dos valores correspondentes observados no grupo controle (tratado com veículo ou alimentado com dieta padrão) e os integramos em um único escore. Portanto, obtivemos os escores Z metabólicos e neurocomportamentais, que foram significativamente aumentados em camundongos tratados com STZ e camundongos alimentados com HFFD, em comparação com seus respectivos grupos controles. Deve-se observar que não incluímos os dados do Teste da Borrifagem de Sacarose nesse escore, pois o experimento comportamental não foi realizado na mesma coorte de animais nem foi realizado em camundongos com obesidade induzida por HFFD.

De acordo com nossas observações, camundongos com DM1 induzida por STZ e camundongos com obesidade induzida por HFFD exibiram disfunções neurocomportamentais, enquanto o tratamento crônico com metformina reverteu esses déficits. Considerando os distúrbios metabólicos, a metformina foi capaz de reverter aqueles induzidos por HFFD, ao passo que não influenciou os distúrbios metabólicos induzidos por STZ. Com base nessa observação, os efeitos benéficos da metformina em déficits neurocomportamentais induzidos por STZ não foram mediados pela melhoria da sinalização periférica da insulina. Nesse sentido, o uso de metformina em DM1 é menos frequente e menos estudado, e há evidências limitadas de que a metformina pode diminuir a necessidade de uso de insulina (Livingstone *et al.*, 2017).

Para obter informações sobre os mecanismos subjacentes às disfunções neurocomportamentais induzidas por STZ e HFFD e os efeitos benéficos da metformina, focamos nossa atenção em GSK-3 $\beta$ , uma proteína quinase que está envolvida em distúrbios neuropsiquiátricos e tratamentos relacionados (Li; Jope, 2010). As primeiras evidências mostrando que essa enzima está envolvida em transtornos psiquiátricos veio das observações de que ela é diretamente modulada pelo lítio, principal estabilizador de humor (Klein; Melton, 1996). Na mesma linha de evidência, a GSK-3 $\beta$  é regulada por proteínas que parecem estar envolvidas em transtornos de humor, como o BDNF (Li; Jope, 2010).

No presente estudo, camundongos alimentados com HFFD apresentaram uma redução significativa nos níveis da GSK-3 $\beta$  fosforilada no hipocampo e no córtex pré-frontal. Na maioria dos tecidos, a GSK-3 $\beta$  é constitutivamente ativa e principalmente regulada por fosforilação inibitória em Ser<sup>9</sup> (ter Haar *et al.*, 2001). Llorens-Martin *et al.* (2014) argumentam

que um estado em que o GSK-3 $\beta$  permanece anormalmente ativo devido a uma falha em reprimir sua atividade de forma adequada contribui para várias patologias, incluindo diabetes e transtornos de humor. Além disso, Yoon *et al.* (2019) encontraram uma redução da forma fosforilada de GSK-3 $\beta$  no córtex cerebral de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta rica em gordura. Além disso, Leng *et al.* (2010) mostraram que a alta resistência à insulina induzida por glicose nas células está associada à ativação de GSK-3 $\beta$  e subsequente fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS1), desencadeando a ubiquitinação e degradação de IRS1.

O agente antidiabético metformina atua ativando a AMPK. Nesse sentido, Horike *et al.* (2008) apontou um papel crítico da fosforilação de GSK-3 $\beta$  na supressão induzida por AMPK da gliconeogênese hepática. Com base nessas observações, esperava-se que o tratamento com metformina aumentasse os níveis de pGSK-3 $\beta$  (como os antidepressivos), ao contrário do que observamos. Nessa linha de evidência, Farr *et al.* (2019) mostraram que camundongos SAMP8, um modelo de Doença de Alzheimer esporádico que recebeu 200 mg/kg de metformina diariamente por oito semanas, tinham níveis cerebrais significativamente mais elevados de pGSK-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup>/total do que camundongos controles. Em seu estudo, a metformina melhorou o desempenho da memória dos animais em vários testes comportamentais. Por outro lado, Ramamurthy *et al.* (2014) apresentaram dados que sugerem que AMPK suprime a via Akt-GSK-3 $\beta$  durante o crescimento dendrítico. Esses dados indicam que a sinalização AMPK regula a estrutura neuronal, inibindo vários mediadores positivos de crescimento dendrítico (Ramamurthy *et al.*, 2014).

Aqui, mostramos que i) o tratamento com metformina foi capaz de reverter o aumento de alodinia mecânica e a diminuição do comportamento de autocuidado nos animais tratados com STZ e ii) reverteu o aumento de peso, o aumento do colesterol, a intolerância à glicose e o comportamento do tipo depressivo em animais alimentados com HFFD. Para futuros trabalhos, será necessário entender mais detalhadamente as funções da GSK-3 $\beta$  nesse contexto, bem como estabelecer um modelo de DM2 mais fidedigno com a patologia em humanos, duas limitações importantes no presente trabalho.

No geral, nossos resultados reforçam a observação de que a metformina, um tratamento convencional para diabetes, poderia ser reaproveitada para melhorar os sintomas neurocomportamentais em DM1 e DM2.

### 3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROTETORES DO EXTRATO AQUOSO DA PLANTA *Cissus verticillata* EM ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR UMA DIETA RICA EM GORDURA E FRUTOSE EM CAMUNDONGOS

O próximo passo da presente tese teve como objetivo analisar os efeitos da *Cissus verticillata*, uma planta popularmente conhecida como insulina-vegetal, em parâmetros metabólicos e comportamentais em ambos os modelos animais (STZ e HFFD), visando determinar seu potencial efeito terapêutico.

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O principal manejo farmacológico do DM1 envolve o uso da insulina (Otto-Buczowska; Jainta, 2017), embora outras estratégias tenham sido adotadas, como manejo no estilo de vida, em especial o controle do estresse, o aumento nos níveis de atividade física e a manutenção de uma dieta equilibrada (American Diabetes Association, 2020). No DM2, o fármaco metformina, associado à mudança no estilo de vida, é o tratamento clássico de entrada (Knowler *et al.*, 2016). Contudo, outras opções medicamentosas também são adotadas na clínica e têm se mostrado efetivas, como as sulfonilureias, inibidores de  $\alpha$ -glicosidase e glinidas (Marín-Peñalver *et al.*, 2016).

No entanto, muitos desses tratamentos, por serem de uso crônico, acarretam custos financeiros e temporais substanciais, além de potenciais efeitos adversos. Nesse sentido, muitas pessoas recorrem à medicina popular em busca de tratamentos alternativos mais eficientes. Por exemplo, estima-se que 80% da população dos países em desenvolvimento use rotineiramente fitoterápicos tradicionais, muitas vezes concomitantemente com os medicamentos alopáticos (Benzie; Wachtel-Galor, 2011), o que torna necessário avaliar a eficácia e segurança dessas substâncias não só para validar o uso popular, mas também para investigar possíveis compostos hipoglicemiantes mais eficazes e com menos efeitos colaterais que os atuais.

Nesse cenário, a *Cissus verticillata* (L.) Nicolson, sinônimo de *Cissus sicyoides*, é um exemplo de aplicação das plantas na medicina popular para manejo de diabetes (Drobnik e de Oliveira, 2015). Chamada de “insulina vegetal”, essa planta pertence à família Vitacea e é amplamente encontrada no México, Caribe e América do Sul. As partes aéreas são utilizadas

na medicina popular para o tratamento de Diabetes mellitus (ação hipoglicêmica), reumatismo, epilepsia, acidente vascular cerebral e inflamação (Viana *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2012).

Até a redação desta tese, apenas dois estudos verificaram os efeitos da *Cissus verticillata* (Barbosa *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2021) e outros dois estudos verificaram os efeitos de *Cissus sicyoides* (Pepato *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2004) sobre modelos de deficiências que envolvem perturbação no metabolismo glicolítico. Especificamente, o estudo de Kim *et al.* (2021) objetivou avaliar os efeitos da *Cissus verticillata* em camundongos C57Bl/6 com três doses (30, 100 e 300 mg/kg) por oito semanas. Os animais foram expostos a uma dieta 60% rica em gordura e concomitantemente tratados com as respectivas doses.

No aspecto metabólico, o tratamento com *Cissus verticillata* na dose de 300 mg/kg resultou na prevenção do aumento da glicose sanguínea nos animais alimentados com a dieta rica em gordura após 4 semanas de tratamento. Do ponto de vista comportamental, o tratamento com 300 mg/kg foi capaz de prevenir o declínio na memória no Teste do Reconhecimento de Objeto nos animais alimentados com a dieta rica em gordura. Nesse sentido, Kim *et al.* (2021) mostraram que a planta *Cissus verticillata* parece ter potenciais efeitos preventivos em um tratamento de longa duração (8 semanas).

No entanto, o uso de plantas na medicina popular normalmente está associado à insatisfação com o tratamento convencional, indicando que quem recorre a essa estratégia já está com a patologia instaurada, fazendo-se necessária, portanto, a investigação sobre o potencial efeito terapêutico e não só preventivo, como mostrado no estudo de Kim *et al.* (2021). Além disso, os autores não investigaram os efeitos da *Cissus verticillata* em parâmetros que envolvem a neuropatia diabética, condição comum nos pacientes, bem como não avaliaram os efeitos da *Cissus verticillata* em modelos animais de diabetes do tipo 1.

## 3.2 OBJETIVOS

### 3.2.1 Objetivo geral

Avaliar os potenciais efeitos terapêuticos do extrato aquoso obtido da parte aérea da planta *Cissus verticillata* em parâmetros metabólicos e comportamentais em camundongos modelos de diabetes do tipo 1 induzida por STZ e modelo de disfunções metabólicas induzida por uma dieta rica em gordura saturada e frutose.

### 3.2.2 Objetivos específicos

Avaliar os parâmetros:

a) Metabólicos:

- Acompanhamento da massa corporal dos animais.
- Medidas da concentração plasmática de glicose.
- Mensuração indireta da secreção da insulina por meio do Teste de Tolerância à Glicose.

b) Comportamentais:

- Locomoção espontânea e comportamento do tipo ansioso no Teste do Campo Aberto.
- Avaliação do comportamento do tipo depressivo no Teste do Nado Forçado.
- Avaliação do comportamento do tipo anedônico por meio do Teste de Borrifagem de Sacarose.
- Mensuração do limiar de alodinia mecânica por meio do Teste de Von Frey.

### 3.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com três meses de idade ao início dos protocolos, provenientes do biotério central da universidade. Inicialmente os animais foram alojados em gaiolas coletivas, mantidos em um ambiente de temperatura controlada entre 22 e 24 graus, de acordo com as recomendações do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica do CONCEA (Resolução Normativa 13, 2013). Todos os animais tiveram livre acesso a água e comida. O ciclo de luminosidade claro/escuro foi de 12h, iniciando o ciclo claro às 6h da manhã. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA/UFSC), de acordo com a Lei Federal 11.794, de 2008, sob o número 3143051019.

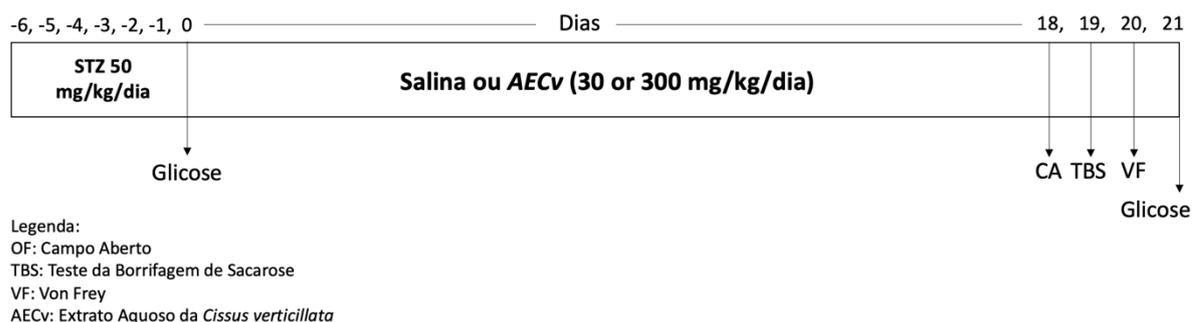
Em todos os delineamentos experimentais, de todas as seções da presente tese, onde constar a administração de fármacos e/ou drogas por meio da via intraperitoneal (i.p.), um volume de administração de 0,1 mL por 10 gramas de peso corporal dos animais foi respeitado. Os animais foram monitorados em suas gaiolas-moradias diariamente e, na presença de sinais

clínicos indicativos de dor ou estresse (e.g., ambulação prejudicada não permitindo aos animais acesso a comida e água; excessiva perda de peso; prolongada dificuldade de se manter na posição vertical, dentre outros sinais indicativos de um estado moribundo), os animais foram imediatamente excluídos do estudo, sendo realizada a eutanásia destes (*humane endpoint*), de acordo com Stokes (2002). Nestes casos, os animais foram eutanasiados por meio de administração de dose excessiva de uma mistura dos anestésicos cetamina (150 mg/kg; i.p.) e xilazina (30 mg/kg; i.p.). A análise dos parâmetros de eutanásia humanitária teve como base o documento ENV/JM/MONO(2000) da OECD “*GUIDANCE DOCUMENT ON THE RECOGNITION, ASSESSMENT, AND USE OF CLINICAL SIGNS AS HUMANE ENDPOINTS FOR EXPERIMENTAL ANIMALS USED IN SAFETY EVALUATION*”.

#### 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a indução do modelo de diabetes tipo 1, camundongos *Swiss* machos com três meses de idade foram tratados, durante 5 dias, com STZ (50 mg/kg/dia a pH 4,5) ou veículo (tampão citrato 1M pH 4,5) de acordo com Like e Rossini (1976). Dois dias após esse período, a glicemia dos animais foi aferida e o ponto de corte para ser considerado diabético foi  $\geq 250$  mg/dL. Depois disso, os tratamentos foram iniciados.

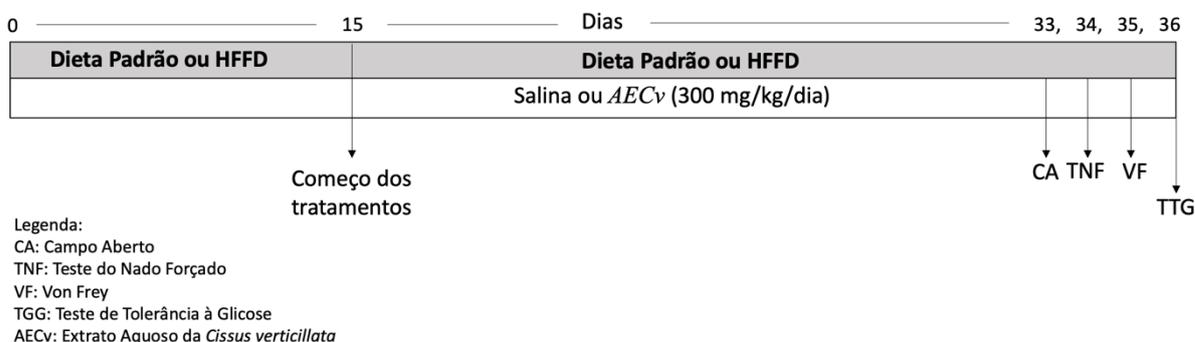
Durante 21 dias, os animais foram submetidos ao tratamento com solução salina ou o extrato aquoso obtido da *Cissus Verticillata* (AECv, do inglês *Aqueous Extract Cissus verticillata*) nas doses de 30 mg/kg ou 300 mg/kg via gavagem oral (o.g.) todos os dias. Nos 18º, 19º e 20º dias após o início dos tratamentos, uma bateria de testes comportamentais composta por Teste do Campo Aberto (dia 18), Teste da Borrifagem de Sacarose (dia 19) e Teste de Von Frey (VF) (dia 20) começou. Um dia após o último teste comportamental, após um jejum de 6h, foram aferidos os níveis de glicose dos animais, seguido de eutanásia para coleta de sangue, de acordo com as recomendações éticas (Fig. 9).



**Figura 9.** Desenho experimental 1: *Cissus verticillata* em modelo animal de DM1.

Para o modelo de disfunção metabólica induzida por dieta, dois grupos experimentais de camundongos foram divididos aleatoriamente ( $n = 20$  por grupo) e submetidos a dietas distintas por 15 dias: ração padrão para roedores (Nuvilab CR1, Nuvital; Quimtia Nutrientes SA, Brasil) ou dieta rica em gordura e frutose, composta por 61 kJ% de gordura saturada (Rhooster Indústria e Comércio, Brasil) juntamente com água potável filtrada contendo 10% de frutose (p/v; LabSynth, Brasil) (HFFD). A água contendo frutose foi renovada a cada dois dias.

Depois disso, tanto os camundongos controles quanto os animais submetidos a HFFD foram tratados, diariamente, durante 21 dias com veículo ou AECv na dose de 300 mg/kg/dia por gavagem oral. Nos dias 33, 34 e 35, após o início dos tratamentos, foi realizada uma bateria de testes comportamentais, composta por Teste do Campo Aberto, Teste do Nado Forçado e Teste de Von Frey. No dia seguinte ao teste final, os animais foram privados de comida durante seis horas e foi realizado o Teste de Tolerância à Glicose. Um dia após isso, os camundongos foram novamente submetidos ao jejum de seis horas e eutanasiados para coleta de sangue, conforme recomendações éticas (Fig. 10).



**Figura 10.** Desenho experimental 2: *Cissus verticillata* em modelo animal de disfunção metabólica induzida por dieta.

### 3.5 PREPARAÇÃO DO EXTRATO, EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS E METABÓLICOS

Para todos os parâmetros comportamentais analisados, ressalta-se que os pesquisadores estavam em uma sala separada avaliando o comportamento dos animais por meio de uma *webcam* colocada na sala experimental e completamente cegos aos grupos experimentais. Os experimentos foram realizados no horário da manhã, entre 9 e 12h, em uma sala com temperatura controlada em 22 graus e com luminosidade em torno de 20-30 lux (luz vermelha).

#### 3.5.1 Preparação do extrato aquoso da *Cissus verticillata*

Folhas de *Cissus verticillata* foram coletadas em Araranguá, Santa Catarina, em fevereiro de 2018 (verão). O material vegetal foi identificado pela Dra. Vanilde Citadini, do Departamento de Botânica da Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina (UNESC), e um espécime foi depositado no herbário sob o registro número 13298. O extrato aquoso da *Cissus verticillata* (AECv) foi preparado utilizando a técnica de decoção na proporção de 1:15 (proporção de droga vegetal: líquido extrator). As folhas secas (84,3 g) foram trituradas manualmente e colocadas em Becker com água (1,25 L) em uma placa aquecida até atingir a temperatura de 100 °C.

Após atingir a temperatura desejada, o material botânico foi mantido em aquecimento por mais 15 minutos para obtenção do extrato aquoso das folhas secas. Ao final desse período, o extrato aquoso obtido foi filtrado com papel filtro em funil de vidro, liofilizado e mantido na geladeira até o uso. O extrato final administrado nos animais foi diluído em água destilada, na dose de 30 ou 300 mg/kg. A solução de amostra foi preparada dissolvendo 1,5 mg do AECv em água para atingir uma concentração de 1 mg/mL. A solução foi filtrada através de uma membrana micropore de 0,22  $\mu$  m (Tedia Company, Inc., EUA) e armazenada a 4 °C antes da análise.

#### 3.5.2 Análise qualitativa do extrato por UPLC-HRMS

O perfil fitoquímico do extrato obtido a partir das folhas secas de *C. verticillata* foi efetuado em sistema UPLC Acquity equipado com detector de arranjo de diodos (PDA), amostrador automático, sistema quaternário de solventes e uma coluna cromatográfica Acquity BEH C18 (50 x 1,0 mm e 1,7  $\mu$ m) (Waters), da Central de Cromatografia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC. A coluna cromatográfica foi mantida a 40 °C, enquanto a bandeja com a amostra permaneceu com a temperatura de 20 °C. O sistema UPLC estava acoplado ao Espectrômetro de Massas MS/MS Xevo G2-S QToF (Waters) com ionização por electrospray (ESI) operando no modo positivo (ESI+).

Os espectros de massas foram adquiridos nos modos positivo, com a faixa de massa entre 100-1200 Da e um tempo de varredura de 0,3 seg. Os parâmetros do sistema foram: fluxo do gás do cone 200 L/h; fluxo do gás de dessolvatação 900 L/h; voltagem no cone 20-30 V; voltagem na fonte 80 V. O argônio foi utilizado como gás de colisão e o nitrogênio como gás de nebulização, dessolvatação e de cone. MS e MS2 foram adquiridos no modo centro e corrigidos durante a aquisição de uma referência externa (LockSpray™) com uma constante de infusão de solução de Leucina-encefalina (1 ng/mL) a uma taxa de fluxo de 20  $\mu$  L/min, para garantir valores precisos de massa foi utilizada como padrão de referência. O extrato foi solubilizado em água, na concentração de 1,0 mg/mL e filtrados em membrana filtrante de micropore com poro de 0,22  $\mu$  m e diâmetro de 13 mm (Tedia Company, Inc., EUA) e armazenada a 4°C antes da análise. Os dados foram processados e armazenados utilizando o *software* MassLynx™ V4.1 Mass Spectrometry (Waters, USA).

### **3.5.3 Teste do Campo Aberto**

O campo aberto foi usado para avaliar as atividades locomotoras e exploratórias induzidas por um novo ambiente. O aparelho, feito de madeira e revestido com fórmica impermeável, tinha 50 cm de largura  $\times$  50 cm de profundidade  $\times$  40 cm de altura. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e permitiu explorar o aparelho por 5 minutos livremente. Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: % de cruzamentos no centro, tempo no centro e número total de cruzamentos.

### **3.5.4 Teste do Nado Forçado**

O Teste do Nado Forçado é um teste comportamental em roedores usado para avaliação de medicamentos antidepressivos, eficácia antidepressiva de novos compostos e manipulações experimentais que visam tratar ou prevenir estados semelhantes aos depressivos. Os camundongos são colocados em um recipiente (30 cm de altura × 20 cm de diâmetro) com água (15 cm de profundidade) durante 5 minutos. O tempo para a primeira imobilidade e o tempo total de imobilidade foi registrado manualmente por um observador experiente (Can *et al.*, 2012).

### **3.5.5 Teste da Borrifagem de Sacarose**

Este teste seguiu o protocolo descrito por Isingrini *et al.* (2010) com pequenas modificações. Especificamente, este teste consistiu em esguichar uma solução de sacarina a 10% no dorso de um camundongo colocado individualmente em sua gaiola. Por causa de sua viscosidade, a solução de sacarina suja a pele do camundongo e os animais iniciam o comportamento de autolimpeza. Após a aplicação da solução de sacarina, o tempo de autolimpeza e a latência foram registrados por um período de 5 min como um índice de autocuidado e comportamento motivacional, considerado paralelo a alguns sintomas de depressão, como comportamento apático.

### **3.5.6 Análise da alodinia mecânica pelo Teste de Von Frey**

A alodinia mecânica foi avaliada de acordo com o método descrito por Chaplan *et al.* (1994). Os camundongos foram aclimatados por uma hora em caixas de Plexiglas em uma plataforma elevada de tela de arame para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras. Filamentos de Von Frey (0,02; 0,07; 0,16; 0,4; 1,4; 4,0; 8,0 gramas; VFH) foram aplicados verticalmente sobre a superfície plantar da pata traseira direita até observar sua curvatura sutil. O primeiro filamento usado foi de 0,4 g e o próximo filamento foi aumentado ou diminuído de acordo com a resposta de retirada da pata. A frequência de resposta é considerada após 6 aplicações dos filamentos de Von Frey, e o limiar mediano de retirada da pata foi determinado usando uma adaptação do método de Dixon.

### 3.5.7 Análise dos parâmetros de glicose

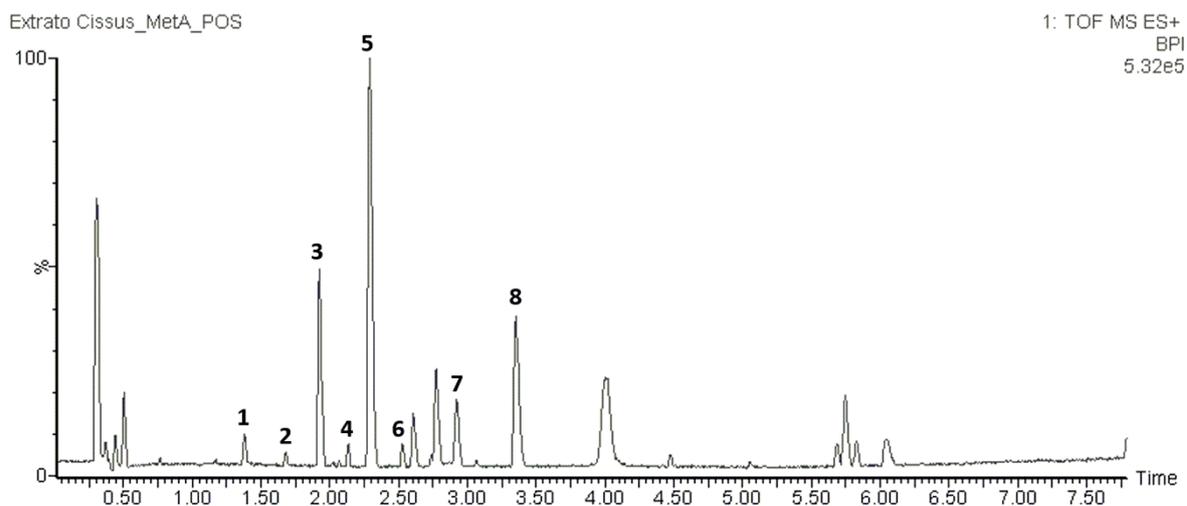
A tolerância à glicose foi avaliada após seis horas de jejum calórico (das 06:00 às 12:00) e uma injeção i.p. de 2 g/kg de glicose (Sigma Aldrich). A glicose no sangue foi retirada através de um pequeno corte na ponta da cauda após 0, 15, 30, 60 e 120 minutos usando um glicosímetro (Accu-check, Roche Diagnostic). A área sob a curva para glicose no sangue (AUC) foi calculada após a normalização pelos valores de linha de base (tempo 0).

### 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados são expressos como média + erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por meio de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (fatores: modelo, tratamento), com medidas repetidas quando apropriado. Após efeitos de interação significativos, testes *post-hoc* foram realizados (Teste de Newman-Keuls). O nível de significância aceito para todos os testes foi  $p \leq 0,05$ . Todos os testes foram realizados com o pacote de *software* STATISTICA® (StatSoft Inc, Tulsa, OK, EUA).

### 3.7 RESULTADOS

A identificação dos principais compostos no cromatograma de íons de pico de base (BPI) do AECv (Fig. 11) foi baseada em valores de  $m/z$  com tolerância de 5 ppm da massa teórica da fórmula molecular proposta, bem como comparando LC -Dados MS com os das normas e as informações bibliográficas. Os compostos identificados, predominantemente fenólicos, compreendendo seu tempo de retenção, fórmula molecular, massa monoisotópica experimental e fragmentos principais, estão descritos na Tabela 1.



**Figura 11.** UPLC-ESI(+)-QToF BPI cromatograma do extrato aquoso da *Cissus verticillata*.

Pico	Identificação proposta	rT (min)	Fórmula molecular	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup> (error, ppm)	MS/MS íons	MS/MS Referência
1	Triptofano	1.38	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	205.0978 (0.5)	188.0709 → 170.0630; 146.0608; 144.0806; 143.0793; 142.0603; 118.0652	[Wei <i>et al.</i> , 2016]
2	Ácido clorogênico	1.68	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	355.1027 (-0,6)	163.0392; 145.0283; 135.0449;	[Zhao <i>et al.</i> , 2014]
3	Vicenina-2	1.92	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	595.1661 (0.5)	457.1125; 427.1035; 409.0905; 379.0787; 325.0754	[De Beer <i>et al.</i> , 2012]
4	Orientina	2.13	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449.1084 (0.0)	431.0965; 413.0800; 395.0769; 383.0727; 353.0583; 329.0659; 299.0557	[Leba <i>et al.</i> , 2016]
5	Luteolina-7- <i>O</i> -rutinosídeo	2.29	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	595.1663 (0.0)	449.1073; 287.0557	[Xu <i>et al.</i> , 2017]
6	Apigenina-7- <i>O</i> -rutinosídeo	2.53	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	579.1719 (0.9)	433.1131; 271.0593	[Xu <i>et al.</i> , 2017]
7	Cumarina	2.92	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	147.0445 (-2)	N.D.	-
8	Luteolina	3.35	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	287.0554 (-1,0)	153.0187; 135.0449;	[Cuyckens <i>et al.</i> , 2004]

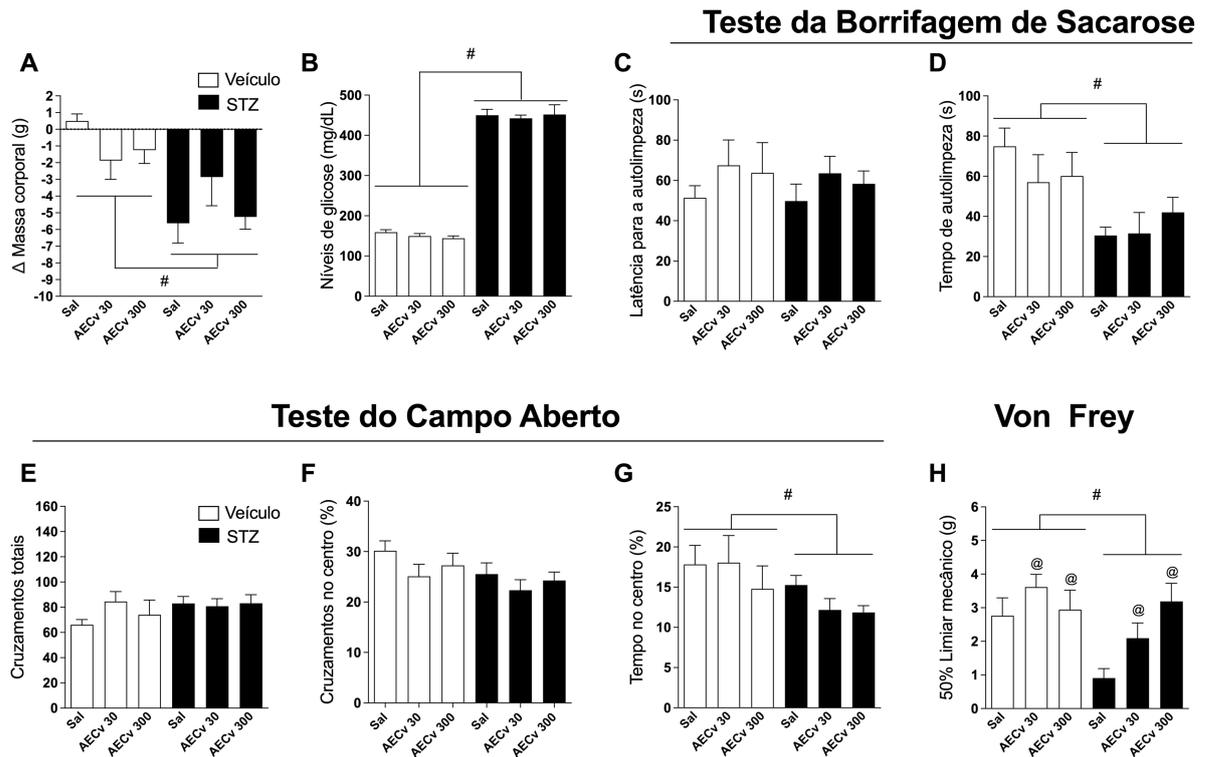
**Tabela 1.** Compostos identificados no extrato da *Cissus verticillata* encontrados por UPLC-HRMS e espectrometria de massa.

N.D. significa “não detectado”.

Em relação aos resultados metabólicos, a ANOVA de duas vias indicou que os camundongos tratados com STZ exibiram uma diminuição no delta da massa corporal quando comparados com seus controles [ $F(1,41) = 18,89, p < 0,05$ ; Fig. 12A]. Além disso, esses animais exibiram um aumento significativo na concentração de glicose sanguínea [ $F(1,41) = 139,85, p < 0,0001$ ] quando comparados com animais tratados com veículo (Fig. 12B), mostrando que o tratamento com STZ foi capaz de induzir hiperglicemia, como era esperado.

Em termos comportamentais, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos da administração de STZ na latência do comportamento de autolimpeza (Fig. 12C) no Teste da Borrifagem de Sacarose. Por outro lado, a administração de STZ resultou em uma diminuição geral no tempo de autolimpeza nos animais [ $F(1,41) = 13,13, p < 0,05$ ], sugerindo efeito do tipo anedônico, e o tratamento com o AECv não foi capaz de reverter esse comprometimento (Fig. 12D). No Teste do Campo Aberto, a ANOVA de duas vias indicou efeitos ansiogênicos do tratamento com STZ, evidenciado pela redução na porcentagem de tempo no centro observada nesses animais [ $F(1,41) = 4,25, p < 0,05$ ; Fig. 12G]. No entanto, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos no total de cruzamentos (Fig. 12E) e na porcentagem de cruzamentos centrais (Fig. 12F) em nenhum grupo.

Nos animais tratados com STZ, a ANOVA indica que o tratamento induziu alodinia mecânica avaliada no Teste de Von Frey, refletido na redução do limiar de retirada da pata [ $F(1,41) = 7,26, p < 0,05$ ], quando comparados com o grupo veículo. Por outro lado, o tratamento com o AECv foi associado com o aumento do tempo de retirada da pata nesses animais [ $F(2,41) = 3,91, p < 0,05$ ], sugerindo efeito antialodínico do AECv (Fig. 12H).

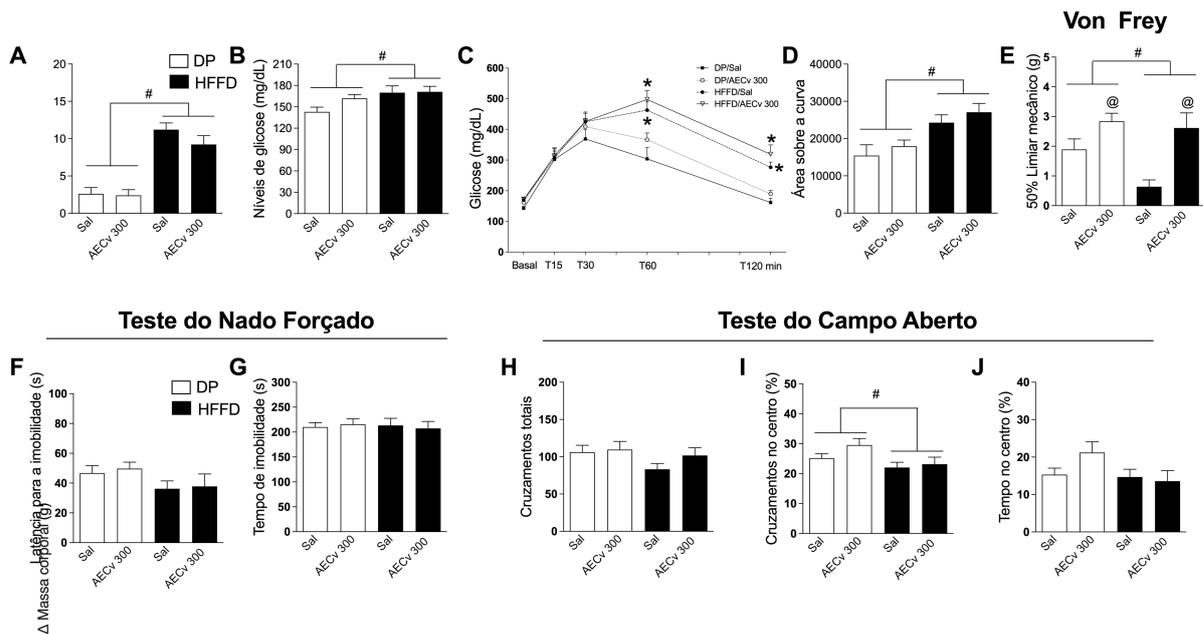


Em relação aos animais alimentados com a dieta rica em gordura e frutose (HFFD), observamos que a dieta resultou em um aumento geral na massa corporal [F (1,35) = 67,96, p<0,05] e na glicose basal dos animais [F (1,35) = 5,79, p<0,05] (Fig. 13A e B). Além disso, observamos que esses animais apresentam comprometimento da glicose avaliada no Teste de Tolerância à Glicose [efeito para a dieta F (1,35) = 16,69, p<0,05; efeito da repetição F (4,140) = 122,88, p<0,001; e efeito da interação entre dieta e repetição F (4,140) = 11,12, p<0,05] (Fig. 13C). Avaliações *post-hoc* posteriores, da análise ponto a ponto, mostraram um aumento significativo da concentração sanguínea de glicose em 60 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose nos grupos expostos a HFFD, independente do tratamento, em comparação com seus respectivos grupos controles (p<0,05).

Além disso, animais alimentados com HFFD revelaram maiores valores de área sob Ca curva (AUC) dos níveis de glicose no sangue quando comparados aos grupos alimentados com a dieta padrão [F (1,35) = 15,17, p<0,05; Fig. 13D]. As análises não mostraram efeitos significativos do tratamento com o AECv.

Em relação aos protocolos comportamentais, a ANOVA de duas vias indicou uma redução significativa no limiar de retirada da pata nos animais alimentados com HFFD [F (1,35) = 4,50,  $p < 0,05$ ], evidenciado pelo aumento na alodinia mecânica mostrada no Teste de Von Frey. Adicionalmente, os camundongos tratados com AECv apresentaram reversão nesse aumento de sensibilidade à dor, sugerindo potenciais efeitos antialodínicos do AECv [F (1,35) = 17,62,  $p < 0,05$ ; Fig. 13E].

Com relação aos animais alimentados com HFFD, a ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo na latência para imobilidade e tempo de imobilidade (Fig. 13F e G) no Teste do Nado Forçado, sugerindo ausência de efeito promotor de comportamento do tipo depressivo. Por outro lado, no Teste do Campo Aberto, a ANOVA de duas vias indicou efeitos significativos na porcentagem de cruzamentos centrais nos animais alimentados com HFFD [F (1,35) = 5,85,  $p < 0,05$ ], sugerindo aumento do comportamento do tipo ansioso nesses animais (Fig. 13I).



**Figura 13.** Efeitos do tratamento com o extrato aquoso da *Cissus verticillata* (AECv) sobre as alterações metabólicas e comportamentais induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos. Delta da massa corporal (A), glicose plasmática (B), Teste da Tolerância à Glicose e área sob a curva (C e D), Teste de Von Frey (E), Teste do Nado Forçado (F e G) e Teste do Campo Aberto (H-J). Os dados são expressos como média + EPM (n = 7-8 animais por grupo). “#” denota efeito principal para o modelo e “@” denota efeito principal do tratamento com AECv por ANOVA de duas vias ( $p \leq 0,05$ ), “\*”  $p \leq 0,05$  vs. salina grupo controle (ANOVA de duas vias e Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

### 3.8 DISCUSSÃO

Atualmente, estima-se que 30% de todos os medicamentos terapêuticos são derivados de fontes naturais, notadamente de plantas e microrganismos (Newman; Cragg, 2012; Dutra *et al.*, 2016). No contexto das doenças metabólicas, não é diferente. Muitas plantas são utilizadas na medicina popular e estudadas para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como o diabetes. Por exemplo, em 2008, Prabhakar e Doble mostraram que existiam mais de 400 plantas com propriedades antidiabéticas comprovadas experimentalmente, das quais apenas cerca de 100 tiveram seu mecanismo de ação estudado por completo.

Mais recentemente, Bindu e Narendhirakannan (2019) fizeram uma revisão com o objetivo de categorizar e resumir as informações disponíveis sobre plantas medicinais com propriedades antidiabéticas, chegando a um total de 81 plantas. No entanto, em nenhum desses levantamentos a *Cissus verticillata* esteve presente, mesmo sendo popularmente conhecida por seus supostos efeitos terapêuticos (de Souza e Neto, 2009). Nesse sentido, considerando o número limitado de evidências científicas validando o seu uso popular, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento com o extrato aquoso da *Cissus verticillata* em parâmetros metabólicos e comportamentais em modelos animais de Diabetes tipo 1 (DM1) e perturbações metabólicas induzidas por uma dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD).

Primeiramente, foram caracterizados os compostos da planta. A análise UPLC-HRMS permitiu a caracterização de oito compostos no extrato aquoso da *C. verticillata*. A análise destacou sua riqueza em flavonoides (vicenina-2, orientina, luteolina-7-O-rutinosídeo e apigenina-7-O-rutinosídeo), que são conhecidos por suas propriedades antioxidantes (Brunetti *et al.*, 2013) e atividades anti-inflamatórias (Choy *et al.*, 2019). As folhas também contêm polifenóis (ácido clorogênico), que possuem potencial efeito antioxidante, anti-inflamatório e antialérgico (Pandey; Rizvi, 2009). Além disso, a *C. verticillata* contém cumarina, um conhecido composto anticoagulante e hepatotóxico (Suarez-Kurtz; Botton, 2015), bem como triptofano, um precursor da serotonina (Jenkins *et al.*, 2016).

Em relação aos experimentos, considerando as análises metabólicas e neurocomportamentais, ficou evidente que a injeção de STZ induziu hiperglicemia (acima de 400 mg/dL), resultou em perda de peso corporal, provocou comportamento do tipo ansioso, diminuiu o comportamento de autocuidado e induziu alodinia mecânica. Além disso, os animais alimentados com HFFD apresentaram hiperglicemia, intolerância à glicose, aumento do peso corporal, comportamento do tipo ansioso e alodinia mecânica. É importante ressaltar que o AECv foi capaz de melhorar a alodinia mecânica induzida tanto pelo tratamento com STZ

quanto pela HFFD nos animais. No entanto, é importante notar que o AECv, administrado em doses de 30 e 300 mg/kg, não produziu melhorias nas deficiências de glicose induzidas por STZ e induzidas por HFFD nem no comportamento do tipo ansioso.

O comportamento semelhante à ansiedade também foi observado em um estudo conduzido por Yuan *et al.* (2019), no qual demonstraram que uma única administração de STZ (150 mg/kg) diminuiu o tempo central no Teste do Campo Aberto em camundongos. Além disso, Huang *et al.* (2016) mostraram que a administração de STZ na dose de 40 mg/kg por 5 dias foi capaz de induzir comportamento do tipo depressivo observado no Teste de Suspensão pela Cauda e perda de peso corporal em camundongos. Nos animais alimentados com HFFD, observamos ganho de peso, intolerância à glicose, aumento da glicose basal, comportamento do tipo ansioso e aumento da sensibilidade à dor. Nossos achados metabólicos e comportamentais convergem com dados da literatura, nos quais foi observado que camundongos alimentados com dieta hipercalórica (dieta hiperlipídica ou rica em frutose) apresentaram ganho de peso e intolerância à glicose (Braga *et al.*, 2021; De Souza *et al.*, 2019).

Evidências indicam que vários tipos de compostos naturais são capazes de atuar em alterações metabólicas (Prabhakar; Doble, 2008). No entanto, considerando todos os parâmetros analisados nos animais modelos de DM1 e nos animais alimentados com HFFD, nossas descobertas sobre os efeitos hipoglicêmicos do extrato aquoso de *C. verticillata* divergem da literatura existente. Por exemplo, Viana *et al.* (2004) demonstraram tais efeitos em um modelo de DM1 induzido por aloxana em ratos usando um extrato aquoso derivado de folhas frescas da *C. sicyoides*, sinônimo da *C. verticillata*. Administrados por via oral durante 7 dias em doses de 100 e 200 mg/kg, alcançaram reduções significativas de 25% e 22% nos níveis de glicose no sangue, respectivamente. Além disso, Barbosa *et al.* (2002) observaram diminuição de 19,5% na glicemia em ratos normoglicêmicos tratados com extrato de folhas de *C. verticillata* por 30 dias, envolvendo a substituição da água potável dos animais pelo extrato.

Adicionalmente, Salgado *et al.* (2009) exploraram uma administração de extrato aquoso de *C. sicyoides* por 60 dias, alcançando uma redução de 45% nos níveis de glicose. Em seu estudo, uma concentração de extrato de 6% foi administrada por via oral nos animais (6 mL/kg) após jejum de 16 horas. Pepato *et al.* (2003) substituíram a água potável dos ratos por uma decocção de *C. sicyoides*, observando uma queda de 10% nos níveis de glicose plasmática após 30 dias. Notavelmente, os níveis de glicogênio hepático permaneceram inalterados,

sugerindo que os efeitos hipoglicêmicos podem não envolver a inibição da glicogenólise ou a estimulação da glicogênese.

É importante notar que estudos anteriores (Barbosa *et al.*, 2002; Pepato *et al.*, 2003) empregaram diferentes protocolos de administração, administrando o extrato *ad libitum* através da água potável e por períodos mais longos em comparação com a nossa administração oral, diária e apenas uma vez ao dia. Considerando fatores farmacocinéticos e de biodisponibilidade, é plausível que doses mais elevadas ou períodos de tratamento prolongados com a *C. verticillata* possam levar a efeitos mais notáveis que os observados em nossos protocolos experimentais. No entanto, investigações adicionais explorando diversas vias de administração poderiam lançar luz sobre aspectos farmacocinéticos, contribuindo para uma compreensão abrangente do potencial da planta para uso generalizado.

Em nosso estudo, tanto o modelo de perturbação metabólica induzida por HFFD quanto os camundongos modelos de DM1 induzidos por STZ demonstraram um limiar de retirada da pata reduzido, indicando maior sensibilidade à dor. Múltiplas linhas de evidência sugerem o envolvimento do metilglioxal (MG), um composto dicarbonílico altamente reativo formado como subproduto da glicólise (Allaman *et al.*, 2015). Bierhaus *et al.* (2012) mostraram que os níveis de MG são maiores em pacientes diabéticos com dor em comparação com pacientes diabéticos sem dor. Da mesma forma, foi demonstrado que os níveis plasmáticos de MG estão elevados em camundongos modelos de DM1 induzidos por STZ (Bierhaus *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016) e nos níveis séricos em ratos alimentados cronicamente com frutose (Liu *et al.*, 2011). Pesquisas anteriores indicaram que o MG ativa diretamente o sistema nociceptivo através dos canais TRPA1 (Ohkawara *et al.*, 2012; Andersson *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016).

Além disso, foi sugerido que o MG contribui para a hiperalgesia e a alodinia ao sensibilizar o subtipo 1.8 do canal de sódio dependente de voltagem (Nav1.8) (Bierhaus *et al.*, 2012; Düll *et al.*, 2019). Adicionalmente, Westwood e Thornalley (1995) demonstraram que o MG é o agente de glicação mais potente, levando à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), que podem interromper a função proteica e interagir com o receptor específico de AGE (RAGE). Essa interação pode modificar a expressão gênica, a sinalização intracelular e promover a liberação de moléculas pró-inflamatórias e radicais livres (Singh *et al.*, 2014).

Notavelmente, nossas observações revelaram uma redução na dor mediante a administração do extrato aquoso da *C. verticillata* nos modelos de disfunção de glicose induzida por DM1 e HFFD. O efeito antialodínico observado, associado ao AECv, poderia potencialmente resultar de uma diminuição nos níveis de MG e do aumento da homeostase redox, independente do controle glicêmico. A presença de compostos específicos dentro do AECv, como a luteolina, poderia contribuir para estes efeitos.

A luteolina foi reconhecida como um agente terapêutico potencialmente valioso para o tratamento da dor inflamatória crônica e neuropática (Ntalouka; Tsirivakou, 2023). As evidências existentes sugerem que a luteolina pode ativar o Nrf2, um fator de transcrição envolvido na regulação da expressão de inúmeras enzimas antioxidantes (Xue *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Kitakaze *et al.*, 2020; Rajput *et al.*, 2021). Um estudo de Li *et al.* (2015) demonstraram que a luteolina foi capaz de ativar o fator nuclear Nrf2 nos nervos de ratos diabéticos, levando ao aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Além disso, a investigação indicou que a ativação de Nrf2 poderia levar à regulação positiva da própria glioxalase 1 (GLO1), uma enzima crucial para a depuração de MG (Xue *et al.*, 2012).

Outros compostos encontrados no AECv, como a orientina, também demonstraram a capacidade de aumentar a atividade antioxidante de enzimas como SOD, CAT e GPx no soro de um modelo de rato com envelhecimento induzido por D-galactose (An *et al.*, 2012). Esses compostos podem contribuir para a redução dos níveis de MG, aumentando a capacidade antioxidante endógena, uma vez que a glutathione reduzida (GSH) é necessária como cofator catalítico para GLO1 no sistema glioxalase.

Além disso, outra explicação potencial envolve um efeito na via de sinalização da dor, uma vez que alterações na via espinotalâmica podem levar a alterações na transmissão e percepção de estímulos nocivos (Millan, 1999). O ácido clorogênico (CGA), também constituinte do AECv, tem sido considerado, com base em dados da literatura, um agente promissor no manejo da dor neuropática (Bagdas *et al.*, 2020). As fibras nervosas responsáveis pela condução de estímulos nocivos contêm canais de potássio dependentes de voltagem (KV) em sua composição (Rasband *et al.*, 2001). Nessa direção, foi demonstrado que a CGA induz hiperpolarização em neurônios do gânglio trigêmeo em cultura de células, modulando o KV, reduzindo seu limiar e a velocidade de inativação (Zhang *et al.*, 2014). Isso sugere que o efeito da CGA nas KVs poderia neutralizar a estimulação dos canais Nav1.8 e TRPA1 pelo MG,

potencialmente prevenindo a sensação de dor, uma vez que as KVs desempenham um papel crucial na manutenção do potencial de membrana e na regulação da fase do potencial de ação.

No entanto, o mecanismo pelo qual a CGA atua permanece obscuro. Um estudo realizado por Hara *et al.* (2014) demonstrou que a CGA intratecal reduziu a hiperalgesia mecânica de maneira dose-dependente, e esse efeito foi parcialmente revertido por um antagonista GABA-A (em uma dosagem que não teve impacto nas respostas comportamentais iniciais), implicando que a CGA pode aumentar a transmissão GABAérgica em ratos. Como o GABA-A é um canal de cloreto, hiperpolariza a membrana e contribui para a inibição da transmissão.

O efeito antialodínico do AECv pode abranger a modulação do perfil inflamatório, a redução do estresse oxidativo e a regulação dos canais iônicos presentes nos neurônios envolvidos na via de sinalização da dor. No entanto, dado que o AECv não teve impacto na glicemia e a geração de MG provavelmente persistiu, é mais plausível que o mecanismo primário pelo qual o AECv opera esteja na via espinotalâmica, potencialmente interrompendo ou diminuindo o disparo de neurônios nociceptivos. Dada a sua importância no tratamento da dor neuropática, uma preocupação prevalente entre os indivíduos com diabetes, estes resultados abrem caminho para o potencial desenvolvimento de um medicamento botânico, validando ainda mais o uso tradicional do referido extrato pela população. Embora estas descobertas sejam promissoras, são necessárias mais investigações para aprofundar os mecanismos subjacentes e os potenciais benefícios ou riscos terapêuticos associados ao uso crônico dessa planta.

A análise fitoquímica da *Cissus verticillata* mostrou que as folhas possuem flavonoides (vicenina-2, orientina, luteolina-7-O-rutinosídeo e apigenina-7-O-rutinosídeo) que apresentam ação antioxidante (Brunetti *et al.*, 2013) e atividades anti-inflamatórias (Choy *et al.*, 2019). Liu *et al.* (2015) mostraram que a orientina apresentou efeitos do tipo antidepressivo em modelos animais de depressão induzidos por estresse crônico imprevisível, potencialmente via ação em neurotransmissores, estresse oxidativo e neuroplasticidade. Aqui, porém, a *Cissus verticillata*, que contém orientina, não apresentou efeitos na emocionalidade.

Convergente com nossos dados, no entanto, Guo *et al.* (2018) mostraram que ratos tratados com orientina tiveram melhora da dor em modelos de cirurgia para dor neuropática. Em outro estudo, foi demonstrado que a orientina atua via inibição do receptor do tipo toll 4 (TLR4, do inglês *Toll Like Receptor 4*), um receptor-chave na dor neuropática (Bruno *et al.*, 2018). Os outros dois compostos flavonoides — a saber: a luteolina-7-O-rutinosídeo e

apigenina-7-O-rutinosídeo — carecem de evidência acerca de seus potenciais efeitos no comportamento ou dor. Avaliando os potenciais alvos dessas biomoléculas via o website <http://www.swisstargetprediction.ch>, observamos que a luteolina-7-O-rutinosídeo pode ter como alvo a enzima acetilcolinesterase, e a apigenina-7-O-rutinosídeo, o receptor de adenosina 1A. Novos estudos podem explorar melhor essa relação.

Outro grupo de moléculas presentes no extrato da *Cissus verticillata* são alguns polifenóis (ácido clorogênico), que possuem atividade antioxidante, anti-inflamatória e antialérgica (Pandey; Rizvi, 2009), potenciais vias de desfecho terapêutico. O ácido clorogênico (CGA), que é formado pela condensação do ácido cafeico com o ácido quínico, está amplamente presente na natureza e é um dos polifenóis mais abundantes na dieta humana (El-Seedi *et al.*, 2012), em especial nas plantas, frutas e vegetais. Por exemplo, o grão ainda verde do café apresenta altas concentrações de ácido clorogênico, porém parte dessa quantidade é perdida durante o processo de produção comercial do grão, fazendo com que os níveis de ácido clorogênico em uma xícara de café de 200 ml variem de 70 a 350 mg (Clifford, 2000).

Embora a relevância clínica desse dado ainda seja pouco entendida, o ácido clorogênico vem demonstrando potenciais efeitos benéficos em modelos pré-clínicos. Ye *et al.* (2021) mostraram que camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta rica em gordura saturada e tratados diariamente com 150 mg/kg de ácido clorogênico durante 20 semanas apresentaram redução no ganho de peso após quatro semanas de tratamento quando comparados aos animais do grupo que recebeu apenas dieta rica em gordura. Nos camundongos alimentados com dieta rica em gordura, o ganho de peso reduzido daqueles que receberam ácido clorogênico foi atribuído principalmente a uma redução significativa na massa de gordura total que incluiu tecido adiposo subcutâneo e visceral. O consumo calórico não diferenciou entre os grupos.

Adicionalmente, os autores demonstraram que os animais que receberam o ácido clorogênico mostraram redução em prejuízos no metabolismo da glicose, possivelmente por o tratamento atenuar vias pró-inflamatórias (Ye *et al.*, 2021). Em nosso estudo, os animais tratados com o extrato da *Cissus verticillata*, que contém ácido clorogênico, não apresentaram mudanças significativas no que diz respeito aos parâmetros metabólicos quando comparados aos seus controles na dieta hipercalórica. Não obstante, o ácido clorogênico pode ter contribuído para a reversão do aumento da alodinia observado no presente estudo. Em uma revisão sobre os potenciais efeitos na modulação da dor, Bagdas *et al.* (2020) mostraram dados apontando que o ácido clorogênico parece atuar em cascatas inflamatórias importantes da dor neuropática,

como, por exemplo, via inibição do TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e MAPK, podendo ser potencialmente as vias pelas quais o extrato da *C. verticillata* atuou.

Outro composto presente no extrato da *C. verticillata* é a cumarina, um fenólico natural encontrado em alimentos de origem vegetal, como frutas cítricas, tomates, vegetais e chá verde. Apesar de tóxica, a exposição humana diária total à cumarina gira em torno de 0,06 mg/kg/dia, dose considerada segura. Além disso, estima-se que nenhum efeito adverso foi relatado em espécies susceptíveis à cumarina em resposta à dose cem vezes maior que a dose máxima de humanos (Lake, 1999).

Em termos terapêuticos, estudos indicam que a cumarina possui atividades antibacterianas, antivirais, vasodilatadoras, antimutagênicas, antioxidantes e anticancerígenas (Murat *et al.*, 2011). No Brasil, os anticoagulantes orais aprovados pela ANVISA são da classe das cumarinas (varfarina e a fenprocumona) (Suarez-Kurtz; Botton, 2015). Em modelos pré-clínicos, a cumarina apresentou efeitos capazes de atenuar o ganho de peso em animais C57Bl/6 alimentados com dieta hipercalórica após oito semanas de tratamento (Um *et al.*, 2013). No comportamento, os dados são escassos. No entanto, no que diz respeito à dor, dados pré-clínicos mostram potenciais efeitos de um derivado da cumarina chamado “muralatin L”, que pode ativar especificamente o canal do potencial do receptor transitório do nociceptor vaniloide 1 (TRPV1) e reverter a dor inflamatória em camundongos (Wei *et al.*, 2015). Dado seu componente tóxico, propomos que, ao passar para o desenvolvimento de um fitoterápico, a *C. verticillata* seja submetida a uma etapa de descumarinização, para que a cumarina seja removida. Além disso, o uso crônico da planta (em chás) pode apresentar risco.

Por fim, outro composto presente no extrato da *C. verticillata* é o triptofano, o aminoácido mais prevalente e que desempenha um papel significativo na biossíntese de proteínas em corpos humanos animais. Além de sua incorporação em proteínas, o triptofano é metabolizado em rotas diferentes e produz componentes biologicamente importantes, em especial a serotonina e a melatonina (Höglund *et al.*, 2019). O triptofano é parte importante da dieta humana e desempenha um papel essencial em sistemas cerebrais, respostas fisiológicas ao estresse, respostas inflamatórias, sistemas oxidativos e na saúde gastrointestinal (Davidson *et al.*, 2022). A nível cerebral, uma dieta rica em triptofano foi capaz de atenuar os efeitos deletérios do estresse crônico imprevisível em camundongos, melhorando a neuroinflamação, aumentando a expressão de BDNF e melhorando o metabolismo energético mitocondrial (Wang *et al.*, 2022).

Coletivamente, nossos resultados reproduzem as comorbidades encontradas no DM1 (diminuição da massa corporal, comportamento anedônico, comportamento do tipo ansioso e aumento da sensibilidade à dor) e DM2 (ganho de peso, intolerância à glicose, aumento da glicemia basal, comportamento do tipo ansioso e aumento da sensibilidade à dor). Além disso, nossos achados sugerem que o tratamento com *Cissus verticillata* nas doses de 30 e 300 mg/kg não tem efeitos hipoglicêmicos, ansiolíticos ou antidepressivos nesses modelos. No entanto, nossos achados sugerem que *Cissus verticillata* é capaz de melhorar o limiar de sensibilidade à dor. Dada a sua importância no tratamento da dor neuropática, uma preocupação prevalente entre os indivíduos com diabetes, estes resultados abrem caminho para o potencial desenvolvimento de um medicamento botânico, validando ainda mais o uso tradicional desse extrato pela população. Embora estas descobertas sejam promissoras, são necessárias mais investigações para aprofundar os mecanismos subjacentes e os potenciais benefícios ou riscos terapêuticos associados ao uso crônico dessa planta.

#### **4 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS, COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS POR DIETA RICA EM GORDURA SATURADA E FRUTOSE EM UM MODELO ANIMAL DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR E EM ANIMAIS SELVAGENS**

Aqui, usando uma abordagem que mescla efeitos ambientais e genéticos, buscamos aprofundar o conhecimento acerca dos efeitos de disfunções metabólicas, como a hipercolesterolemia, em desfechos comportamentais, visando encontrar correlações cerebrais tanto em nível neuroquímico quanto em nível morfológico, em animais tratados com dieta rica em gordura saturada e frutose.

##### **4.1 INTRODUÇÃO**

Nos últimos cinquenta anos, a prevalência de pessoas com obesidade aumentou em níveis pandêmicos, e as mudanças no comportamento alimentar, como o aumento do consumo de alimentos hipercalóricos — bebidas açucaradas e alimentos ricos em gorduras saturadas —, surgem como um dos principais responsáveis por esses números (Blüher, 2019). Também conhecidos como ultraprocessados, esses alimentos possuem baixo valor nutricional e, por serem palatáveis, são ingeridos em quantidades excessivas, favorecendo um balanço energético positivo e, em última instância, o ganho de peso (Malik *et al.*, 2006). No Brasil, dados epidemiológicos apontam que o consumo de calorias provenientes de alimentos ultraprocessados é de aproximadamente 20% (Louzada *et al.*, 2023). No entanto, em alguns países do mundo, alimentos como esses representam uma porcentagem significativa da dieta da população. Por exemplo, nos Estados Unidos, Canadá e Reino Unido, estima-se que cerca de 50 a 60% do conteúdo energético diário venha de alimentos ultraprocessados (Martínez *et al.*, 2016; Moubarac *et al.*, 2017; Rauber *et al.*, 2018).

Além de sobrepeso e obesidade, um padrão dietético rico em gordura saturada e açúcares refinados pode favorecer o desenvolvimento de outras condições potencialmente nocivas à saúde, como diabetes, problemas cardiovasculares e dislipidemias. A hipercolesterolemia, uma forma de dislipidemia, é caracterizada por aumento da concentração de colesterol LDL no sangue e apresenta-se como fator de risco independente para desfechos cardiovasculares (FERENCE *et al.*, 2017; Borén *et al.*, 2020), como doenças coronarianas,

cerebrovasculares e infartos, problemas que mais levam pessoas ao óbito no mundo há pelo menos trinta anos (Roth *et al.*, 2020).

Além dos problemas bem conhecidos atrelados à hipercolesterolemia, evidências provenientes de estudos observacionais longitudinais realizados nas últimas décadas têm demonstrado a hipercolesterolemia como um fator de risco precoce para declínio cognitivo e demência. Por exemplo, em uma meta-análise envolvendo mais de vinte mil participantes, os dados apontam que pessoas com colesterol total aumentado apresentaram duas vezes mais riscos de desenvolver Doença de Alzheimer quando comparadas ao grupo com colesterol normal (Anstey *et al.*, 2017). Dada sua importância, diversos grupos de pesquisa têm se debruçado para entender como o colesterol (e seu excesso) tem influência sobre as funções cerebrais. Por exemplo, nosso grupo mostrou que camundongos *Swiss* alimentados com dieta rica em colesterol (1,25%) apresentaram aumento na atividade da enzima acetilcolinesterase e déficits na memória dependente de hipocampo (Moreira *et al.*, 2014).

Uma das formas de estudar os efeitos crônicos do colesterol no SNC é por meio de pacientes que apresentam Hipercolesterolemia Familiar (HF), uma doença genética autossômica dominante caracterizada por níveis elevados de colesterol plasmático, em especial o LDL (Lui; Lee; Tan, 2020). Zambón *et al.* (2010) mostraram maior incidência de comprometimento cognitivo leve na HF. Em um estudo de coorte, os pacientes com hipercolesterolemia familiar mostraram uma alta incidência de comprometimento cognitivo leve em comparação àqueles sem hipercolesterolemia familiar (21,3% vs. 2,9%). Em outro estudo de coorte retrospectivo com mais de 1,8 milhão de pessoas, Iwagami *et al.* (2021) mostraram que o colesterol LDL elevado na meia idade está modestamente associado com o risco de demência dez anos depois, e sugeriram que o colesterol LDL deve ser adicionado à lista de fatores de risco para demência. Embora esses dados mostrem associação entre HF e disfunções comportamentais, os mecanismos pelos quais isso acontece ainda permanecem relativamente desconhecidos. Em laboratório, significativos avanços foram possibilitados pelo modelo animal de HF, o camundongo nocaute para o receptor LDL (LDLr<sup>-/-</sup>).

O camundongo LDLr<sup>-/-</sup> foi desenvolvido e descrito por Ishibashi e colaboradores no ano de 1993 e tem como mecanismo a deleção no gene que codifica o receptor de LDL. Como resultado, os animais não apresentam a produção do receptor LDL, impossibilitando que a célula detecte a quantidade plasmática de colesterol, favorecendo sua síntese. Em última instância, os animais apresentam níveis elevados de colesterol plasmático, especialmente o

colesterol LDL, semelhante aos indivíduos com HF. A título de exemplo, os níveis de colesterol plasmático em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> ficam em torno de 250 mg/dL em uma dieta regular (duas a três vezes mais que um animal do tipo selvagem).

Diversos estudos da literatura apontam que esses animais apresentam déficits em funções comportamentais, como deficiência na memória, aumento do comportamento do tipo depressivo e ansioso, além de disfunções em inúmeros marcadores neurofisiológicos, como o aumento de citocinas pró-inflamatórias, da permeabilidade da barreira hematoencefálica, estresse oxidativo, dentre outros (de Oliveira *et al.*, 2024). Em termos comportamentais, Mulder *et al.* (2004) foram os primeiros a observar que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentam problemas na memória em testes de memória espacial e de trabalho. Vários estudos subsequentes confirmaram esse prejuízo e sugeriram potenciais mecanismos para esse déficit. Por exemplo, nosso laboratório mostrou que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> de meia-idade são mais suscetíveis a déficit de memória de curto e longo prazo no Teste de Esquiva Inibitória do tipo *step-down*, o que parece estar associado ao aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) no córtex pré-frontal de camundongos (Moreira *et al.*, 2012). Já Thirumangalakudi *et al.* (2008) mostraram que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentam prejuízos na memória espacial, associado ao aumento de marcadores neuroinflamatórios. Adicionalmente, nosso grupo mostrou que o comprometimento comportamental em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> foi acompanhado por uma exacerbação da apoptose neuronal em regiões cerebrais relacionadas à formação de memória, mas não por alterações no processamento ou nos níveis de  $\beta$ -amiloide (de Oliveira *et al.*, 2020), um peptídeo relacionado com a neurobiologia da Doença de Alzheimer. Nesse sentido, o animal LDLr<sup>-/-</sup> apresenta inúmeras vantagens para o estudo sobre os efeitos crônicos da hipercolesterolemia no SNC, potencialmente permitindo o desenvolvimento de novos fármacos para os pacientes com HF.

## 4.2 OBJETIVOS

### 4.2.1 Objetivo geral

Analisar a susceptibilidade comportamental, metabólica e neuroplástica de camundongos LDLr<sup>-/-</sup>, em comparação com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem, à dieta rica em açúcares e gorduras saturadas.

#### 4.2.2 Objetivos específicos

Avaliar os parâmetros:

a) Metabólicos:

- Acompanhamento da massa corporal dos animais.
- Mensuração da massa de gordura visceral dos animais.
- Medidas da concentração plasmática de colesterol total e glicose.
- Mensuração indireta da secreção da insulina por meio do Teste de Tolerância à

Glicose.

b) Comportamentais:

- Locomoção espontânea e comportamento do tipo ansioso no Teste do Campo Aberto.
- Avaliação do comportamento do tipo depressivo via Teste do Nado Forçado.
- Avaliação da memória dependente de hipocampo no Teste do Reconhecimento de Objeto.
- Mensuração da memória aversiva no Teste de Esquiva Inibitória do tipo *step-down*.

c) Neuroquímicos:

- Quantificação do imunocontéudo das proteínas do hipocampo que estão envolvidas na via de síntese proteica (mTOR, ATF-4, GSK-3 $\beta$ , eIF2- $\alpha$  e p70S6K) na versão normal e fosforilada por meio da técnica de Western Blotting.

- Quantificação do imunocontéudo das proteínas do hipocampo que estão envolvidas na plasticidade sináptica (GluA1, PSD-95, Sinapsina) por meio da técnica de Western Blotting.

- Mensuração das espinhas dendríticas de neurônios localizados na região do giro denteado do hipocampo.

#### 4.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 e animais nocautes para o gene do receptor de lipoproteína de baixa densidade (designados LDLr $^{-/-}$ ) machos com três meses de idade no início dos protocolos. Casais de camundongos LDLr $^{-/-}$  foram gentilmente cedidos pelo

Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Brasil, sendo mantida uma colônia de reprodução e manutenção em nosso laboratório de pesquisa na UFSC. Os progenitores foram adquiridos do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA).

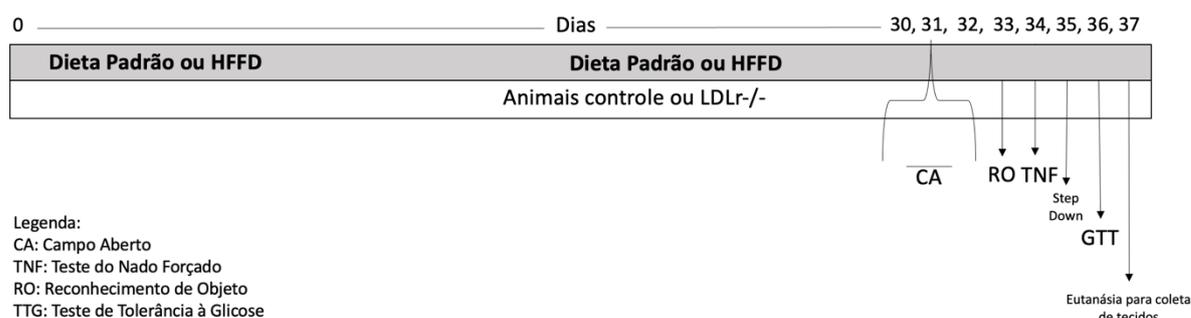
Inicialmente os animais foram alojados em gaiolas coletivas, mantidos em um ambiente de temperatura controlada entre 22 e 24 graus, de acordo com recomendações do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica do CONCEA (Resolução Normativa 13, 2013). Todos os animais tiveram livre acesso a água e comida. O ciclo de luminosidade claro/escuro foi de 12h, iniciando o ciclo claro às 6h da manhã. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/UFSC), de acordo com a Lei Federal 11.794, de 2008, sob o número 5875220419.

Em todos os delineamentos experimentais, de todas as seções da presente tese, onde constar a administração de fármacos e/ou drogas por meio da via intraperitoneal (i.p.), um volume de administração de 0,1 mL por 10 gramas de peso corporal dos animais foi respeitado. Os animais foram monitorados em suas gaiolas-moradias diariamente e, na presença de sinais clínicos indicativos de dor ou estresse (e.g., ambulação prejudicada, não permitindo aos animais acesso a comida e água; excessiva perda de peso; prolongada dificuldade de se manter na posição vertical, dentre outros sinais indicativos de um estado moribundo), os animais foram imediatamente excluídos do estudo, sendo realizada a eutanásia destes (*humane endpoint*), de acordo com Stokes (2002). Nestes casos, os animais foram eutanasiados por meio de administração de dose excessiva de uma mistura dos anestésicos cetamina (150 mg/kg; i.p.) e xilazina (30 mg/kg; i.p.). A análise dos parâmetros de eutanásia humanitária teve como base o documento ENV/JM/MONO(2000) da OECD “*GUIDANCE DOCUMENT ON THE RECOGNITION, ASSESSMENT, AND USE OF CLINICAL SIGNS AS HUMANE ENDPOINTS FOR EXPERIMENTAL ANIMALS USED IN SAFETY EVALUATION*”.

#### 4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para indução de perturbações metabólicas, os animais foram submetidos a uma dieta rica em gordura saturada (60%) e frutose na água de beber (10% p/v), designada aqui pela sigla HFFD (*High-Fat-Fructose Diet*, na sigla em inglês). Camundongos C57Bl/6 ou LDLr<sup>-/-</sup> com

três meses de idade foram divididos em quatro grupos experimentais: controle (dieta padrão e HFFD) e LDLr<sup>-/-</sup> (dieta padrão e HFFD). Os animais HFFD foram submetidos à dieta hiperlipídica (60%) mais solução de frutose na água (10% p/v) por 36 dias. No dia 30, iniciou-se uma bateria de testes comportamentais composta pelo Teste do Campo Aberto, Teste do Reconhecimento de Objeto, Teste do Nado Forçado e Teste da Esquiva Inibitória do tipo *step-down*. Um dia após o último teste, os animais foram submetidos a um jejum de 6h e, posteriormente, submetidos ao Teste de Tolerância à Glicose (GTT). Um dia após esse teste, novamente após jejum de 6h, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg; i.p.) e xilazina (10 mg/kg; i.p.) para coleta de sangue e de tecidos. Em uma das levas experimentais, os tecidos foram endereçados aos procedimentos que envolviam quantificação das proteínas pré-sinápticas envolvidas na cascata de síntese proteica. Em outra leva experimental, os tecidos foram endereçados para a realização das análises morfológicas.



**Figura 14.** Desenho experimental: efeitos de uma dieta hipercalórica em animais LDLr<sup>-/-</sup>.

#### 4.5 EXPERIMENTOS COMPORTAMENTAIS, METABÓLICOS E NEUROQUÍMICOS

Para todos os parâmetros comportamentais analisados, ressalta-se que os pesquisadores estavam em uma sala separada avaliando o comportamento dos animais por meio de uma *webcam* colocada na sala experimental e completamente cegos aos grupos experimentais. Os experimentos foram realizados no horário da manhã, entre 9 e 12h, em uma sala com temperatura controlada em 22 graus e com luminosidade em torno de 20-30 lux (luz vermelha).

#### **4.5.1 Teste do Campo Aberto**

O campo aberto foi usado para avaliar as atividades locomotoras e exploratórias induzidas por um novo ambiente. O aparelho, feito de madeira e revestido com fórmica impermeável, tinha 50 cm de largura × 50 cm de profundidade × 40 cm de altura. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e permitiu explorar o aparelho por 5 minutos livremente. Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: % de cruzamentos no centro, tempo no centro e número total de cruzamentos.

#### **4.5.2 Teste do Reconhecimento de Objeto**

Mamíferos, em geral, são naturalmente curiosos e atraídos por novidades. Neste teste não há reforços positivos ou negativos, afere-se a preferência natural por novos objetos. O aparato utilizado foi um campo aberto. O procedimento consistiu em três sessões de habituação ao campo aberto com duração de 5 minutos por 3 dias seguidos, na qual o animal foi colocado no aparato para livre exploração. Após 24 horas do último dia de habituação, os animais foram reexpostos ao campo aberto por 5 minutos com a presença de dois objetos idênticos (treino). Nesse momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na caixa. Após o treino, os animais retornaram à sua caixa-moradia e aguardaram até o momento do teste, 30 minutos após o treino. No momento do teste, um dos objetos foi trocado, e foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Esse tempo de exploração dos objetos foi utilizado para o cálculo do índice de reconhecimento dos objetos, utilizado como parâmetro de memória.

#### **4.5.3 Teste do Nado Forçado**

O Teste do Nado Forçado é um teste comportamental em roedores usado para avaliação de medicamentos antidepressivos, eficácia antidepressiva de novos compostos e manipulações experimentais que visam tratar ou prevenir estados semelhantes aos depressivos. Os camundongos são colocados em um recipiente (30 cm de altura × 20 cm de diâmetro) com água (15 cm de profundidade) durante 5 minutos. O tempo para a primeira imobilidade e o

tempo total de imobilidade foi registrado manualmente por um observador experiente (Can *et al.*, 2012).

#### **4.5.4 Teste da Esquiva Inibitória do tipo *step-down***

A memória espacial de curto e longo prazo foi avaliada por meio do modelo de esquiva inibitória. Nesta tarefa, o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve e não lesivo choque nas patas. Na segunda exposição à caixa, espera-se que o animal apresente um comportamento de esquiva, com ausência de exploração. O teste foi realizado com um protocolo anteriormente usado em nosso laboratório. O aparato consiste em uma caixa de acrílico medindo 50 × 25 × 25 cm. Parte do chão do aparato possui uma grade com barras de bronze com 1 mm de diâmetro, com espaçamento de 1 cm entre elas. Uma plataforma em acrílico com 10 cm<sup>2</sup> de superfície e 2 cm de altura foi colocada no centro do assoalho. O animal foi posto sobre a plataforma e sua latência para descer sobre a grade (com as quatro patas) foi cronometrada. Na sessão de treino, imediatamente após o animal descer sobre a grade, ele é estimulado com um leve choque nas patas (0,3 mA) durante 2,0 segundos. Cada animal foi testado 1,5 h após o treino para avaliação de memória de curta duração e 24 h após o treino para avaliação de memória de longa duração, realizando-se o mesmo procedimento, mas omitindo-se o choque, sendo também cronometrado o tempo que o animal demora a descer da plataforma.

#### **4.5.5 Parâmetros metabólicos**

A tolerância à glicose foi avaliada após seis horas de jejum calórico (das 06:00 às 12:00) e uma injeção i.p. de 2 g/kg de glicose (Sigma Aldrich). A glicose no sangue foi retirada através de um pequeno corte na ponta da cauda após 0, 15, 30, 60 e 120 minutos usando um glicosímetro (Accu-check, Roche Diagnostic). A área sob a curva para glicose no sangue (AUC) foi calculada após a normalização pelos valores de linha de base (tempo 0). O colesterol total foi medido no plasma por meio do kit enzimático de acordo com as instruções do fabricante (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Brasil). Os resultados foram expressos em mg/dL. Os níveis de insulina no plasma em jejum foram quantificados pelo sistema AlphaLisa® (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA, cat. No. AL204) de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.5.6 Imunodeteção de proteínas por meio da técnica de Western Blotting

Em uma das levas experimentais, os tecidos hipocâmpais dos animais ( $n = 8$  por grupo) foram homogeneizados mecanicamente em 400  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, fluoreto de sódio 100 mM, PMSF 0,1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e Coquetel inibidor de proteases). O material lisado foi centrifugado ( $10000 \times g$  por 10 min, a 4 °C) para a eliminação de restos celulares, e o sobrenadante (300  $\mu\text{l}$ ) diluído 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS 8%) foi aquecido a 100 °C por 5 min.

Após homogeneização, retirou-se uma alíquota para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se em uma proporção de 25:100 (v/v) a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 25 mM e azul de bromofenol, pH 6,8), finalizando o procedimento com adição de  $\beta$ -mercaptoetanol 8%. As proteínas (60  $\mu\text{g}$  de proteína total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 6% de acrilamida) contendo SDS (SDSPAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. Em seguida, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose.

Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%. Na sequência, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com leite desnatado 5% (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). O imunoconteúdo das formas total e fosforilada de mTOR (Ser<sup>2448</sup>) e p70S6K (Thr389), bem como de PSD-95, GluA1, Sinapsina e GSK-3 $\beta$ , foi identificado por meio do uso de anticorpos específicos. A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle de carga. As membranas foram incubadas com o anticorpo de interesse *overnight* a 4 °C em agitação constante.

No dia seguinte, para a detecção dos imunocomplexos, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:5000) e a imunorreatividade das bandas foi revelada por quimiluminescência com o reagente ECL (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), segundo especificações do fabricante e com o uso do equipamento de revelação Chemidoc® (Bio-Rad Laboratories). Os níveis de fosforilação de mTOR e p70S6K foram determinados pela razão da densidade óptica (DO) da banda fosforilada sobre a DO da banda total. O imunoconteúdo de PSD-95, GluA1, Sinapsina e GSK-3 $\beta$  foi determinado pela razão da DO das bandas pela DO da banda de  $\beta$ -actina. A DO das bandas foi quantificada usando Image Lab software® 4.1 (Bio-Rad Laboratories).

#### 4.5.7 Processamento do encéfalo para a impregnação com Golgi

Em outra leva experimental, os animais ( $n = 5-7$  por grupo) foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de xilazina (8 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg) e perfundidos transcardialmente com cloreto de sódio a 0,9% (NaCl) seguido por uma solução de 4% paraformaldeído (PFA). Após a perfusão, os encéfalos foram prontamente removidos da caixa craniana, colocados em frascos contendo 20 mL de solução Golgi-Cox e ficaram armazenados no escuro à temperatura ambiente por 15 dias para impregnação e marcação neuronal, conforme a técnica de Golgi (Gibb; Kolb, 1998; Kannangara *et al.*, 2014; Risher *et al.*, 2014).

Após esse período, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose a 30%. Posteriormente à saturação em sacarose, seções coronais de 200  $\mu\text{m}$  de espessura em série foram obtidas em um vibratomo (Vibratome®, Série 1000, St. Louis, MO, EUA). Em seguida as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas a 2% e ficaram em uma câmara escura por 48 horas. Depois desse tempo, as amostras foram submetidas a uma sequência de desidratação: água destilada (1 min), hidróxido de amônio (30 minutos), água destilada (1 min), Kodafix (30 min), água destilada (1 min), 50% etanol (1 min), 70% de etanol (1 min), 95% etanol (1 min), 100% etanol (10 min), 100% etanol / xilol (1:1 por 10 min) e xilol (20 min) (Kannangara *et al.*, 2014). Todas as lâminas foram armazenadas no escuro.

#### 4.5.8 Análise de Sholl

A quantificação do número e comprimento das ramificações dos neurônios granulares do giro denteado do hipocampo (GD) foi avaliada usando a análise de Sholl, esses parâmetros foram obtidos analisando as ramificações contidas dentro de intervalos concêntricos de 10  $\mu\text{m}$  (Gensel *et al.*, 2010). Tendo o soma como ponto de referência, foram analisados o número de intersecções por raio, a média do número total de intersecções e o comprimento do dendrito (distância máxima do soma até o final dos dendritos). Foram selecionados aleatoriamente de cada animal 5 neurônios localizados na região do GD do hipocampo, para cada grupo experimental ( $n = 4-7$  por grupo). Os neurônios com menores sobreposições com outros neurônios e com o maior número de ramificações dendríticas visíveis foram selecionados para análise. As fatias foram analisadas utilizando um Microscópio Invertido IX43 com uma

ampliação de 40×. Para a análise de Sholl, foi utilizado o *plugin* “Simple Neurite Tracer” do *software* Image J (Ferreira *et al.*, 2014), em que os dendritos dos neurônios foram manualmente traçados e a partir destes foi realizada a análise automatizada pelo *software*, criando circunferências a partir do centro do soma e obtendo uma representação em 3D do neurônio traçado, possibilitando obter a quantificação e comprimento dos prolongamentos e a intersecção deles com as circunferências geradas.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados são expressos como média + erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por meio de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias (fatores: modelo, tratamento), com medidas repetidas quando apropriado. Após efeitos de interação significativos, testes *post-hoc* foram realizados (Teste de Newman-Keuls). O tempo de latência no Teste de Esquiva Inibitória do tipo *step-down* não obedece a uma distribuição normal e não preenche completamente a suposição de homocedasticidade com a imposição de um teto para a resposta subsequente. Dessa forma, para análise dos dados contínuos de distribuição não normal, realizamos uma análise não paramétrica através do Teste de Kruskal Wallis. Para comparação dos tempos de latência de descida da sessão treino vs. o teste (medidas dependentes) envolvendo o mesmo animal, foi analisado pelo Teste da Soma de Postos de Wilcoxon, um teste não paramétrico equivalente ao teste-t pareado. O nível de significância aceito para todos os testes foi  $p \leq 0,05$ .

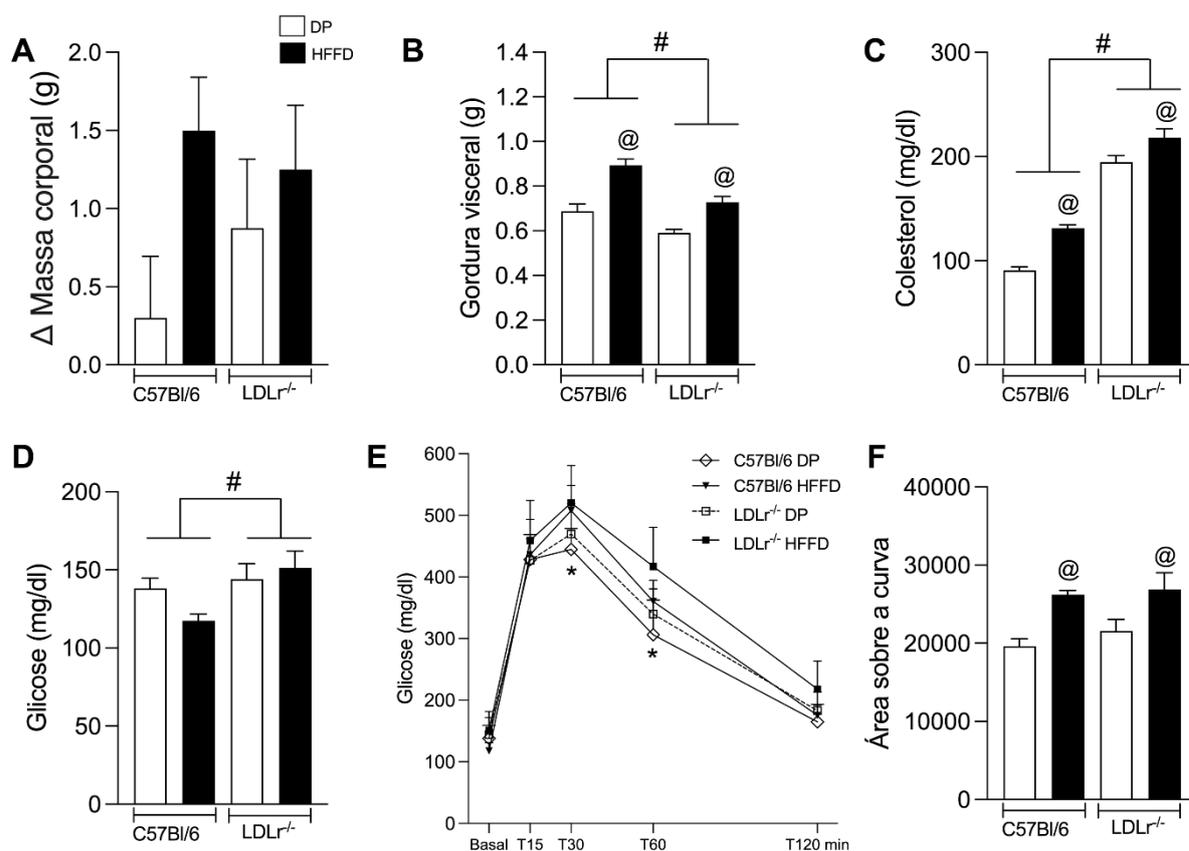
#### 4.7 RESULTADOS

Camundongos C57Bl/6 com três meses de idade foram divididos em quatro grupos experimentais: controle (dieta padrão e HFFD) e LDLr<sup>-/-</sup> (dieta padrão e HFFD). Os animais HFFD foram submetidos a uma dieta hiperlipídica (60%) e uma solução de frutose diluída na água de beber (10% p/v) por 36 dias.

Em relação à parte metabólica, a ANOVA de duas vias não indicou efeitos significativos no delta da massa corporal (Fig. 15A). No entanto, os animais alimentados com HFFD apresentaram maior concentração de gordura visceral quando comparados aos seus respectivos controles [efeito dieta  $F(1,32) = 38,36, p = 0,00000$ ]. Além disso, a ANOVA de duas

vias indicou efeitos significativos para o fator linhagem, mostrando que animais do genótipo LDLr<sup>-/-</sup> apresentam menor peso de gordura visceral quando comparados aos animais controles [F (1,32) = 22,28, p=0,00004; Fig. 15B]. Como esperado, no que diz respeito aos níveis de colesterol total, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para dieta [F (1,32) = 35,975, p=0,00000] e linhagem [F (1,32) = 320,67, p=0,00000], evidenciando que tanto os animais alimentados com HFFD, quanto os animais LDLr<sup>-/-</sup>, apresentaram aumento de colesterol plasmático quando comparado aos seus respectivos controles (Fig. 15C).

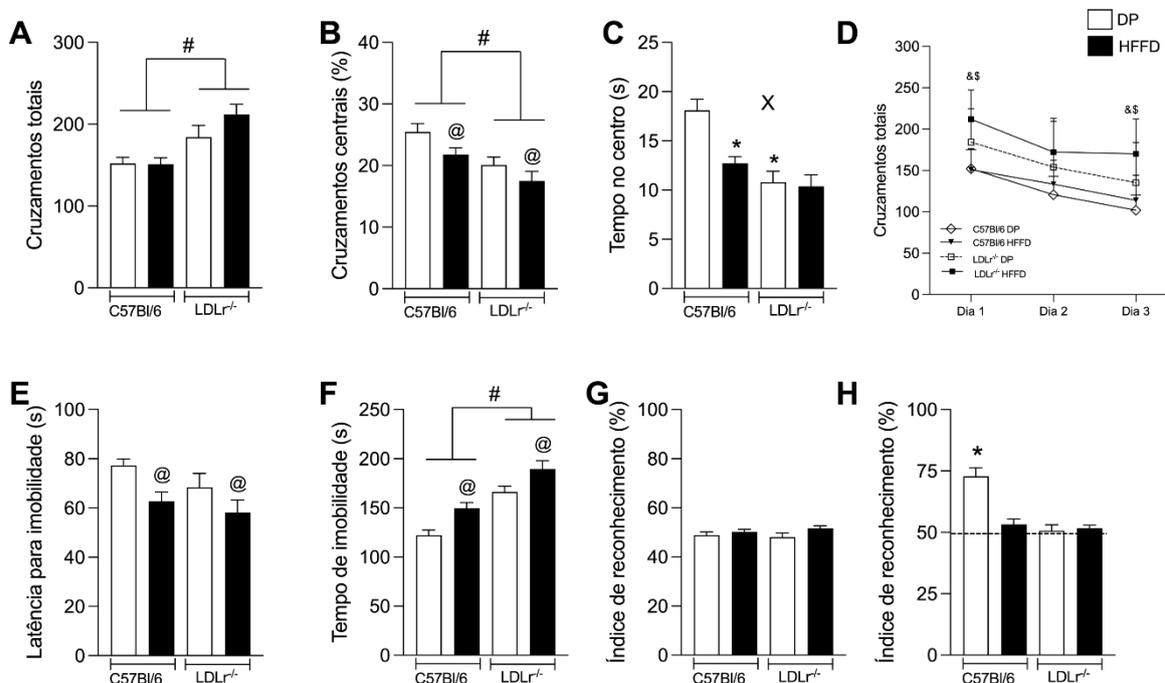
Em relação ao metabolismo da glicose, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para linhagem na glicose basal [F (1,32) = 6,37, p=0,01675], mostrando que os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentam aumento desse parâmetro quando comparado aos seus controles (Fig. 15D). No Teste de Tolerância à Glicose, a ANOVA de duas vias indicou um efeito principal para dieta [F (1,32) = 12,168, p=0,00144], linhagem [F (1,32) = 7,5765, p=0,00966], para repetição [F (4,128) = 657,11, p=0,00000], bem como para interação entre repetição e dieta [F (4,128) = 6,0993, p=0,00016]. A análise *post-hoc* entre os grupos mostrou que os animais LDLr<sup>-/-</sup> e C57Bl/6 alimentados com HFFD apresentaram maiores concentrações de glicose nos tempos 30 e 60, quando comparados com os seus respectivos controles. Ainda em relação aos parâmetros de glicose, a ANOVA de duas vias indicou efeito significativo para o fator dieta na área sob a curva [F (1,32) = 20,934, p=0,00007; Fig. 15F], indicando que esses animais apresentam dificuldade em lidar com uma carga de glicose.



**Figura 15.** Alterações metabólicas e comportamentais induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Delta da massa corporal (A), gordura visceral (B), colesterol (C), glicose basal, curva de tolerância à glicose e área sob a curva (D, E e F). Os dados são expressos como média + EPM (n = 8-10 animais por grupo). “@” denota efeito principal para dieta (p≤0,05), “#” denota efeito principal do genótipo (p≤0,05) e “\*” indica p≤0,05 vs. grupo alimentado com HFFD (ANOVA de duas vias e Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

No que se refere aos testes comportamentais, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para linhagem nos cruzamentos totais avaliados durante o Teste do Campo Aberto [F (1,32) = 19,914, p=0,00009], evidenciando que esses animais apresentam comportamento de hiperlocomção (Fig. 16A). Além disso, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para a dieta [F (1,32) = 5,5345, p=0,02496] e linhagem [F (1,32) = 12,881, p=0,00109] na redução da porcentagem de cruzamentos no centro, mostrando que tanto os animais tratados com HFFD quanto os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentam comportamento do tipo ansioso (Fig. 16B). Adicionalmente, observou-se efeito significativo para linhagem [F (1,32) = 21,568, p=0,00006], dieta [F (1,32) = 7,8633, p=0,00850] e interação entre linhagem e dieta [F (1,32) = 5,7716, p=0,02226] na redução do tempo no centro do aparato experimental. As comparações *post-hoc* subsequentes revelaram menor tempo no centro em camundongos C57Bl/6

alimentados com HFFD e em camundongos LDLr<sup>-/-</sup> com dieta padrão quando comparado ao animal controle alimentado com dieta padrão ( $p < 0,005$ ; Fig. 16C).



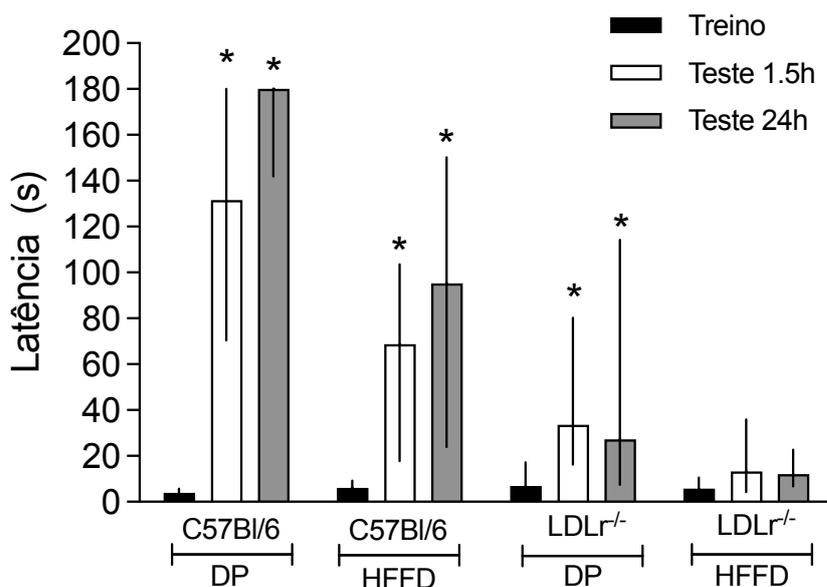
**Figura 16.** Alterações comportamentais induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Cruzamentos totais (A), % dos cruzamentos no centro (B), tempo no centro (C), habituação ao campo aberto (D), latência e tempo para a imobilidade (E e F), índice de reconhecimento no treino e no teste (G e H, respectivamente). Os dados são expressos como média + EPM (n = 8-10 animais por grupo). “@” denota efeito principal para dieta ( $p \leq 0,05$ ), “#” denota efeito principal do genótipo ( $p \leq 0,05$ ) e “\*” indica  $p \leq 0,05$  vs. C57Bl/6 dieta padrão e vs. 50% (teste-t) na figura H, “&” indica  $p \leq 0,05$  LDLr<sup>-/-</sup>-HFFD vs. C57Bl/6 DP e “\$” indica  $p \leq 0,05$  LDLr<sup>-/-</sup>-HFFD vs. C57Bl/6 HFFD. (ANOVA de duas vias e Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Ainda sobre os testes comportamentais, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para dieta [ $F(1,32) = 8,5119, p = 0,00640$ ] na latência para imobilidade (redução da latência para a primeira imobilidade) avaliada no Teste do Nado Forçado, mostrando que os animais de ambas as linhagens que foram alimentados com HFFD apresentaram indícios de comportamento do tipo depressivo. No entanto, ainda no mesmo teste, a ANOVA de duas vias indicou efeito significativo para linhagem [ $F(1,32) = 44,723, p = 0,00000$ ] e dieta [ $F(1,32) = 16,383, p = 0,00031$ ], no aumento do tempo total de imobilidade, evidenciando que tanto os animais da linhagem LDLr<sup>-/-</sup> quanto os animais alimentados com HFFD apresentaram comportamento do tipo depressivo (Fig. 16F).

Para avaliar a memória dependente de hipocampo, realizamos o Teste do Reconhecimento de Objeto. No entanto, antes do teste em si, habituamos os animais no aparato

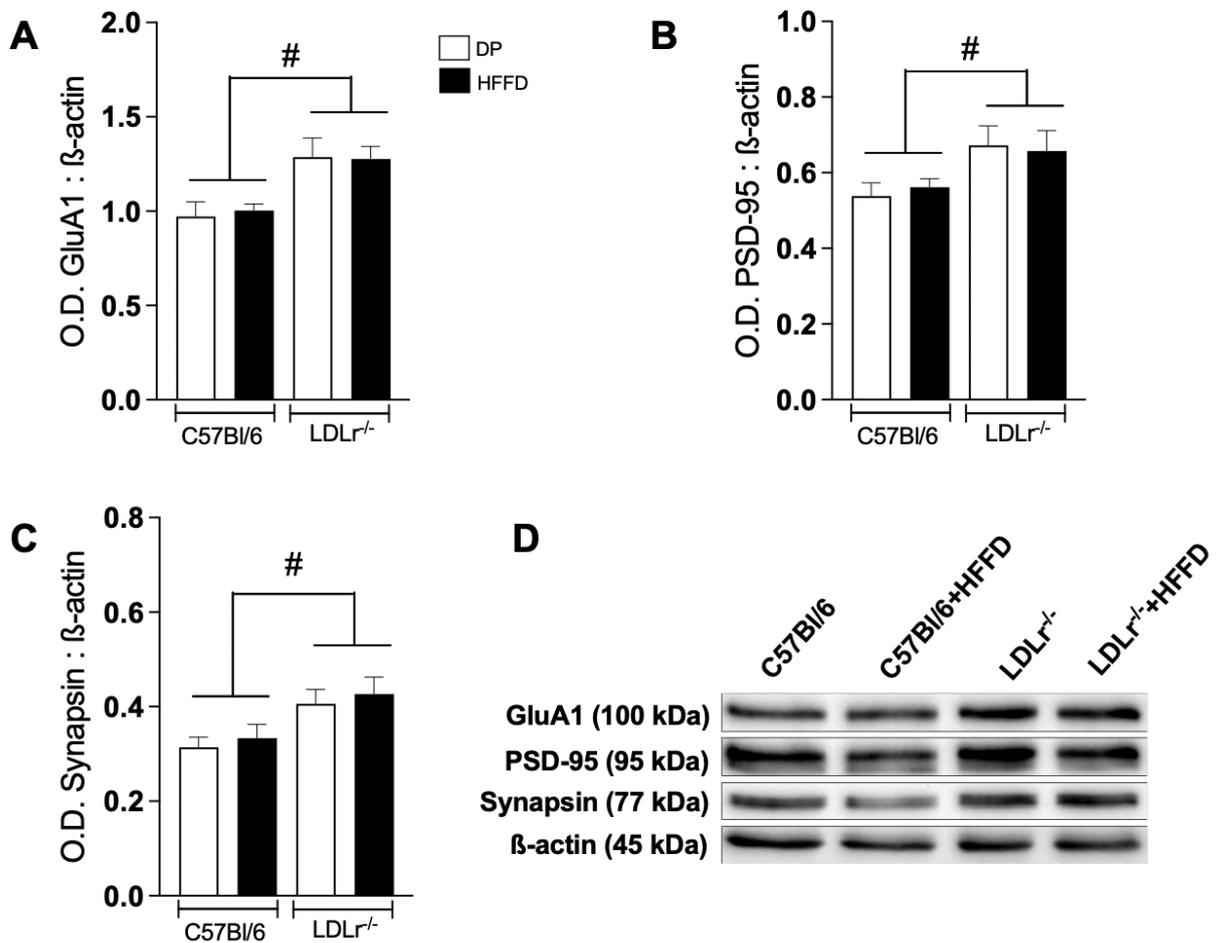
experimental para minimizar o fator novidade no contexto. Em relação à locomoção durante os três dias de habituação, a ANOVA de duas vias mostrou efeito da linhagem [ $F(1,32) = 17,778$ ,  $p=0,00019$ ] e repetição [ $F(2,64) = 38,172$ ,  $p=0,00000$ ], mostrando que os animais LDLr/- apresentaram hiperlocomoção, mas que houve habituação com o passar dos dias experimentais (Fig. 16D). A análise ponto a ponto mostrou que os animais LDLr/- alimentados com HFFD apresentaram maior locomoção quando comparados com os animais C57Bl/6 alimentados com dieta padrão e HFFD nos dias um e três ( $p<0,05$ ). Em relação ao Teste do Reconhecimento de Objeto, como mostrado na figura 16H, apenas os camundongos C57Bl/6 em dieta padrão investigaram o objeto novo por um tempo significativamente maior que o objeto não deslocado, como indicado pelo aumento significativo no índice de reconhecimento em comparação com 50% ( $t=6,627$ ,  $p<0,0001$ ), mostrando que esse foi o único grupo capaz de aprender a tarefa.

Buscando expandir a compreensão sobre os efeitos da linhagem e dieta em parâmetros de memória, realizamos o Teste da Esquiva Inibitória do tipo *step-down*. Os resultados da figura 17 mostram que tanto os animais C57Bl/6, independente da dieta, quanto os animais LDLr/- submetidos a HFFD apresentaram aprendizado no teste em ambos os períodos (1,5h e 24h de teste). No entanto, as análises estatísticas utilizando o Teste da Soma de Postos de Wilcoxon indicaram que não há diferenças estatísticas entre a latência para descida da plataforma no treino e nas sessões de teste ( $p>0,05$ ) nos camundongos LDLr/- alimentados com HFFD, tanto 1,5h quanto 24h após o treino.



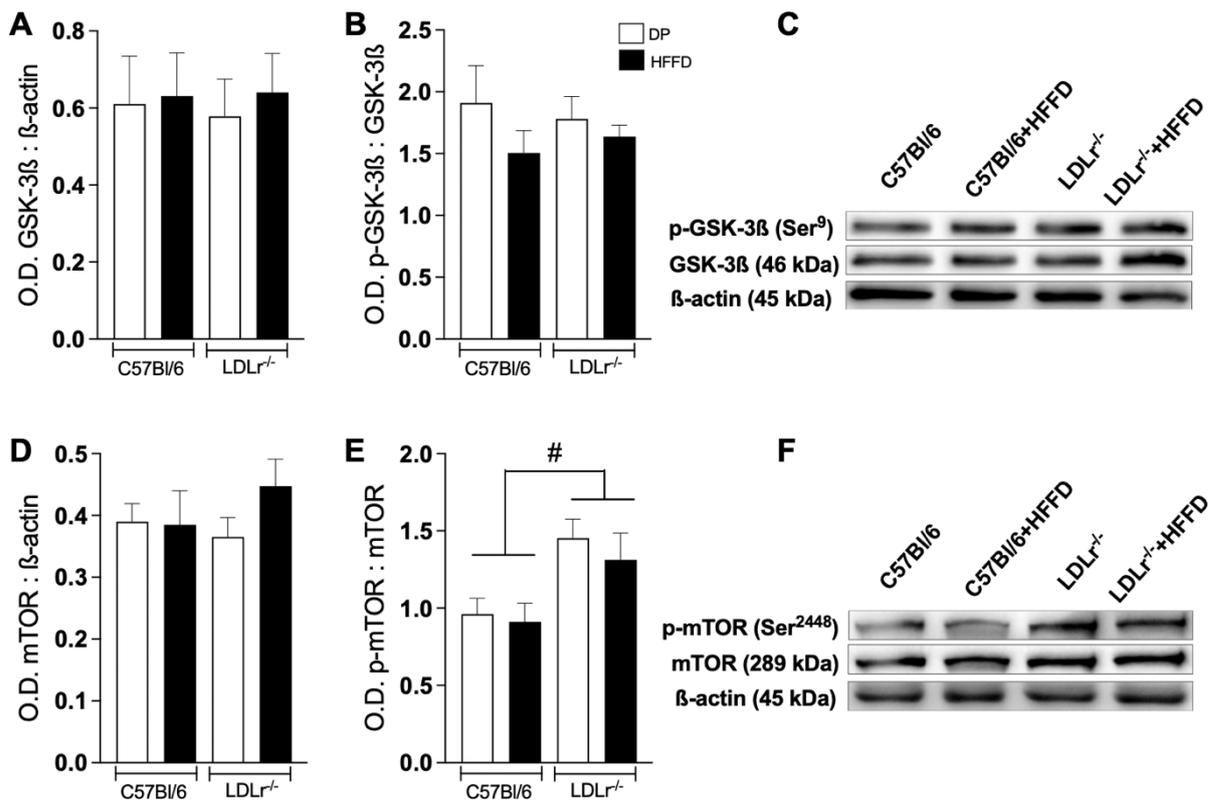
**Figura 17.** Alterações comportamentais induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Os dados são expressos como média + EPM (n = 8-10 animais por grupo). \* indica  $p \leq 0,05$  vs. as sessões de treino do mesmo grupo (Teste da Soma de Postos de Wilcoxon).

Após a bateria de testes metabólicos e comportamentais, avaliamos algumas proteínas pré-sinápticas nesses animais. Com relação a essa parte, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o fator genótipo no imunocntéudo da proteína GluA1 [ $F(1,24) = 15,75$ ,  $p = 0,0006$ ], PSD-95 [ $F(1,24) = 7,216$ ,  $p = 0,0129$ ] e Sinapsina [ $F(1,24) = 9,870$ ,  $p = 0,0044$ ], evidenciando um aumento de todas as proteínas pré-sinápticas avaliadas no presente estudo nos animais LDLr<sup>-/-</sup> (Fig. 18A, B e C).



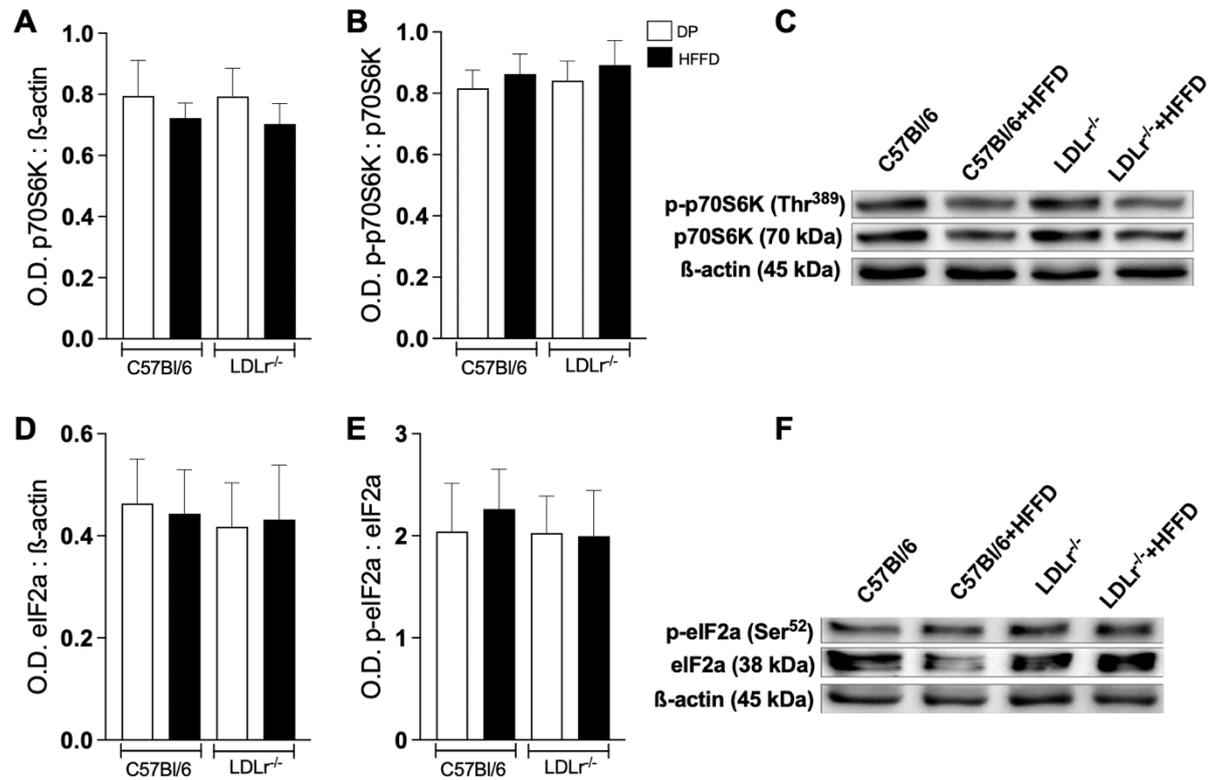
**Figura 18.** Alterações neuroquímicas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Os dados são expressos como média + EPM (n = 8 animais por grupo). Glu A1 (A), PSD-95 (B), Sinapsina (C) e as bandas representativas das três proteínas (D). “#” denota efeito principal do genótipo ( $p \leq 0,05$ ) (ANOVA de duas vias e Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Em seguida, procuramos avaliar os efeitos do genótipo e da dieta em proteínas relacionadas à cascata de síntese proteica. Em relação à GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\beta$  e mTOR, a ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significativas no imunocontéudo das proteínas. No entanto, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o fator genótipo na p-mTOR [F (1,24) = 11,30,  $p=0,0026$ ], mostrando que os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentam aumento do imunocontéudo dessa proteína (Fig. 19E).

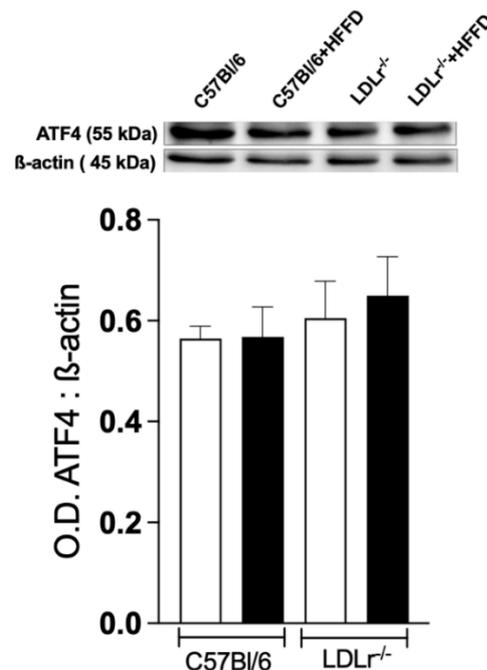


**Figura 19.** Alterações neuroquímicas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Os dados são expressos como média + EPM (n = 8 animais por grupo). GSK-3β e pGSK-3β (Ser<sup>9</sup>) (A e B), mTOR e p-mTOR (Ser<sup>2448</sup>) (D e E) e as bandas representativas das proteínas (C e F). “#” denota efeito principal do genótipo (p ≤ 0,05) (ANOVA de duas vias e Teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Buscando investigar outras proteínas importantes na via de síntese proteica, investigamos as proteínas p70S6K, p-p70S6K, eIF2a, p-eIF2a e ATF4. No entanto, a ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa no imunocntéudo de nenhuma dessas proteínas analisadas (Fig. 20 e 21).

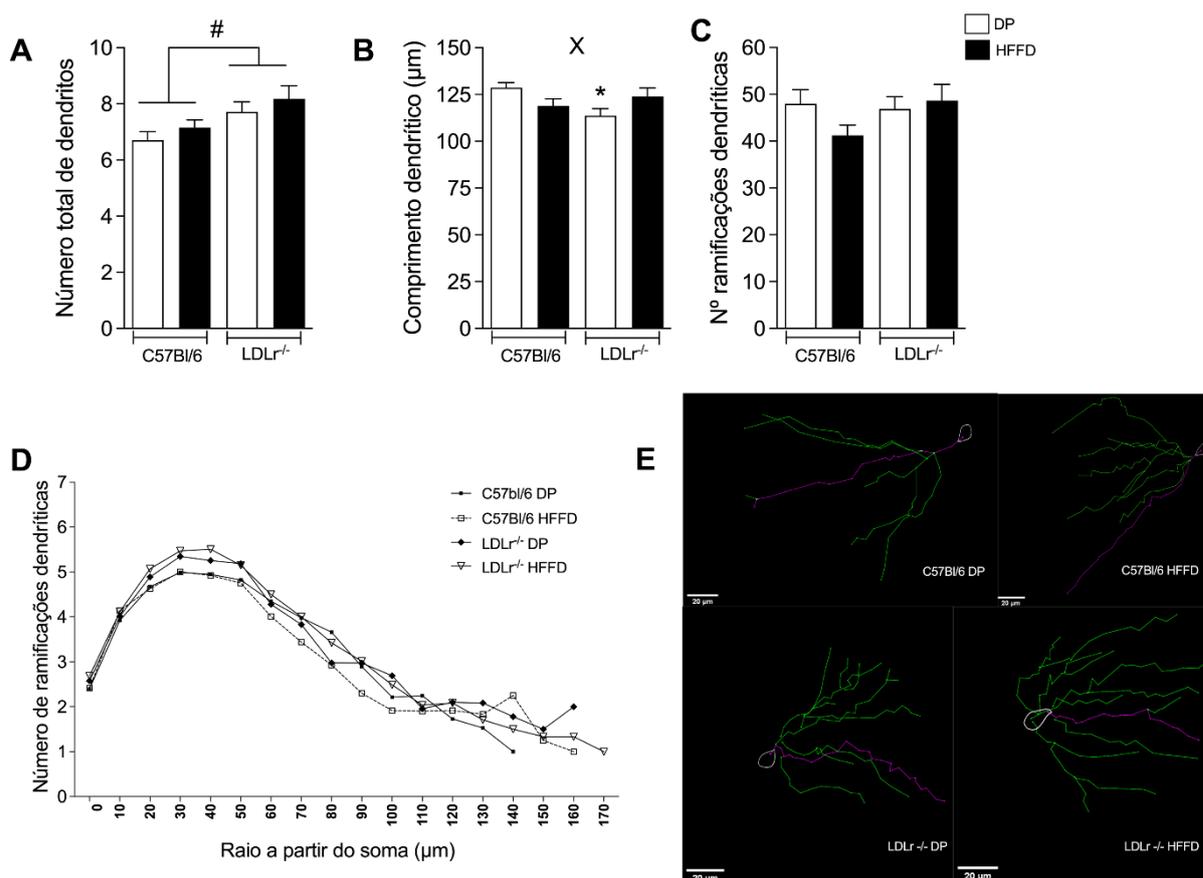


**Figura 20.** Alterações neuroquímicas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Os dados são expressos como média + EPM (n = 8 animais por grupo). p70S6K e p-p70S6K (Thr<sup>389</sup>) (A e B), eIF2a e p-eIF2a (Ser<sup>52</sup>) (D e E) e as bandas representativas das proteínas (C e F).



**Figura 21.** Alterações neuroquímicas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Os dados são expressos como média + EPM (n = 8 animais por grupo). ATF4 (A).

Para avaliar a morfologia dos neurônios localizados na região do GD do hipocampo dos roedores, foi realizada a análise de Sholl. Como observado na figura 22A, a ANOVA de duas vias mostrou que os animais da linhagem LDLr<sup>-/-</sup> apresentam um maior número total de dendritos [F (1,149) = 7,4364, p=0,00716]. Já, em relação ao comprimento total desses dendritos, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para interação entre dieta e linhagem [F (1,149) = 6,7515, p=0,01031]. Análises *post-hoc* revelaram que os animais da linhagem LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão apresentam menor comprimento dendrítico quando comparados aos animais C57Bl/6 na mesma dieta (p<0,05; Fig. 22B). Em relação ao número de ramificações dendríticas, a ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo apenas para o fator repetição [F (17,306) = 129,27, p=0,0000].



**Figura 22.** Alterações neuromorfológicas induzidas pelo tratamento com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) em camundongos C57Bl/6 selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Número total de dendritos (A), comprimento dendrítico (B), número de ramificações dendríticas (C e D) e representação de neurônios do hipocampo localizados na região do giro denteado na formação hipocampal dos camundongos (E). Os dados são expressos como média + EPM (n = 8 animais por grupo). # indica p≤0,05 vs. genótipo (ANOVA de duas vias e Teste *post-hoc* de Newman-Keuls) e \* indica p≤0,05 vs. grupo C57Bl/6 DP.

## 4.8 DISCUSSÃO

Diversos fatores são considerados para explicar o aumento significativo de problemas metabólicos observados na população mundial nos últimos quarenta anos, e dietas ricas em alimentos hipercalóricos emergem como um dos principais deles (Rakhra *et al.*, 2020). As investigações estão indo além das doenças classicamente conhecidas por estarem relacionadas com uma alimentação não saudável, como os problemas cardiovasculares, e têm avançado para a relação entre dieta e alterações comportamentais (Więckowska-Gacek *et al.*, 2021). No contexto da relação entre o colesterol e o comportamento, o interesse começou na década de 90, quando estudos sugeriram que alterações nos níveis de colesterol estavam relacionadas com mortes não naturais, incluindo suicídio (Lindberg *et al.*, 1992; Neaton *et al.*, 1992). Atualmente, disfunções envolvendo o metabolismo do colesterol têm sido associadas a uma série de doenças que acometem o SNC, como a Doença de Alzheimer, a Doença de Huntington e a Doença de Parkinson, e até mesmo aos déficits cognitivos típicos da velhice (Martín *et al.*, 2014). Subsequentes estudos, em modelos animais, buscaram avaliar as vias pelas quais o colesterol poderia gerar alguma alteração no comportamento.

No presente estudo, como esperado, os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram aumento do colesterol plasmático quando comparados ao seu respectivo controle. Além disso, os animais de ambas as linhagens submetidos à dieta hipercalórica apresentaram aumento do colesterol total quando comparados aos animais que receberam dieta padrão, bem como aumento da gordura visceral, conforme observado em outros estudos. Por exemplo, Lang *et al.* (2019) mostraram que camundongos C57Bl/6 alimentados com uma dieta rica em gordura por 11 semanas apresentaram aumento da gordura visceral, glicose e insulina em jejum, e aumento da área sob a curva avaliada no Teste de Tolerância à Glicose (GTT). Aqui, observamos que os animais de ambas as linhagens alimentados com dieta hipercalórica apresentaram aumento da área sob a curva avaliada no GTT, o que pode estar relacionado ao acúmulo da gordura visceral. Dados mecanicistas apontam que o acúmulo de tecido adiposo prejudica a função da insulina devido ao aumento da sinalização pró-inflamatória, podendo culminar na resistência a ela e, por fim, na tolerância à glicose (González-Muniesa *et al.*, 2017). Em direção similar, Ilan *et al.* (2002) mostraram que a remoção da gordura visceral previne o desenvolvimento de resistência à insulina e tolerância à glicose em ratos. Aqui, observamos que os animais LDLr<sup>-/-</sup>

apresentaram aumento das concentrações de glicose basal quando comparados à sua linhagem de controles. Surpreendentemente, até a escrita desta tese, os dados na literatura sobre parâmetros de glicose em animais LDLr<sup>-/-</sup> são escassos. Encontramos um estudo, com fêmeas, que não encontrou diferença na concentração de glicose em animais LDLr<sup>-/-</sup> quando comparados com seu controle (Magalhães *et al.*, 2024).

Nos parâmetros comportamentais, observamos que os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram aumento da locomoção no Teste do Campo Aberto. Outros dados da literatura apontam esse mesmo achado e mostram que o padrão de hiperatividade parece não ter relação com o fenótipo de comportamento do tipo ansioso (Elder *et al.*, 2008). Aqui, concordando com esses dados, os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram menor número de cruzamentos no centro quando comparados aos animais controles para a linhagem, indicando comportamento do tipo ansioso, mesmo tendo apresentado atividade hiperlocomotora. Além disso, mostramos que os animais alimentados com a dieta rica em gordura e frutose (HFFD) apresentam redução na latência e no tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado, sugerindo um fenótipo do tipo depressivo.

O perfil do tipo depressivo é conhecido nos animais LDLr<sup>-/-</sup> (Engel *et al.*, 2016). No entanto, até o momento da escrita desta tese, o perfil do tipo ansioso foi pouco analisado na literatura. Uma das únicas investigações foi um trabalho de conclusão de curso no qual a autora investigou o perfil do tipo ansioso em animais LDLr<sup>-/-</sup> machos e fêmeas, e encontrou dados mostrando redução desse comportamento em animais LDLr<sup>-/-</sup>, em especial nas fêmeas, nos testes do labirinto em cruz elevado e no teste de enterrar esferas. Em machos, no Teste do Campo Aberto, não houve diferença significativa quando comparado à linhagem controle (Pinho, 2021). No que diz respeito ao perfil do tipo depressivo, Vagena *et al.* (2019) mostraram que animais C57Bl/6 alimentados com uma dieta rica em gordura (60%) por três ou oito semanas apresentaram comportamento do tipo depressivo no Teste de Suspensão pela Cauda. Adicionalmente, Engel *et al.* (2016) mostraram que os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentam comportamento do tipo depressivo, o que parece estar associado à atividade aumentada das enzimas monoaminaoxidase A e B, enzimas que degradam monoaminas.

Além desses achados, mostramos que tanto os animais alimentados com HFFD quanto os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram déficit de memória no Teste de Memória Dependente de Hipocampo. Estatisticamente, nenhum animal, exceto os do grupo controle, apresentou diferença no reconhecimento do objeto novo. Dados anteriores do nosso grupo mostraram resultados semelhantes. Por exemplo, Moreira *et al.* (2012) mostraram que animais LDLr<sup>-/-</sup>

apresentam déficit de memória dependente de hipocampo, que parece estar associado ao aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase. Além disso, Braga *et al.* (2021) mostraram que uma dieta hipercalórica (60% de gordura saturada) resulta em prejuízos comportamentais que pioram conforme o tempo de exposição à dieta. Buscando avançar na compreensão sobre os efeitos da dieta e genótipo em parâmetros de memória, observamos, no Teste de Esquiva Inibitória, ausência de aprendizado apenas no grupo LDLr<sup>-/-</sup> alimentado com HFFD. Olhando para a literatura, Jahrling *et al.* (2018) mostraram que animais LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com uma dieta rica em gordura por vinte semanas apresentam níveis cerebrais de interleucina-6 e sérico de Amiloide A aumentados, ambos indicativos de inflamação, quando comparados com animais LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com dieta padrão.

Argumentamos que a presença de prejuízo de memória apenas no grupo LDLr<sup>-/-</sup> alimentado com a HFFD pode ser devido ao aumento do prejuízo neurofisiológico gerado pela associação do genótipo e da exposição a HFFD, tal como ocorre em desfechos cardiovasculares, nos quais pacientes com HF e hábitos não saudáveis apresentam mais risco de desfechos desfavoráveis (Goldstein *et al.*, 2015; Krogh *et al.*, 2016; Borén *et al.*, 2020). Em termos cognitivos, por exemplo, Zambón *et al.* (2011) mostraram que pacientes com HF apresentaram maior incidência de comprometimento cognitivo leve em comparação com aqueles sem hipercolesterolemia familiar (21,3% vs. 2,9%), e que o nível de colesterol foi independentemente associado a piores pontuações em um teste cognitivo que avalia a atenção. Esses achados sugerem que a presença do genótipo, junto a um estilo de vida não saudável, pode exacerbar os efeitos deletérios da hipercolesterolemia. Ademais, ressaltamos que os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentaram hiperlocomção no Teste do Campo Aberto, o que pode influenciar na descida da plataforma no Teste de Esquiva Inibitória.

Em termos neuroquímicos, nossa hipótese era de que os prejuízos comportamentais observados estariam associados com prejuízos neuroquímicos. Dados da literatura mostram, por exemplo, que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> com seis e treze meses de idade apresentam um número reduzido de botões pré-sinápticos imunorreativos à sinaptofisina no hipocampo (Mulder *et al.*, 2004, 2007). Em nosso estudo, no entanto, observamos aumento do conteúdo de proteínas pré-sinápticas, como a GluA1, PSD-95 e sinapsina. Suspeitamos que a diferença de idade entre os animais do nosso estudo e dos estudos do Mulder e colaboradores podem explicar a diferença dos resultados. Por outro lado, em sua tese de doutorado, Olescowicz (2021) mostrou que os animais LDLr<sup>-/-</sup> machos e fêmeas não apresentam diferenças no

imunocontéudo da PSD-95 quando comparado aos seus respectivos controles. No cérebro, o receptor de colesterol transcende a função de detectar o nível de colesterol circulante e está envolvido em diversos processos fundamentais para o bom funcionamento cerebral em desenvolvimento e adulto, desde o tráfico de lipoproteínas até a plasticidade sináptica e a migração e desenvolvimento celular (Dietschy, 2009; Pfrieger; Ungerer, 2011; Lane-Donovan *et al.*, 2014).

Em células neuronais, evidências indicam que mudanças na concentração de colesterol na membrana podem gerar alterações no funcionamento neuronal, como redução da probabilidade de abertura de canais NMDA, impactando, portanto, as sinapses excitatórias (Korinek *et al.*, 2015). Além disso, Mauch *et al.* (2001) mostraram que o colesterol é fundamental para o funcionamento neuronal, já que os neurônios parecem produzir colesterol suficiente para sobreviver, diferenciar axônios e dendritos e formar algumas sinapses ineficientes, porém a formação maciça de sinapses pode exigir colesterol adicional (que supostamente é entregue pelos astrócitos). Não é surpreendente que períodos de maior desenvolvimento neuronal coincidam temporalmente com aumento da síntese de colesterol no cérebro (Dietschy, 2009), indicando o papel desta molécula na sinaptogênese.

Além disso, Korinek *et al.* (2015) mostraram que a depleção do colesterol resultou em uma redução significativa dos receptores NMDA (NMDAR) e das correntes pós-sinápticas excitatórias em culturas de neurônios hipocámpais de ratos. Dados os potenciais efeitos do colesterol na sinaptogênese, hipotetizamos que o aumento da expressão de GluA1 e PSD-95 pode estar relacionado ao aumento do colesterol gerado pela deleção do receptor LDL, mas novos estudos são necessários para confirmar e entender essa relação, bem como avaliar os níveis de colesterol cerebral desses animais. No mesmo sentido, evidências apontam que o colesterol parece ser importante para a biogênese de vesículas sinápticas (Thiele *et al.*, 2000), e a hipercolesterolemia potencialmente poderia explicar o aumento do imunocontéudo da sinaptofisina.

Além disso, no presente estudo, observamos aumento da fosforilação da mTOR no sítio serina 2448 nos animais genótipo LDLr<sup>-/-</sup>. Classicamente, a mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*) é uma proteína conhecida por suas funções cruciais em mamíferos, que vão desde a síntese proteica até a autofagia. Dada a extensão de suas funções, desregulações na sinalização da mTOR têm sido observadas em diferentes patologias, como câncer, diabetes, doenças imunológicas e neurodegenerativas (Saxton; Sabatini, 2017). Classicamente, a

fosforilação do sítio serina 2448 é usada como indicativo do aumento da atividade da mTOR em estudos que visam avaliar tal via (Guertin; Sabatini, 2007; Rivas *et al.*, 2009). No entanto, no presente estudo, observamos que os animais genótipo LDLr<sup>-/-</sup> não apresentaram aumento da atividade da mTOR, mesmo com aumento da fosforilação do sítio serina 2448.

Mais recentemente, tem-se criticado o papel do sítio serina 2448 como indicador da atividade da mTOR. Por exemplo, em uma extensa revisão acerca dos marcadores de atividade da mTOR, Figueiredo *et al.* (2017) sugerem que o sítio serina 2448 é uma medida inadequada para avaliar a atividade da mTOR. Ainda, os autores defendem que a análise preferencial da ativação de mTOR deve se concentrar nas proteínas a jusante e efetoras, como a p70S6K e 4E-BP1. Nesse sentido, nossos dados não mostram diferença significativa no imunoconteúdo da p70S6K na forma normal e fosforilada, sugerindo, portanto, que a mTOR não apresentou diferença em sua atividade. Além disso, Jahrling *et al.* (2018) mostram que animais LDLr<sup>-/-</sup> não apresentaram atividade alterada da mTOR, corroborando nossos achados.

Adicionalmente, observamos que os animais de genótipo LDLr<sup>-/-</sup> alimentados com ambas as dietas apresentaram aumento do número total de dendritos. Esses dados morfológicos podem ajudar a explicar os dados neuroquímicos, na medida em que a presença de mais dendritos pode implicar o aumento do imunoconteúdo das proteínas pré-sinápticas, observado nos animais de genótipo LDLr<sup>-/-</sup>. Embora seja bem conhecido que a complexidade da arborização dendrítica tem efeito importante no comportamento e na cognição (Cochran *et al.*, 2013), nossos dados morfológicos contradizem os dados comportamentais. Especulamos que o aumento no número de dendritos em animais LDLr<sup>-/-</sup> possa ser um mecanismo compensatório frente a prejuízos na formação de novos neurônios ou mesmo de sinapses menos eficientes observadas nesses animais. Por exemplo, Engel *et al.* (2019) mostraram que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> com três meses de idade apresentam menor número de células precursoras em proliferação no hipocampo do que camundongos C57Bl/6 da mesma idade. Além disso, de Oliveira *et al.* (2020) reportaram que camundongos LDLr<sup>-/-</sup> apresentam aumento da imunorreatividade da caspase-3, enzima envolvida na apoptose celular, podendo colaborar para a redução do número de neurônios.

Ademais, em sua tese de doutorado, Olescowicz (2021) mostrou que os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentam redução no potencial excitatório pós-sináptico, evento que precede a potenciação de longa-duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*), fenômeno fundamental para a formação de novas memórias (Izquierdo *et al.*, 2008). Aqui, levantamos a hipótese de que os

comportamentais observados nos animais LDLr<sup>-/-</sup> possam ser resultado dos prejuízos que vão além da complexidade da arborização dendrítica e dos marcadores pré-sinápticos, como a neuroinflamação (Tsai *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2023), redução da neurogênese (Engel *et al.*, 2019), aumento do estresse oxidativo (Moreira *et al.*, 2012), prejuízo na sinalização colinérgica (Moreira *et al.*, 2012), entre outros.

Coletivamente, nossos resultados reproduzem dados prévios da literatura, mostrando que a presença da hipercolesterolemia implica disfunções comportamentais que provavelmente estão associadas a alterações cerebrais. No presente estudo, mostramos que, embora seja conhecido que a hipercolesterolemia resulta em diversos prejuízos neuroquímicos, não foram observadas disfunções morfológicas em neurônios hipocámpais de camundongos nocautes para o receptor LDLr<sup>-/-</sup>. Mais estudos são necessários para entender a relação entre hipercolesterolemia e alterações morfológicas nos neurônios.

## 5 CONCLUSÃO GERAL DA TESE

- Animais alimentados com dieta rica em gordura saturada e frutose (HFFD) apresentam diversas disfunções metabólicas e comportamentais.
- O tratamento com metformina foi capaz de reverter o aumento de alodinia mecânica e a diminuição do comportamento de autocuidado nos animais tratados com STZ.
- O tratamento com metformina reverteu o aumento de peso, aumento do colesterol, intolerância à glicose e comportamento do tipo depressivo em animais alimentados com HFFD.
- O tratamento com o extrato aquoso da *C. verticillata*, popularmente conhecida como insulina vegetal, não apresentou efeitos, em diferentes doses, na glicose dos animais tratados com STZ ou alimentados com HFFD.
- O tratamento com o extrato aquoso da *C. verticillata* aumentou o comportamento de autocuidado em animais tratados com STZ.
- O tratamento com o extrato aquoso da *C. verticillata* apresentou efeito antialodínico em animais tratados com STZ e HFFD, sugerindo efeito por vias alternativas à glicose.
- Animais nocautes para o receptor LDL (LDLr<sup>-/-</sup>) apresentam déficits cognitivos e comportamentais, como problemas na memória dependente de hipocampo e comportamento do tipo depressivo.
- Animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentam aumento do imunoconteúdo de proteínas sinápticas, como a PSD-96, GluA1 e Sinapsina.
- Animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentam aumento no número total de dendritos.

Em conclusão, os resultados do presente estudo permitem observar a influência de diferentes desregulações metabólicas em parâmetros de memória, comportamentais,

neuroquímicos e neuromorfológicos em camundongos. Além disso, este conjunto de dados mostra que as influências de disfunções metabólicas periféricas no Sistema Nervoso Central não são bem compreendidas e encoraja novos estudos que investiguem intervenções no metabolismo periférico como estratégia protetora/terapêutica contra prejuízos cerebrais.

## REFERÊNCIAS

- Abbott CA, Malik RA, van Ross ER, Kulkarni J, Boulton AJ. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. *Diabetes Care*. 2011 Oct;34(10):2220-4. doi: 10.2337/dc11-1108. Epub 2011 Aug 18. PMID: 21852677; PMCID: PMC3177727.
- Abdallah N, Rajkumar SV, Greipp P, Kapoor P, Gertz MA, Dispenzieri A, Baughn LB, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Dingli D, Go RS, Hwa YL, Fonder A, Hobbs M, Lin Y, Leung N, Kourelis T, Warsame R, Siddiqui M, Lust J, Kyle RA, Bergsagel L, Ketterling R, Kumar SK. Cytogenetic abnormalities in multiple myeloma: association with disease characteristics and treatment response. *Blood Cancer J*. 2020 Aug 11;10(8):82. doi: 10.1038/s41408-020-00348-5. PMID: 32782240; PMCID: PMC7419564.
- Ai H, Fang W, Hu H, Hu X, Lu W. Antidiabetic Drug Metformin Ameliorates Depressive-Like Behavior in Mice with Chronic Restraint Stress via Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *Aging Dis*. 2020 Feb 1;11(1):31-43. doi: 10.14336/AD.2019.0403. PMID: 32010479; PMCID: PMC6961762.
- Allaman I., Bélanger M., Magistretti P. J. 2015. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 23. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00023>.
- An, F., Yang, G., Tian, J., & Wang, S. (2012). Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice. *Neural Regen Res*, 7(33), 2565-2575. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.33.001>.
- Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*. 2001 Jun;24(6):1069-78. doi: 10.2337/diacare.24.6.1069. PMID: 11375373.
- Andersson, D.A., Gentry, C., Light, E., Vastani, N., Vallortigara, J., Bierhaus, A., Fleming, T., Bevan, S. 2013. Methylglyoxal evokes pain by stimulating TRPA1. *PLoS One*, 8(12), e77986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077986>.
- Anstey KJ, Ashby-Mitchell K, Peters R. Updating the Evidence on the Association between Serum Cholesterol and Risk of Late-Life Dementia: Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*. 2017;56(1):215-228. doi: 10.3233/JAD-160826. PMID: 27911314; PMCID: PMC5240556.
- Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001 Jul 21;358(9277):221-9. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05415-0. Erratum in: *Lancet*. 2001 Sep 1;358(9283):766. PMID: 11476858.
- Attuquayefio T, Stevenson RJ, Oaten MJ, Francis HM. A four-day Western-style dietary intervention causes reductions in hippocampal-dependent learning and memory and interoceptive sensitivity. *PLoS One*. 2017 Feb 23;12(2):e0172645. doi: 10.1371/journal.pone.0172645. PMID: 28231304; PMCID: PMC5322971.

Baeza-Flores GDC, Guzmán-Priego CG, Parra-Flores LI, Murbartían J, Torres-López JE, Granados-Soto V. Metformin: A Prospective Alternative for the Treatment of Chronic Pain. *Front Pharmacol.* 2020 Sep 23;11:558474. doi: 10.3389/fphar.2020.558474. PMID: 33178015; PMCID: PMC7538784.

Bagaméry F, Varga K, Kecsmár K, Vincze I, Szökő É, Tábi T. The Impact of Differentiation on Cytotoxicity and Insulin Sensitivity in Streptozotocin Treated SH-SY5Y Cells. *Neurochem Res.* 2021 Jun;46(6):1350-1358. doi: 10.1007/s11064-021-03269-2. Epub 2021 Feb 22. PMID: 33616807; PMCID: PMC8084777.

Bagdas D, Gul Z, Meade JA, Cam B, Cinkilic N, Gurun MS. Pharmacologic Overview of Chlorogenic Acid and its Metabolites in Chronic Pain and Inflammation. *Curr Neuropharmacol.* 2020;18(3):216-228. doi: 10.2174/1570159X17666191021111809. PMID: 31631820; PMCID: PMC7327949.

Barbosa W. L. R., Santos W. R. A., Pinto L. N., Tavares I. C. C., 2002. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12(Suppl. 1), 13-15. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300007>.

Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011. PMID: 22593937.

Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S, Leffler A, *et al.* Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nat Med.* 2012 Jun;18(6):926-33. doi: 10.1038/nm.2750. Erratum in: *Nat Med.* 2012 Sep;18(9):1445. Lasischka, Felix [corrected to Lasitschka, Felix]. PMID: 22581285.

Bindu Jacob, Narendhirakannan R T. Role of medicinal plants in the management of diabetes mellitus: a review. *3 Biotech.* 2019 Jan;9(1):4. doi: 10.1007/s13205-018-1528-0. Epub 2018 Dec 12. PMID: 30555770; PMCID: PMC6291410.

Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 2019 May;15(5):288-298. doi: 10.1038/s41574-019-0176-8. PMID: 30814686.

Bomfim TR, Forny-Germano L, Sathler LB, Brito-Moreira J, Houzel JC, Decker H, Silverman MA, Kazi H, Melo HM, McClean PL, Holscher C, Arnold SE, Talbot K, Klein WL, Munoz DP, Ferreira ST, De Felice FG. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers. *J Clin Invest.* 2012 Apr;122(4):1339-53. doi: 10.1172/JCI57256. PMID: 22476196; PMCID: PMC3314445.

Borén J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, Daemen MJ, Demer LL, Hegele RA, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, Watts GF, Bruckert E, Fazio S, Ference BA, Graham I, Horton JD, Landmesser U, Laufs U, Masana L, Pasterkamp G, Raal FJ, Ray KK, Schunkert H, Taskinen MR, van de Sluis B, Wiklund O, Tokgozoglul, Catapano AL, Ginsberg HN. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the

European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2020 Jun 21;41(24):2313-2330. doi: 10.1093/eurheartj/ehz962. PMID: 32052833; PMCID: PMC7308544.

Braga SP, Delanogare E, Machado AE, Prediger RD, Moreira ELG. Switching from high-fat feeding (HFD) to regular diet improves metabolic and behavioral impairments in middle-aged female mice. *Behav Brain Res.* 2021 Feb 1;398:112969. doi: 10.1016/j.bbr.2020.112969. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33075395.

Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Fini, A., Pollastri, S., Tattini, M. 2013. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3540-3555. <https://doi.org/10.3390/ijms14023540>.

Bruno K, Woller SA, Miller YI, Yaksh TL, Wallace M, Beaton G, Chakravarthy K. Targeting toll-like receptor-4 (TLR4)-an emerging therapeutic target for persistent pain states. *Pain.* 2018 Oct;159(10):1908-1915. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001306. PMID: 29889119; PMCID: PMC7890571.

Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The mouse forced swim test. *J Vis Exp.* 2012 Jan 29;(59):e3638. doi: 10.3791/3638. PMID: 22314943; PMCID: PMC3353513.

Cavaliere G, Trinchese G, Penna E, Cimmino F, Pirozzi C, Lama A, Annunziata C, Catapano A, Mattace Raso G, Meli R, Monda M, Messina G, Zammit C, Crispino M, Mollica MP. High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. *Front Cell Neurosci.* 2019 Nov 12;13:509. doi: 10.3389/fncel.2019.00509. PMID: 31798417; PMCID: PMC6861522.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 1994 Jul;53(1):55-63. doi: 10.1016/0165-0270(94)90144-9. PMID: 7990513.

Chowdhury SK, Smith DR, Fernyhough P. The role of aberrant mitochondrial bioenergetics in diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis.* 2013 Mar;51:56-65. doi: 10.1016/j.nbd.2012.03.016. Epub 2012 Mar 9. PMID: 22446165.

Choy, K.W., Murugan, D., Leong, X.F., Abas, R., Alias, A., Mustafa, M.R. 2019. Flavonoids as natural anti-inflammatory agents targeting nuclear factor-kappa B (NFκB) signaling in cardiovascular diseases: A mini review. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1295. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01295>.

Clifford, M.N. Review Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, 79, 362-372. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1033::AID-JSFA595>3.0.CO;2-T

Cochran JN, Hall AM, Roberson ED. The dendritic hypothesis for Alzheimer's disease pathophysiology. *Brain Res Bull.* 2014 Apr;103:18-28. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.12.004. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24333192; PMCID: PMC3989444.

Cooper CB, Neufeld EV, Dolezal BA, Martin JL. Sleep deprivation and obesity in adults: a brief narrative review. *BMJ Open Sport Exerc Med*. 2018 Oct 4;4(1):e000392. doi: 10.1136/bmjsem-2018-000392. PMID: 30364557; PMCID: PMC6196958.

Cornélio AM, de Bittencourt-Navarrete RE, de Bittencourt Brum R, Queiroz CM, Costa MR. Human Brain Expansion during Evolution Is Independent of Fire Control and Cooking. *Front Neurosci*. 2016 Apr 25;10:167. doi: 10.3389/fnins.2016.00167. PMID: 27199631; PMCID: PMC4842772.

Crane PK, Walker R, Hubbard RA, Li G, Nathan DM, Zheng H, Haneuse S, Craft S, Montine TJ, Kahn SE, McCormick W, McCurry SM, Bowen JD, Larson EB. Glucose levels and risk of dementia. *N Engl J Med*. 2013 Aug 8;369(6):540-8. doi: 10.1056/NEJMoa1215740. Erratum in: *N Engl J Med*. 2013 Oct 10;369(15):1476. PMID: 23924004; PMCID: PMC3955123.

Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom*. 2004 Jan;39(1):1-15. doi: 10.1002/jms.585. Erratum in: *J Mass Spectrom*. 2004 Apr;39(4):461. PMID: 14760608.

Davidson M, Rashidi N, Nurgali K, Apostolopoulos V. The Role of Tryptophan Metabolites in Neuropsychiatric Disorders. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 1;23(17):9968. doi: 10.3390/ijms23179968. PMID: 36077360; PMCID: PMC9456464.

De Beer, D., Schulze, A.E., Joubert, E., De Villiers, A., Malherbe, C.J., Stander, M.A. 2012. Food ingredient extracts of *Cyclopia subternata* (Honeybush): variation in phenolic composition and antioxidant capacity. *Molecules*, 17, 14602-14624. <https://doi.org/10.3390/molecules171214602>.

de Oliveira J, Engel DF, de Paula GC, Melo HM, Lopes SC, Ribeiro CT, Delanogare E, Moreira JCF, Gelain DP, Prediger RD, Gabilan NH, Moreira ELG, Ferreira ST, de Bem AF. LDL Receptor Deficiency Does not Alter Brain Amyloid- $\beta$  Levels but Causes an Exacerbation of Apoptosis. *J Alzheimers Dis*. 2020;73(2):585-596. doi: 10.3233/JAD-190742. PMID: 31815695.

de Oliveira J, Moreira ELG, de Bem AF. Beyond cardiovascular risk: Implications of Familial hypercholesterolemia on cognition and brain function. *Ageing Res Rev*. 2024 Jan;93:102149. doi: 10.1016/j.arr.2023.102149. Epub 2023 Dec 4. PMID: 38056504.

de Souza RM, de Souza L, Machado AE, de Bem Alves AC, Rodrigues FS, Aguiar AS Jr, Dos Santos ARS, de Bem AF, Moreira ELG. Behavioural, metabolic and neurochemical effects of environmental enrichment in high-fat cholesterol-enriched diet-fed mice. *Behav Brain Res*. 2019 Feb 1;359:648-656. doi: 10.1016/j.bbr.2018.09.022. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30287273.

De Souza e Neto. ASPECTOS BOTÂNICOS E DE USOS DE *Cissus verticillata* (L.) Nicholson & C. E. Jarvis (VITACEAE): INSULINA-VEGETAL. *Revista UFMT*, 2009.

DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, Hu FB, Kahn CR, Raz I, Shulman GI, Simonson DC, Testa MA, Weiss R. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Jul 23;1:15019. doi: 10.1038/nrdp.2015.19. PMID: 27189025.

Dias FC, Alves VS, Matias DO, Figueiredo CP, Miranda ALP, Passos GF, Costa R. The selective TRPV4 channel antagonist HC-067047 attenuates mechanical allodynia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol*. 2019 Aug 5;856:172408. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172408. Epub 2019 May 24. PMID: 31129158.

Didangelos T, Doupis J, Veves A. Painful diabetic neuropathy: clinical aspects. *Handb Clin Neurol*. 2014;126:53-61. doi: 10.1016/B978-0-444-53480-4.00005-9. PMID: 25410214.

Dietschy JM. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem*. 2009 Apr;390(4):287-93. doi: 10.1515/BC.2009.035. PMID: 19166320; PMCID: PMC3066069.

Drel VR, Mashtalir N, Ilnytska O, Shin J, Li F, Lyzogubov VV, Obrosova IG. The leptin-deficient (*ob/ob*) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*. 2006 Dec;55(12):3335-43. doi: 10.2337/db06-0885. PMID: 17130477.

Drobnik J, de Oliveira AB. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson and C.E. Jarvis (Vitaceae): Its identification and usage in the sources from 16th to 19th century. *J Ethnopharmacol*. 2015 Aug 2;171:317-29. doi: 10.1016/j.jep.2015.06.003. Epub 2015 Jun 11. PMID: 26074377.

Du MR, Gao QY, Liu CL, Bai LY, Li T, Wei FL. Exploring the Pharmacological Potential of Metformin for Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2022 Apr 26;14:838173. doi: 10.3389/fnagi.2022.838173. PMID: 35557834; PMCID: PMC9087341.

Ducat L, Philipson LH, Anderson BJ. The mental health comorbidities of diabetes. *JAMA*. 2014 Aug 20;312(7):691-2. doi: 10.1001/jama.2014.8040. PMID: 25010529; PMCID: PMC4439400.

Düll, M. M., Riegel, K., Tappenbeck, J., Ries, V., Strupf, M., Fleming, T., Sauer, S. K., & Namer, B. 2019. Methylglyoxal causes pain and hyperalgesia in humans through C-fiber activation. *Pain*, 160(11), 2497-2507. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001644>.

Dunsworth, H.M. Origin of the Genus *Homo* . *Evo Edu Outreach* 3, 353–366 (2010). <https://doi.org/10.1007/s12052-010-0247-8>

Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2016 Oct;112:4-29. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.021. Epub 2016 Jan 23. PMID: 26812486.

El-Seedi, H.R.; El-Said, A.M.; Khalifa, S.; Göransson, U.; Bohlin, L.; Borg-Karlson, A.K.; Verpoorte, R. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 10877-10895. doi:10.1021/jf301807g

Elder GA, Ragnauth A, Dorr N, Franciosi S, Schmeidler J, Haroutunian V, Buxbaum JD. Increased locomotor activity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. *Behav Brain Res.* 2008 Aug 22;191(2):256-65. doi: 10.1016/j.bbr.2008.03.036. Epub 2008 Apr 8. PMID: 18466986; PMCID: PMC4662864.

Elzinga SE, Henn R, Murdock BJ, Kim B, Hayes JM, Mendelson F, Webber-Davis I, Teener S, Pacut C, Lentz SI, Feldman EL. cGAS/STING and innate brain inflammation following acute high-fat feeding. *Front Immunol.* 2022 Sep 29;13:1012594. doi: 10.3389/fimmu.2022.1012594. PMID: 36248795; PMCID: PMC9556783.

Engel DF, de Oliveira J, Lopes JB, Santos DB, Moreira ELG, Farina M, Rodrigues ALS, de Souza Brocardo P, de Bem AF. Is there an association between hypercholesterolemia and depression? Behavioral evidence from the LDLr(-/-) mouse experimental model. *Behav Brain Res.* 2016 Sep 15;311:31-38. doi: 10.1016/j.bbr.2016.05.029. Epub 2016 May 13. PMID: 27185735.

Engel DF, Grzyb AN, de Oliveira J, *et al.* Impaired adult hippocampal neurogenesis in a mouse model of familial hypercholesterolemia: a role for the LDL receptor and cholesterol metabolism in adult neural precursor cells. *Mol Metab.* 2019;30:1-15.

Engum A. The role of depression and anxiety in onset of diabetes in a large population-based study. *J Psychosom Res.* 2007 Jan;62(1):31-8. doi: 10.1016/j.jpsychores.2006.07.009. PMID: 17188118.

Fang W, Zhang J, Hong L, Huang W, Dai X, Ye Q, Chen X. Metformin ameliorates stress-induced depression-like behaviors via enhancing the expression of BDNF by activating AMPK/CREB-mediated histone acetylation. *J Affect Disord.* 2020 Jan 1;260:302-313. doi: 10.1016/j.jad.2019.09.013. Epub 2019 Sep 3. PMID: 31521867.

Farr SA, Roesler E, Niehoff ML, Roby DA, McKee A, Morley JE. Metformin Improves Learning and Memory in the SAMP8 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2019;68(4):1699-1710. doi: 10.3233/JAD-181240. PMID: 30958364.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2021. Disponível em: <https://idf.org/about-diabetes/diabetes-facts-figures/>

Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, Bril V, Russell JW, Viswanathan V. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2019 Jun 13;5(1):41. doi: 10.1038/s41572-019-0092-1. PMID: 31197153.

Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Borén J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017 Aug 21;38(32):2459-2472. doi: 10.1093/eurheartj/ehx144. PMID: 28444290; PMCID: PMC5837225.

Ferreira TA, Blackman AV, Oyrer J, Jayabal S, Chung AJ, Watt AJ, Sjöström PJ, van Meyel DJ. Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods*. 2014 Oct;11(10):982-4. doi: 10.1038/nmeth.3125. PMID: 25264773; PMCID: PMC5271921.

Figueiredo VC, Markworth JF, Cameron-Smith D. Considerations on mTOR regulation at serine 2448: implications for muscle metabolism studies. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Jul;74(14):2537-2545. doi: 10.1007/s00018-017-2481-5. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28220207.

Fonseca-Azevedo K, Herculano-Houzel S. Metabolic constraint imposes tradeoff between body size and number of brain neurons in human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 6;109(45):18571-6. doi: 10.1073/pnas.1206390109. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23090991; PMCID: PMC3494886.

Fuentes E, Venegas B, Muñoz-Arenas G, Moran C, Vazquez-Roque RA, Flores G, Treviño S, Diaz A, Guevara J. High-carbohydrate and fat diet consumption causes metabolic deterioration, neuronal damage, and loss of recognition memory in rats. *J Chem Neuroanat*. 2023 Apr;129:102237. doi: 10.1016/j.jchemneu.2023.102237. Epub 2023 Feb 2. PMID: 36736441.

Gensel JC, Schonberg DL, Alexander JK, McTigue DM, Popovich PG. Semi-automated Sholl analysis for quantifying changes in growth and differentiation of neurons and glia. *J Neurosci Methods*. 2010 Jun 30;190(1):71-9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.04.026. Epub 2010 May 11. PMID: 20438758; PMCID: PMC2911480.

Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell*. 2015 Mar 26;161(1):161-172. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.036. PMID: 25815993; PMCID: PMC4525717.

González Olmo BM, Bettés MN, DeMarsh JW, Zhao F, Askwith C, Barrientos RM. Short-term high-fat diet consumption impairs synaptic plasticity in the aged hippocampus via IL-1 signaling. *NPJ Sci Food*. 2023 Jul 17;7(1):35. doi: 10.1038/s41538-023-00211-4. PMID: 37460765; PMCID: PMC10352252.

González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, Moreno LA, Bray GA, Martínez JA. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun 15;3:17034. doi: 10.1038/nrdp.2017.34. PMID: 28617414.

Goren-Inbar N, Alperson N, Kislev ME, Simchoni O, Melamed Y, Ben-Nun A, Werker E. Evidence of hominin control of fire at Geshert Benot Ya'aqov, Israel. *Science*. 2004 Apr 30;304(5671):725-7. doi: 10.1126/science.1095443. PMID: 15118160.

Grigsby AB, Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. Prevalence of anxiety in adults with diabetes: a systematic review. *J Psychosom Res*. 2002 Dec;53(6):1053-60. doi: 10.1016/s0022-3999(02)00417-8. PMID: 12479986.

Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007 Jul;12(1):9-22. doi: 10.1016/j.ccr.2007.05.008. PMID: 17613433.

Guilford BL, Ryals JM, Wright DE. Phenotypic changes in diabetic neuropathy induced by a high-fat diet in diabetic C57BL/6 mice. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011:848307. doi: 10.1155/2011/848307. Epub 2011 Nov 14. PMID: 22144990; PMCID: PMC3226416.

Guo D, Hu X, Zhang H, Lu C, Cui G, Luo X. Orientin and neuropathic pain in rats with spinal nerve ligation. *Int Immunopharmacol*. 2018 May;58:72-79. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.013. Epub 2018 Mar 17. PMID: 29558662.

Guo M, Mi J, Jiang QM, Xu JM, Tang YY, Tian G, Wang B. Metformin may produce antidepressant effects through improvement of cognitive function among depressed patients with diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014 Sep;41(9):650-6. doi: 10.1111/1440-1681.12265. PMID: 24862430.

Gupta D, Radhakrishnan M, Kurhe Y. Insulin reverses anxiety-like behavior evoked by streptozotocin-induced diabetes in mice. *Metab Brain Dis*. 2014 Sep;29(3):737-46. doi: 10.1007/s11011-014-9540-5. Epub 2014 Apr 25. PMID: 24763911.

Hassan AM, Mancano G, Kashofer K, Fröhlich EE, Matak A, Mayerhofer R, Reichmann F, Olivares M, Neyrinck AM, Delzenne NM, Claus SP, Holzer P. High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated with changes in microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome. *Nutr Neurosci*. 2019 Dec;22(12):877-893. doi: 10.1080/1028415X.2018.1465713. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29697017.

Ho N, Balu DT, Hilario MR, Blendy JA, Lucki I. Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiol Behav*. 2012 Feb 1;105(3):702-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.09.003. Epub 2011 Sep 10. PMID: 21945451; PMCID: PMC3237925.

Höglund E, Øverli Ø, Winberg S. Tryptophan Metabolic Pathways and Brain Serotonergic Activity: A Comparative Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Apr 8;10:158. doi: 10.3389/fendo.2019.00158. PMID: 31024440; PMCID: PMC6463810.

Hornig T, Hotamisligil GS. Linking the inflammasome to obesity-related disease. *Nat Med*. 2011 Feb;17(2):164-5. doi: 10.1038/nm0211-164. PMID: 21297609.

Horike N, Sakoda H, Kushiya A, Ono H, Fujishiro M, Kamata H, Nishiyama K, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H, Asano T. AMP-activated protein kinase activation increases phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta and thereby reduces cAMP-responsive element transcriptional activity and phosphoenolpyruvate carboxykinase C gene expression in the liver. *J Biol Chem*. 2008 Dec 5;283(49):33902-10. doi: 10.1074/jbc.M802537200. Epub 2008 Sep 17. PMID: 18801732; PMCID: PMC2662216.

Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the

adipocyte fatty acid binding protein. *Science*. 1996 Nov 22;274(5291):1377-9. doi: 10.1126/science.274.5291.1377. PMID: 8910278.

Huang CW, Hong TW, Wang YJ, Chen KC, Pei JC, Chuang TY, Lai WS, Tsai SH, Chu R, Chen WC, Sheen LY, Takahashi S, Ding ST, Shen TL. *Ophiocordyceps formosana* improves hyperglycemia and depression-like behavior in an STZ-induced diabetic mouse model. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Aug 24;16(1):310. doi: 10.1186/s12906-016-1278-7. PMID: 27553852; PMCID: PMC4995616.

Ilan Gabriely, Xiao Hui Ma, Xiao Man Yang, Gil Atzmon, Michael W. Rajala, Anders H. Berg, Phillip Scherer, Luciano Rossetti, Nir Barzilai; Removal of Visceral Fat Prevents Insulin Resistance and Glucose Intolerance of Aging: An Adipokine-Mediated Process?. *Diabetes* 1 October 2002; 51 (10): 2951–2958.

International Diabetes Federation, 2015. Disponível em: <https://idf.org/about-diabetes/diabetes-facts-figures/>

Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 1993;92(2):883- 893. doi:10.1172/JCI116663

Isingrini E, Camus V, Le Guisquet AM, Pingaud M, Devers S, Belzung C. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. *PLoS One*. 2010 Apr 28;5(4):e10404. doi: 10.1371/journal.pone.0010404. PMID: 20436931; PMCID: PMC2861008.

Iwagami M, Qizilbash N, Gregson J, Douglas I, Johnson M, Pearce N, Evans S, Pocock S. Blood cholesterol and risk of dementia in more than 1·8 million people over two decades: a retrospective cohort study. *Lancet Healthy Longev*. 2021 Aug;2(8):e498-e506. doi: 10.1016/S2666-7568(21)00150-1. Epub 2021 Jul 23. PMID: 36097999.

Izquierdo I, Cammarota M, Da Silva WC, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Mello P, Benetti F, Costa JC, Medina JH. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. *An Acad Bras Cienc*. 2008 Mar;80(1):115-27. doi: 10.1590/s0001-37652008000100007. PMID: 18345380.

Jahrling JB, Lin AL, DeRosa N, Hussong SA, Van Skike CE, Girotti M, Javors M, Zhao Q, Maslin LA, Asmis R, Galvan V. mTOR drives cerebral blood flow and memory deficits in LDLR<sup>-/-</sup> mice modeling atherosclerosis and vascular cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018 Jan;38(1):58-74. doi: 10.1177/0271678X17705973. Epub 2017 May 17. PMID: 28511572; PMCID: PMC5757441.

Jenkins TA, Nguyen JC, Polglaze KE, Bertrand PP. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients*. 2016 Jan 20;8(1):56. doi: 10.3390/nu8010056. PMID: 26805875; PMCID: PMC4728667.

Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 30;3:17016. doi: 10.1038/nrdp.2017.16. PMID: 28358037.

Khaledi M, Haghghatdoost F, Feizi A, Aminorroaya A. The prevalence of comorbid depression in patients with type 2 diabetes: an updated systematic review and meta-analysis on huge number of observational studies. *Acta Diabetol*. 2019 Jun;56(6):631-650. doi: 10.1007/s00592-019-01295-9. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30903433.

Kim W, Kwon HJ, Jung HY, Lim SS, Kang BG, Jo YB, Yu DS, Choi SY, Hwang IK, Kim DW. *Cissus verticillata* Extract Decreases Neuronal Damage Induced by Oxidative Stress in HT22 Cells and Ischemia in Gerbils by Reducing the Inflammation and Phosphorylation of MAPKs. *Plants (Basel)*. 2021 Jun 15;10(6):1217. doi: 10.3390/plants10061217. PMID: 34203930; PMCID: PMC8232592.

Kitakaze, T., Makiyama, A., Yamashita, Y., & Ashida, H. 2020. Low dose of luteolin activates Nrf2 in the liver of mice at the start of the active phase but not that of the inactive phase. *PLoS One*, 15(4), e0231403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231403>.

Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8455-9. doi: 10.1073/pnas.93.16.8455. PMID: 8710892; PMCID: PMC38692.

Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 2002 Feb 7;346(6):393-403. doi: 10.1056/NEJMoa012512. PMID: 11832527; PMCID: PMC1370926.

Koliaki C, Dalamaga M, Liatis S. Update on the Obesity Epidemic: After the Sudden Rise, Is the Upward Trajectory Beginning to Flatten? *Curr Obes Rep*. 2023 Dec;12(4):514-527. doi: 10.1007/s13679-023-00527-y. Epub 2023 Oct 2. Erratum in: *Curr Obes Rep*. 2023 Oct 17;; PMID: 37779155; PMCID: PMC10748771.

Korinek M, Vyklicky V, Borovska J, Lichnerova K, Kaniakova M, Krausova B, Krusek J, Balik A, Smejkalova T, Horak M, Vyklicky L. Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors. *J Physiol*. 2015 May 15;593(10):2279-93. doi: 10.1113/jphysiol.2014.288209. Epub 2015 Mar 24. PMID: 25651798; PMCID: PMC4457192.

Krogh HW, Mundal L, Holven KB, Retterstøl K. Patients with familial hypercholesterolaemia are characterized by presence of cardiovascular disease at the time of death. *Eur Heart J*. 2016 May 1;37(17):1398-405. doi: 10.1093/eurheartj/ehv602. Epub 2015 Nov 18. PMID: 26586781.

Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol*. 1999 Apr;37(4):423-53. doi: 10.1016/s0278-6915(99)00010-1. PMID: 10418958.

- Lane-Donovan C, Philips GT, Herz J. More than cholesterol transporters: lipoprotein receptors in CNS function and neurodegeneration. *Neuron*. 2014 Aug 20;83(4):771-87. doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.005. PMID: 25144875; PMCID: PMC4240629.
- Lang P, Hasselwander S, Li H, Xia N. Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Sci Rep*. 2019 Dec 20;9(1):19556. doi: 10.1038/s41598-019-55987-x. PMID: 31862918; PMCID: PMC6925252.
- Langley MR, Yoon H, Kim HN, Choi CI, Simon W, Kleppe L, Lanza IR, LeBrasseur NK, Matveyenko A, Scarisbrick IA. High fat diet consumption results in mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and oligodendrocyte loss in the central nervous system. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 Mar 1;1866(3):165630. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165630. Epub 2019 Dec 6. PMID: 31816440; PMCID: PMC7982965.
- Leba, L.J., Brunschwig, C., Saout, M., Martial, K., Bereau, D., Robinson, J.C. 2016. *Oenocarpus bacaba* and *Oenocarpus bataua* Leaflets and Roots: A New Source of Antioxidant Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1014. <https://doi.org/10.3390/ijms17071014>.
- Leng S, Zhang W, Zheng Y, Liberman Z, Rhodes CJ, Eldar-Finkelman H, Sun XJ. Glycogen synthase kinase 3 beta mediates high glucose-induced ubiquitination and proteasome degradation of insulin receptor substrate 1. *J Endocrinol*. 2010 Aug;206(2):171-81. doi: 10.1677/JOE-09-0456. Epub 2010 May 13. PMID: 20466847; PMCID: PMC3072280.
- Li M, Li Q, Zhao Q, Zhang J, Lin J. Luteolin improves the impaired nerve functions in diabetic neuropathy: behavioral and biochemical evidences. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Sep 1;8(9):10112-20. PMID: 26617718; PMCID: PMC4637533.
- Li X, Jope RS. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? *Neuropsychopharmacology*. 2010 Oct;35(11):2143-54. doi: 10.1038/npp.2010.105. Epub 2010 Jul 28. PMID: 20668436; PMCID: PMC3055312.
- Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*. 1976 Jul 30;193(4251):415-7. doi: 10.1126/science.180605. PMID: 180605.
- Lin WH, Yang IH, Cheng HE, Lin HF. Case Report: Late-Onset Mitochondrial Disease Uncovered by Metformin Use in a Patient With Acute Verbal Auditory Agnosia. *Front Neurol*. 2022 Mar 25;13:863047. doi: 10.3389/fneur.2022.863047. PMID: 35401420; PMCID: PMC8990297.
- Lindberg G, Råstam L, Gullberg B, *et al*. Low serum cholesterol concentration and short term mortality from injuries in men and women. *BMJ*. 1992;305(6848):277-279.
- Liu BN, Liu XT, Liang ZH, Wang JH. Gut microbiota in obesity. *World J Gastroenterol*. 2021 Jul 7;27(25):3837-3850. doi: 10.3748/wjg.v27.i25.3837. PMID: 34321848; PMCID: PMC8291023.

Liu Y, Lan N, Ren J, Wu Y, Wang ST, Huang XF, Yu Y. Orientin improves depression-like behavior and BDNF in chronic stressed mice. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Jun;59(6):1130-42. doi: 10.1002/mnfr.201400753. Epub 2015 Apr 29. Erratum in: *Mol Nutr Food Res*. 2015 Jul;59(7):1411. PMID: 25788013.

Liu, J., Wang, R., Desai, K., & Wu, L. 2011. Upregulation of aldolase B and overproduction of methylglyoxal in vascular tissues from rats with metabolic syndrome. *Cardiovascular Research*, 92(3), 494-503. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr239>.

Livingstone R, Boyle JG, Petrie JR; REMOVAL Study Team. A new perspective on metformin therapy in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017 Sep;60(9):1594-1600. doi: 10.1007/s00125-017-4364-6. Epub 2017 Aug 2. PMID: 28770327; PMCID: PMC5552844.

Louzada, M. L. da C. ., Cruz, G. L. da, Silva, K. A. A. N., Grassi, A. G. F., Andrade, G. C. ., Rauber, F. ., Levy, R. B., & Monteiro, C. A. (2023). Consumption of ultra-processed foods in Brazil: distribution and temporal evolution 2008–2018. *Revista De Saúde Pública*, 57(1), 12. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2023057004744>

Luca F, Perry GH, Di Rienzo A. Evolutionary adaptations to dietary changes. *Annu Rev Nutr*. 2010 Aug 21;30:291-314. doi: 10.1146/annurev-nutr-080508-141048. PMID: 20420525; PMCID: PMC4163920.

Lustman PJ, Anderson RJ, Freedland KE, de Groot M, Carney RM, Clouse RE. Depression and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature. *Diabetes Care*. 2000 Jul;23(7):934-42. doi: 10.2337/diacare.23.7.934. PMID: 10895843.

Lui DTW, Lee ACH, Tan KCB. Management of Familial Hypercholesterolemia: Current Status and Future Perspectives. *J Endocr Soc*. 2020 Aug 21;5(1):bvaa122. doi: 10.1210/jendso/bvaa122. PMID: 33928199; PMCID: PMC8059332.

Maia AC, Braga Ade A, Brouwers A, Nardi AE, Oliveira e Silva AC. Prevalence of psychiatric disorders in patients with diabetes types 1 and 2. *Compr Psychiatry*. 2012 Nov;53(8):1169-73. doi: 10.1016/j.comppsy.2012.03.011. Epub 2012 Apr 21. PMID: 22521330.

Malik VS, Schulze MB, Hu FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2006 Aug;84(2):274-88. doi: 10.1093/ajcn/84.1.274. PMID: 16895873; PMCID: PMC3210834.

Magalhães, Walkyria *et al.*, Aerobic Exercise Modulates Visceral Adipose Tissue of Estrogen Deprived Rats in an Experimental Model of Dyslipidemia. *Journal of Health and Allied Sciences NU* 2024; 14(01): 071-077 DOI: 10.1055/s-0043-176258.

Marín-Peñalver JJ, Martín-Timón I, Sevillano-Collantes C, Del Cañizo-Gómez FJ. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2016 Sep 15;7(17):354-95. doi: 10.4239/wjd.v7.i17.354. PMID: 27660695; PMCID: PMC5027002.

Martel P, Fantino M. Mesolimbic dopaminergic system activity as a function of food reward: a microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996 Jan;53(1):221-6. doi: 10.1016/0091-3057(95)00187-5. PMID: 8848454.

Martín MG, Pfrieger F, Dotti CG. Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Rep.* 2014 Oct;15(10):1036-52. doi: 10.15252/embr.201439225. Epub 2014 Sep 15. PMID: 25223281; PMCID: PMC4253844.

Martínez Steele E, Baraldi LG, Louzada ML, *et al.* (2016) Ultra-processed foods and added sugars in the US diet: evidence from a nationally representative cross-sectional study. *BMJ Open* 6, e009892.

Millan M. J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 57(1):1-164. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00048-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00048-3).

Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2009 Mar;5(3):150-9. doi: 10.1038/ncpendmet1066. PMID: 19229235.

Moreira EL, de Oliveira J, Nunes JC, Santos DB, Nunes FC, Vieira DS, Ribeiro-do-Valle RM, Pamplona FA, de Bem AF, Farina M, Walz R, Prediger RD. Age-related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr<sup>-/-</sup>): evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. *J Alzheimers Dis.* 2012;32(2):495-511. doi: 10.3233/JAD-2012-120541. PMID: 22810096.

Moreira EL, de Oliveira J, Engel DF, Walz R, de Bem AF, Farina M, Prediger RD. Hypercholesterolemia induces short-term spatial memory impairments in mice: up-regulation of acetylcholinesterase activity as an early and causal event? *J Neural Transm (Vienna).* 2014 Apr;121(4):415-26. doi: 10.1007/s00702-013-1107-9. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24166183.

Moubarac JC, Batal M, Louzada ML, *et al.* (2017) Consumption of ultra-processed foods predicts diet quality in Canada. *Appetite* 108, 512–520.

Mudgal J, Nampoothiri M, Basu Mallik S, Kinra M, Hall S, Grant G, Anoopkumar-Dukie S, Rao CM, Arora D. Possible involvement of metformin in downregulation of neuroinflammation and associated behavioural changes in mice. *Inflammopharmacology.* 2019 Oct;27(5):941-948. doi: 10.1007/s10787-019-00638-w. Epub 2019 Sep 3. PMID: 31482259.

Mulder M, Jansen PJ, Janssen BJA, *et al.* Low-density lipoprotein receptor- knockout mice display impaired spatial memory associated with a decreased synaptic density in the hippocampus. *Neurobiol Dis.* 2004;16(1):212-219.

Mulder M, Koopmans G, Wassink G, *et al.* LDL receptor deficiency results in decreased cell proliferation and presynaptic bouton density in the murine hippocampus. *Neurosci Res.* 2007;59(3):251-256.

Murat Bilgin, H, Atmaca, M, Deniz Obay, B, *et al.* (2011) Protective effects of coumarin and coumarin derivatives against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol* 63, 325–330.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017 Dec 16;390(10113):2627-2642. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32129-3. Epub 2017 Oct 10. PMID: 29029897; PMCID: PMC5735219.

Neaton JD, Blackburn H, Jacobs D, *et al.* Serum cholesterol level and mortality findings for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Arch Intern Med*. 1992;152(7):1490–1500.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 2020 Mar 27;83(3):770-803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32162523.

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, *et al.*, Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014 Aug 30;384(9945):766-81. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8. Epub 2014 May 29. Erratum in: *Lancet*. 2014 Aug 30;384(9945):746. PMID: 24880830; PMCID: PMC4624264.

Ntalouka, F., & Tsirivakou, A. (2023). Luteolin: A promising natural agent in the management of pain in chronic conditions. *Front Pain Res (Lausanne)*, 4, 1114428. <https://doi.org/10.3389/fpain.2023.1114428>.

O'Brien PD, Hinder LM, Rumora AE, Hayes JM, Dauch JR, Backus C, Mendelson FE, Feldman EL. Juvenile murine models of prediabetes and type 2 diabetes develop neuropathy. *Dis Model Mech*. 2018 Dec 18;11(12):dmm037374. doi: 10.1242/dmm.037374. PMID: 30446513; PMCID: PMC6307897.

O'Flaherty B, Neigh GN, Rainnie D. High-fructose diet initiated during adolescence does not affect basolateral amygdala excitability or affective-like behavior in Sprague Dawley rats. *Behav Brain Res*. 2019 Jun 3;365:17-25. doi: 10.1016/j.bbr.2019.02.042. Epub 2019 Feb 23. PMID: 30807811; PMCID: PMC6550332.

Obrosova IG, Ilnytska O, Lyzogubov VV, Pavlov IA, Mashtalir N, Nadler JL, Drel VR. High-fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: effects of "healthy" diet and aldose reductase inhibition. *Diabetes*. 2007 Oct;56(10):2598-608. doi: 10.2337/db06-1176. Epub 2007 Jul 12. PMID: 17626889.

Ohkawara S., Tanaka-Kagawa T., Furukawa Y., Jinno H., 2012. Methylglyoxal activates the human transient receptor potential ankyrin 1 channel. *J Toxicol Sci*. 37(4):831-5. <https://doi.org/10.2131/jts.37.831>.

Okereke OI, Kang JH, Cook NR, Gaziano JM, Manson JE, Buring JE, Grodstein F. Type 2 diabetes mellitus and cognitive decline in two large cohorts of community-dwelling older adults. *J Am Geriatr Soc.* 2008 Jun;56(6):1028-36. doi: 10.1111/j.1532-5415.2008.01686.x. Epub 2008 Apr 1. PMID: 18384580.

Olescovicz, Gislaïne. O impacto da hipercolesterolemia sobre os processos de memória e plasticidade sináptica em camundongos machos e fêmeas: do receptor LDL aos oxisteróis. 2021. Tese de doutorado. Disponível em: <https://tede.ufsc.br/teses/PFMC0427-T.pdf>.

Oliveira, A.B., Mendonça, M.S., Azevedo, A.A., Meira, R.M.S.A., 2012. Anatomy and histochemistry of the vegetative organs of *Cissus verticillata*—a native medicinal plant of the Brazilian Amazon. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22 (6), 1201–1211.

Ott A, Stolk RP, Hofman A, van Harskamp F, Grobbee DE, Breteler MM. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia.* 1996 Nov;39(11):1392-7. doi: 10.1007/s001250050588. PMID: 8933010.

Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology.* 1999 Dec 10;53(9):1937-42. doi: 10.1212/wnl.53.9.1937. PMID: 10599761.

Otto-Buczowska E, Jainta N. Pharmacological Treatment in Diabetes Mellitus Type 1 - Insulin and What Else? *Int J Endocrinol Metab.* 2017 Nov 20;16(1):e13008. doi: 10.5812/ijem.13008. PMID: 29696037; PMCID: PMC5903388.

Palinkas LA, Lee PP, Barrett-Connor E. A prospective study of Type 2 diabetes and depressive symptoms in the elderly: the Rancho Bernardo Study. *Diabet Med.* 2004 Nov;21(11):1185-91. doi: 10.1111/j.1464-5491.2004.01315.x. PMID: 15498084.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>.

Patanè G, Piro S, Rabuazzo AM, Anello M, Vigneri R, Purrello F. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2000 May;49(5):735-40. doi: 10.2337/diabetes.49.5.735. PMID: 10905481.

Pathak V, Pathak NM, O'Neill CL, Guduric-Fuchs J, Medina RJ. Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes.* 2019 May 3;12:1179551419844521. doi: 10.1177/1179551419844521. PMID: 31105434; PMCID: PMC6501476.

Pepato MT, Baviera AM, Vendramini RC, Perez Mda P, Kettelhut Ido C, Brunetti IL. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. *Biotechnol Appl Biochem.* 2003 Feb;37(Pt 1):15-20. doi: 10.1042/ba20020065. PMID: 12578546.

Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 2018 Oct 1;98(4):2133-2223. doi: 10.1152/physrev.00063.2017. PMID: 30067154; PMCID: PMC6170977.

Pfriegeer FW, Ungerer N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res.* 2011 Oct;50(4):357-71. doi: 10.1016/j.plipres.2011.06.002. Epub 2011 Jul 1. PMID: 21741992.

Phillips CM, Perry IJ. Depressive symptoms, anxiety and well-being among metabolic health obese subtypes. *Psychoneuroendocrinology.* 2015 Dec;62:47-53. doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.07.168. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26232649.

Pinho, Cibele Martins. Estudo do dimorfismo sexual no comportamento social e tipo-ansioso de camundongos nocaute para o receptor de LDL: Envolvimento do sistema monoaminérgico, estresse, receptor de glicocorticoide e fatores neurotróficos. Trabalho de Conclusão de Curso, 2021.

Prabhakar PK, Doble M. A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. *Curr Diabetes Rev.* 2008 Nov;4(4):291-308. doi: 10.2174/157339908786241124. PMID: 18991598.

Price TJ, Das V, Dussor G. Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK) Activators For the Prevention, Treatment and Potential Reversal of Pathological Pain. *Curr Drug Targets.* 2016;17(8):908-20. doi: 10.2174/1389450116666151102095046. PMID: 26521775; PMCID: PMC4852160.

Pruzin JJ, Nelson PT, Abner EL, Arvanitakis Z. Review: Relationship of type 2 diabetes to human brain pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018 Jun;44(4):347-362. doi: 10.1111/nan.12476. Epub 2018 Mar 4. PMID: 29424027; PMCID: PMC5980704.

Rajput, S. A., Shaukat, A., Wu, K., Rajput, I. R., Baloch, D. M., Akhtar, R. W., Raza, M. A., Najda, A., Rafał, P., Albrakati, A., El-Kott, A. F., & Abdel-Daim, M. M. 2021. Luteolin Alleviates AflatoxinB1-Induced Apoptosis and Oxidative Stress in the Liver of Mice through Activation of Nrf2 Signaling Pathway. *Antioxidants (Basel)*, 10(8), 1268. <https://doi.org/10.3390/antiox10081268>.

Rakhra V, Galappaththy SL, Bulchandani S, Cabandugama PK. Obesity and the Western Diet: How We Got Here. *Mo Med.* 2020 Nov-Dec;117(6):536-538. PMID: 33311784; PMCID: PMC7721435.

Ramamurthy S, Chang E, Cao Y, Zhu J, Ronnett GV. AMPK activation regulates neuronal structure in developing hippocampal neurons. *Neuroscience.* 2014 Feb 14;259:13-24. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.048. Epub 2013 Dec 1. PMID: 24295634.

Rasband, M. N., Park, E. W., Vanderah, T. W., Lai, J., Porreca, F., & Trimmer, J. S. (2001). Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13373–13378. <https://doi.org/10.1073/pnas.231376298>

Rasgon NL, Kenna HA. Insulin resistance in depressive disorders and Alzheimer's disease: revisiting the missing link hypothesis. *Neurobiol Aging*. 2005 Dec;26 Suppl 1:103-7. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.004. Epub 2005 Oct 11. PMID: 16225963.

Rauber F, da Costa Louzada ML, Steele EM, *et al.* (2018) Ultra-processed food consumption and chronic non-communicable diseases-related dietary nutrient profile in the UK (2008–2014). *Nutrients* 10, 587.

Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017 Sep;60(9):1577-1585. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z. Epub 2017 Aug 3. PMID: 28776086; PMCID: PMC5552828.

Rivas DA, Lessard SJ, Coffey VG (2009) mTOR function in skeletal muscle: a focal point for overnutrition and exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* 34:807–816

Rodrigues MS, do Nascimento NB, Farias HR, Schons T, Machado AG, Behenck E, Mesquita A, Krolow Bast R, Budni J, Engblom D, de Bem AF, de Oliveira J. Microglia contribute to cognitive decline in hypercholesterolemic LDLr<sup>-/-</sup> mice. *J Neurochem*. 2023 Sep 11. doi: 10.1111/jnc.15952. Epub ahead of print. PMID: 37694813.

Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, Bonny A, Brauer M, Brodmann M, Cahill TJ, Carapetis J, Catapano AL, Chugh SS, Cooper LT, Coresh J, Criqui M, DeCleene N, Eagle KA, Emmons-Bell S, Feigin VL, Fernández-Solà J, Fowkes G, Gakidou E, Grundy SM, He FJ, Howard G, Hu F, Inker L, Karthikeyan G, Kassebaum N, Koroshetz W, Lavie C, Lloyd-Jones D, Lu HS, Mirijello A, Temesgen AM, Mokdad A, Moran AE, Muntner P, Narula J, Neal B, Ntsekhe M, Moraes de Oliveira G, Otto C, Owolabi M, Pratt M, Rajagopalan S, Reitsma M, Ribeiro ALP, Rigotti N, Rodgers A, Sable C, Shakil S, Sliwa-Hahnle K, Stark B, Sundström J, Timpel P, Tleyjeh IM, Valgimigli M, Vos T, Whelton PK, Yacoub M, Zuhlke L, Murray C, Fuster V; GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Dec 22;76(25):2982-3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010. Erratum in: *J Am Coll Cardiol*. 2021 Apr 20;77(15):1958-1959. PMID: 33309175; PMCID: PMC7755038.

Rutledge AC, Adeli K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutr Rev*. 2007 Jun;65(6 Pt 2):S13-23. doi: 10.1111/j.1753-4887.2007.tb00322.x. PMID: 17605309.

Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R; IDF Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9<sup>th</sup> edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019 Nov;157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31518657.

Salgado J. M., Mansi D. N., Gagliardi A. 2009. *Cissus sicyoides*: analysis of glycemic control in Diabetic Rats through biomarkers. *J Med Food*. 12(3):722-727. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0157>.

Samaras K, Makkar S, Crawford JD, Kochan NA, Wen W, Draper B, Trollor JN, Brodaty H, Sachdev PS. Metformin Use Is Associated With Slowed Cognitive Decline and Reduced Incident Dementia in Older Adults With Type 2 Diabetes: The Sydney Memory and Ageing Study. *Diabetes Care*. 2020 Nov;43(11):2691-2701. doi: 10.2337/dc20-0892. Epub 2020 Sep 23. PMID: 32967921.

Sapolsky RM. Glucocorticoids, the evolution of the stress-response, and the primate predicament. *Neurobiol Stress*. 2021 Mar 20;14:100320. doi: 10.1016/j.ynstr.2021.100320. PMID: 33869683; PMCID: PMC8040328.

Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):960-976. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004. Erratum in: *Cell*. 2017 Apr 6;169(2):361-371. PMID: 28283069; PMCID: PMC5394987.

Schreiber AK, Nones CF, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J Diabetes*. 2015 Apr 15;6(3):432-44. doi: 10.4239/wjd.v6.i3.432. PMID: 25897354; PMCID: PMC4398900.

Singh, V.P., Bali, A., Singh, N., Jaggi, A.S. 2014. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 18, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010404>.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(3):367-70. doi: 10.1007/BF00428203. PMID: 3923523.

Stokes WS. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR J*. 2002;43 Suppl:S31-8. PMID: 12388849.

Suarez-Kurtz G, Botton MR. Pharmacogenetics of coumarin anticoagulants in Brazilians. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015 Jan;11(1):67-79. doi: 10.1517/17425255.2015.976201. Epub 2014 Oct 25. PMID: 25345887.

Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest*. 2012 Apr;122(4):1316-38. doi: 10.1172/JCI59903. PMID: 22476197; PMCID: PMC3314463.

Thiele C, Hannah MJ, Fahrenholz F, Huttner WB. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol*. 2000 Jan;2(1):42-9. doi: 10.1038/71366. PMID: 10620806.

Thirumangalakudi L, Prakasam A, Zhang R, Bimonte-Nelson H, Sambamurti K, Kindy MS, Bhat NR. High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J Neurochem*. 2008 Jul;106(1):475-85. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05415.x. Epub 2008 Jul 1. PMID: 18410513; PMCID: PMC3897170.

Tsai SF, Hsu PL, Chen YW, Hossain MS, Chen PC, Tzeng SF, Chen PS, Kuo YM. High-fat diet induces depression-like phenotype via astrocyte-mediated hyperactivation of ventral hippocampal glutamatergic afferents to the nucleus accumbens. *Mol Psychiatry*. 2022 Nov;27(11):4372-4384. doi: 10.1038/s41380-022-01787-1. Epub 2022 Sep 30. PMID: 36180573; PMCID: PMC9734059.

Um, M., Moon, M., Ahn, J., & Youl Ha, T. (2013). Coumarin attenuates hepatic steatosis by down-regulating lipogenic gene expression in mice fed a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*, 109(9), 1590-1597. doi:10.1017/S0007114512005260

Vagena E, Ryu JK, Baeza-Raja B, Walsh NM, Syme C, Day JP, Houslay MD, Baillie GS. A high-fat diet promotes depression-like behavior in mice by suppressing hypothalamic PKA signaling. *Transl Psychiatry*. 2019 May 10;9(1):141. doi: 10.1038/s41398-019-0470-1. PMID: 31076569; PMCID: PMC6510753.

Veloso IC, Delanogare E, Machado AE, Braga SP, Rosa GK, De Bem AF, Rafique J, Saba S, da Trindade RN, Galetto FZ, Moreira ELG. A selanylimidazopyridine (3-SePh-IP) reverses the prodepressant- and anxiogenic-like effects of a high-fat/high-fructose diet in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2021 Mar 27;73(5):673-681. doi: 10.1093/jpp/rgaa070. PMID: 33772293.

Viana GS, Medeiros AC, Lacerda AM, Leal LK, Vale TG, Matos FJ. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacol*. 2004 Jun 8;4:9. doi: 10.1186/1471-2210-4-9. PMID: 15182373; PMCID: PMC443509.

Vincent AM, Hinder LM, Pop-Busui R, Feldman EL. Hyperlipidemia: a new therapeutic target for diabetic neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2009 Dec;14(4):257-67. doi: 10.1111/j.1529-8027.2009.00237.x. PMID: 20021567; PMCID: PMC4239691.

Volkow ND, Wang GJ, Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci*. 2011 Jan;15(1):37-46. doi: 10.1016/j.tics.2010.11.001. Epub 2010 Nov 24. PMID: 21109477; PMCID: PMC3124340.

Wang S, Kobayashi K, Kogure Y, Yamanaka H, Yamamoto S, Yagi H, Noguchi K, Dai Y. Negative Regulation of TRPA1 by AMPK in Primary Sensory Neurons as a Potential Mechanism of Painful Diabetic Neuropathy. *Diabetes*. 2018 Jan;67(1):98-109. doi: 10.2337/db17-0503. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29025860.

Wang D, Wu J, Zhu P, Xie H, Lu L, Bai W, Pan W, Shi R, Ye J, Xia B, Zhao Z, Wang Y, Liu X, Zhao B. Tryptophan-rich diet ameliorates chronic unpredictable mild stress induced depression- and anxiety-like behavior in mice: The potential involvement of gut-brain axis. *Food Res Int*. 2022 Jul;157:111289. doi: 10.1016/j.foodres.2022.111289. Epub 2022 Apr 25. PMID: 35761597.

Wei NN, Lv HN, Wu Y, Yang SL, Sun XY, Lai R, Jiang Y, Wang K. Selective Activation of Nociceptor TRPV1 Channel and Reversal of Inflammatory Pain in Mice by a Novel Coumarin Derivative Muralatin L from *Murraya alata*. *J Biol Chem*. 2015 Jan 8;291(2):640-51. doi: 10.1074/jbc.M115.654392. Epub 2015 Oct 29. PMID: 26515068; PMCID: PMC4705384.

Wei, F., Minting, C., Chaohua, L., Feilong, C., Qun, S., Zhixian, M. 2016. Developing an Absorption-Based Quality Control Method for Hu-Gan-Kang-Yuan Capsules by UFLC-QTOF-MS/MS Screening and HPLC-DAD Quantitative Determination. *Molecules*, 21(5), 592. <https://doi.org/10.3390/molecules21050592>.

Westwood ME, Thornalley PJ. 1995. Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. *Journal of Protein Chemistry*, 14(5), 359-372. <https://doi.org/10.1007/BF01886793>.

Więckowska-Gacek A, Mietelska-Porowska A, Wydrych M, Wojda U. Western diet as a trigger of Alzheimer's disease: From metabolic syndrome and systemic inflammation to neuroinflammation and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*. 2021 Sep;70:101397. doi: 10.1016/j.arr.2021.101397. Epub 2021 Jun 30. PMID: 34214643.

Wrighten SA, Piroli GG, Grillo CA, Reagan LP. A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1792(5):444-53. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.10.013. Epub 2008 Nov 5. PMID: 19022375; PMCID: PMC3991007.

Xu, L.L., Xu, J.J., Zhong, K.R., Shang, Z.P., Wang, F., Wang, R.F., Liu, B. 2017. Analysis of non-volatile chemical constituents of *Menthae haplocalycis herba* by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Molecules*, 22, 1756. <https://doi.org/10.3390/molecules22101756>.

Xue M., Rabbani N., Momiji H., Imbasi P., Anwar M. M., Kitteringham N., Park B. K., Souma T., Moriguchi T., Yamamoto M., *et al.* 2012. Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. *Biochem J*. 443:213-222. <https://doi.org/10.1042/bj20111648>.

Ye X, Liu Y, Hu J, Gao Y, Ma Y, Wen D. Chlorogenic Acid-Induced Gut Microbiota Improves Metabolic Endotoxemia. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Dec 16;12:762691. doi: 10.3389/fendo.2021.762691. PMID: 34975748; PMCID: PMC8716487.

Yki-Järvinen, H., Luukkonen, P.K., Hodson, L. *et al.* Dietary carbohydrates and fats in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 770–786 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00472-y>

Yuan P, Zhang J, Li L, Song Z. Fluoxetine Attenuated Anxiety-Like Behaviors in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Mitigating the Inflammation. *Mediators Inflamm*.

2019 Jul 16;2019:4315038. doi: 10.1155/2019/4315038. PMID: 31396018; PMCID: PMC6664488.

Zambón D, Quintana M, Mata P, Alonso R, Benavent J, Cruz-Sánchez F, Gich J, Pocoví M, Civeira F, Capurro S, Bachman D, Sambamurti K, Nicholas J, Pappolla MA. Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. *Am J Med.* 2011 Mar;123(3):267-74. doi: 10.1016/j.amjmed.2009.08.015. PMID: 20193836; PMCID: PMC2844655.

Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB, Cohen RA. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):47898-905. doi: 10.1074/jbc.M408149200. Epub 2004 Sep 14. PMID: 15371448.

Zemdegs J, Quesseveur G, Jarriault D, Pénicaud L, Fioramonti X, Guiard BP. High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. *Br J Pharmacol.* 2016 Jul;173(13):2095-110. doi: 10.1111/bph.13343. Epub 2015 Dec 9. PMID: 26472268; PMCID: PMC4908198.

Zhang YJ, Lu XW, Song N, Kou L, Wu MK, Liu F, Wang H, Shen JF. Chlorogenic acid alters the voltage-gated potassium channel currents of trigeminal ganglion neurons. *Int J Oral Sci.* 2014 Dec;6(4):233-40. doi: 10.1038/ijos.2014.58. Epub 2014 Nov 14. PMID: 25394592; PMCID: PMC5153590.

Zhao, Y., Geng, C.A., Ma, Y.B., Huang, X.Y., Chen, H., Cao, T.W., Chen, J.J. 2014. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 156, 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014>.

Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.* 2018 Feb;14(2):88-98. doi: 10.1038/nrendo.2017.151. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29219149.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(8):1167-74. doi: 10.1172/JCI13505. PMID: 11602624; PMCID: PMC209533.