



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR**

**GABRIEL CARDOSO DE QUEIROZ SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM  
INDOMETACINA NO APRENDIZADO E NA MEMÓRIA ESPACIAL EM  
MODELO MURINO DE DIABETES TIPO 1**

**Belém – PA**

**2017**

**GABRIEL CARDOSO DE QUEIROZ SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM  
INDOMETACINA NO APRENDIZADO E NA MEMÓRIA ESPACIAL EM  
MODELO MURINO DE DIABETES TIPO 1**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

**Orientadora:** Profa. Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos

**Belém – PA**

**Março – 2017**

**GABRIEL CARDOSO DE QUEIROZ SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM  
INDOMETACINA NO APRENDIZADO E NA MEMÓRIA ESPACIAL EM  
MODELO MURINO DE DIABETES TIPO 1**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular. Área de concentração: Biologia Celular

**Orientadora:** Profa. Dra. Gilmara de Nazareth  
Tavares Bastos

**Belém-PA**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação  
(CIP)  
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

---

Santos, Gabriel Cardoso de Queiroz  
Avaliação da influência do tratamento com  
indometacina no aprendizado e na memória espacial em modelo  
murino de diabetes tipo 1 / Gabriel Cardoso de Queiroz Santos ;  
Orientadora, Gilmara de Nazareth Tavares Bastos. - 2017.

67 f. : il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do  
Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação  
em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2017.

1. Diabetes mellitus – cuidado e tratamento. 2. Agentes  
anti-inflamatórios não esteroides – uso terapêutico. I. Bastos,  
Gilmara de Nazareth Tavares, orientadora. II. Título.

CDD – 22 ed.

616.462

---

**GABRIEL CARDOSO DE QUEIROZ SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM  
INDOMETACINA NO APRENDIZADO E NA MEMÓRIA ESPACIAL EM  
MODELO MURINO DE DIABETES TIPO 1**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular. Área de concentração: Biologia Celular

Apresentação e aprovação em: 25/05/2017

Banca Examinadora:

---

**Orientadora:** Profa. Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos  
**Universidade Federal do Pará (UFPA)**

---

**Avaliadora:** Profa. Dra. Elizabeth Sumi Yamada  
**Universidade Federal do Pará (UFPA)**

---

**Avaliador:** Prof. Dr. Paulo Eduardo Santos Ávila  
**Universidade da Amazônia (UNAMA)**

## **INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS**

### **INSTITUIÇÃO**

Universidade Federal do Pará (UFPA) - Laboratório de Neuroinflamação, Instituto de Ciências Biológicas. Laboratório de Neuropatologia Experimental, Hospital Universitário João de Barros Barreto.

### **FONTES FINANCIADORAS**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Armando e Nazaré, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. À minha família pelo companheirismo e suporte, em especial à minha avó Theo que sempre estará comigo em qualquer lugar.

À minha namorada Rafaela, pela paciência e pelo companheirismo imprescindível.

À professora Gilmara, pelo esforço, dedicação e acima de tudo pela paciência que permitiram a realização deste trabalho e incentivaram minha formação acadêmica.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Neuroinflamação e Neuropatologia Experimental, que contribuíram imensamente para a realização deste trabalho.

Aos amigos, Anderson Bentes, Tiago Silveira, Luís Antônio Maués, Paulo Ávila e José Eduardo Trovão.

Aos meus amigos e parceiros da turma de Biotecnologia 2010, Carlos Augusto, Line, Diana, Murilo e Deborah.

À esta universidade, em especial ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram um caminho de desafios e aprendizados.

*Há três caminhos para o fracasso: não ensinar o que se sabe; não praticar o que se ensina; não perguntar o que se ignora.*

**São Beda**

## RESUMO

Diabetes mellitus (DM) é o nome dado a um grupo de desordens metabólicas que tem como característica em comum o acometimento da regulação dos níveis de glicose no sangue, levando invariavelmente a hiperglicemia. Esta doença vem se tornando uma das mais incidentes na população adulta, principalmente em países em desenvolvimento, causando várias consequências graves como doenças cardiovasculares e renais, fatores responsáveis por um elevado índice de mortalidade dos indivíduos acometidos. Além destas consequências mais bem investigadas e descritas na literatura, vem-se observando outros tipos de complicações. Estudos clínicos e experimentais demonstram que tanto a diabetes mellitus tipo 1 quanto a tipo 2 podem contribuir para o desenvolvimento de déficits cognitivos e demências. Porém, os mecanismos que levam a tais desordens ainda não são totalmente compreendidos. Estudos utilizando o anti-inflamatório não esteroide não seletivo, indometacina, mostram que aspectos relacionados a plasticidade neuronal prejudicados na diabetes podem ser revertidos, demonstrando que há a possibilidade destas desordens serem moduladas por alterações neuroinflamatórias. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do tratamento crônico com indometacina na memória e no aprendizado em um modelo murino de diabetes mellitus tipo 1. Utilizando o teste de campo aberto demonstrou-se que a indometacina reduziu de forma significativa comportamentos relacionados ao estado ansioso. Este tratamento também reverteu déficits de memória de trabalho espacial no teste de labirinto em Y e de aprendizado e memória espacial no labirinto aquático de Morris. Desta forma, pode-se concluir que o tratamento crônico com indometacina possui efeitos benéficos sobre a cognição de camundongos submetidos a modelo de diabetes mellitus tipo 1.

**Palavras Chave:** Diabetes Mellitus, Memória, Indometacina, Aprendizado.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF INDOMETACIN TREATMENT INFLUENCE IN LEARNING AND SPACE MEMORY IN A MURINE MODEL OF DIABETES TYPE 1

Diabetes mellitus (DM) is the group of metabolic disorders that has as a common characteristic the dysregulation of blood glucose levels, invariably leading to hyperglycemia. This disease has become the most frequent in the adult population, mainly in developing countries, causing several serious consequences such as cardiovascular and renal diseases, factors responsible for a high mortality rate of the individuals affected. In addition to those consequences, which are better investigated and described in the literature, other types of complications are observed. Clinical and experimental studies demonstrate that both type 1 and type 2 diabetes mellitus may contribute to the development of cognitive deficits and dementias. However, the mechanisms that lead to such disorders are not yet fully understood. A study using the non-selective non-steroidal anti-inflammatory, indomethacin, has shown that aspects related to impaired neuronal plasticity in diabetes can be reversed, demonstrating that these disorders may be modulated by neuroinflammatory changes. The aim of the present study was to evaluate the influence of chronic treatment with indomethacin on memory and learning in a murine model of type 1 diabetes mellitus (T1DM). Using the open field test, Y-maze test and Morris water maze test we investigated the indomethacin effects on behavioral changes after aloxan inducing T1DM. Indomethacin significantly decreased related behaviors to the anxious state in Open field test. This treatment also reversed spatial working memory deficits in the Y-maze test, and learning and spatial memory deficits in the Morris Water Maze. Thus, it can be concluded that chronic treatment with indomethacin has beneficial effects on the cognition of mice submitted to type 1 diabetes mellitus.

Key words: **Diabetes mellitus, memory, indomethacin, Learning.**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Regulação da liberação de insulina e sua atividade.....	18
<b>Figura 2</b> - Mecanismos citotóxicos da aloxana.....	20
<b>Figura 3</b> - Sequência de eventos do modelo experimental.....	29
<b>Figura 4</b> - Representação ilustrativa do teste do campo aberto.....	30
<b>Figura 5</b> - Representação ilustrativa do teste do labirinto em Y.....	32
<b>Figura 6</b> - Representação ilustrativa dos três primeiros dias do teste do labirinto aquático de Morris.....	35
<b>Figura 7</b> - Representação ilustrativa do último dia do teste do labirinto aquático de Morris.....	37
<b>Figura 8</b> - Glicemia dos animais em quatro medições diferentes.....	38
<b>Figura 9</b> - Avaliação da massa corpórea dos animais.....	39
<b>Figura 10</b> - Avaliação da Velocidade Média nos Testes de Campo Aberto.....	40
<b>Figura 11</b> - Avaliação da Distância Total Percorrida nos Testes de Campo Aberto..	41
<b>Figura 12</b> - Índice de Tempo Preferencial na Periferia em CA-D3 e CA-D8.....	43
<b>Figura 13</b> - Índice de Distância Preferencial na Periferia em CA-D3 e CA-D8.....	44
<b>Figura 14</b> - Comparação dos Índices de Contraste Entre CA-D3 e CA-D8 referentes ao grupo AI + Indometacina.....	45
<b>Figura 15</b> - Número Total de Entradas nos Braços do Labirinto em Y.....	46
<b>Figura 16</b> - Porcentagem de Alternância Espontânea.....	47
<b>Figura 17</b> - Memória de Retenção no Labirinto Aquático de Morris.....	48
<b>Figura 18</b> - Memória de Retenção no Labirinto Aquático de Morris.....	49
<b>Figura 19</b> - Distância Total Percorrida e Velocidade Média em D4.....	50
<b>Figura 20</b> - Tigmotaxia em D1, D2, D3 e D4.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AINE**- Anti-inflamatório não esteróide
- ATP** - Adenina trifosfato
- CA1** - Corno de Amon 1
- CA2**- Corno de Amon 2
- CA3**- Corno de Amon 3
- COX-2** - Cicloxigenase-2
- DG** - Giro denteado
- DCX**- Doublecortina
- DM** - Diabetes mellitus
- DT** - Distância total
- GLUT-2** - Transportador de glicose 2
- GLUT 4** - Transportador de glicose 4
- GSH** - Glutathiona
- HPA** - Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
- IC** - Índice de contraste
- LPS** - Lipopolissacarídeo
- IP** - Intraperitoneal
- NFκB** - Fator nuclear κ b
- PBS** - Tampão fosfato salino
- SNC** - Sistema nervoso central
- TT** -Tempo total
- ZC** - Zona central
- ZP** - Zona periférica
- ZSG** - Zona Subgranular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 – Diabetes Mellitus, “o mal do século” .....	14
1.2 – Patogênese Da DIABETES MELLITUS TIPO 1 e tipo 2 .....	16
1.2 – Modelos animais de diabetes mellitus TIPO 1 .....	19
1.3 –HIPOCAMPO E memória.....	21
1.5 –Diabetes Melitus e défcits de memória .....	23
1.5 – INDOMETACINA E NEUROGÊNESE .....	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
3.1 - Animais experimentais.....	27
3.2 – Delineamento Experimental.....	27
3.2 – TESTES COMPORTAMENTAIS .....	29
3.2.1 – Teste de atividade em campo aberto .....	29
3.2.2 – Labirinto em Y .....	31
3.2.3 – Labirinto aquático de Morris .....	33
3.3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>4. RESULTADOS</b> .....	38
4.1 – EFICIÊNCIA E MORTALIDADE .....	38
4.2 – SAÚDE GERAL DOS ANIMAIS.....	39
4.3 – ATIVIDADE EM CAMPO ABERTO.....	39
4.4 – LABIRINTO EM Y .....	46
4.4 – LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS .....	47
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	60

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO- A.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 – DIABETES MELLITUS, “O MAL DO SÉCULO”

No século II, o médico grego Arateus descreveu uma doença que intrigava os médicos e afligia alguns poucos indivíduos, em seu livro, “Sobre as Causas e Indicações de Doenças Crônicas e Agudas” escreveu: “Os pacientes nunca param de produzir água, o fluxo é incessante, como abrir um aqueduto. A vida é curta, sofrida e dolorosa [...]”. Nesse texto, o médico grego narrou os sintomas de uma grave doença que hoje conhecemos por diabetes mellitus (PORETSKY, 2010).

O termo “diabetes” (dia - através, betes - passar) foi introduzido pelo também médico grego Appolonius, em 230 A.C, uma referência a grande quantidade de água ingerida e excretada pelos seus pacientes. O termo “mellitus” (derivado da palavra grega para mel) foi utilizado muito tempo depois pelo cirurgião inglês John Rollo para diferenciar essa doença do diabetes insipidus, doença ocasionada pela deficiência do hormônio vasopressina, que também causa sede excessiva (LAKHTAKIA, 2010).

Nos dias atuais, diabetes mellitus (DM) é o nome dado a um grupo de desordens metabólicas que tem como característica em comum o acometimento da regulação dos níveis de glicose no sangue, levando invariavelmente à hiperglicemia. Tal característica é decorrente da ineficiência da produção de insulina ou de sua ação, ou mais comumente das duas. A hiperglicemia crônica pode gerar danos sérios no sistema nervoso, nos rins e nos vasos sanguíneos, fatores que estão relacionados com os altos índices de mortalidade dos pacientes diabéticos (KUMAR et al., 2010).

Nas últimas décadas vem se observando um aumento na incidência destas doenças na população adulta, principalmente nos países em desenvolvimento. Tal fato se deve ao estilo de vida adotado pela população nos grandes centros urbanos, que está diretamente relacionado ao risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2. No Brasil, por exemplo, a prevalência de indivíduos diagnosticados com DM em 2013 foi de 9% (em relação a população daquele ano) e a estimativa baseada em várias pesquisas é de que este número chegue a 11,93% em 2035, quase o dobro da população da cidade de São Paulo (GUARIGUATA et al., 2014).

Esta é uma tendência global que vem sendo o centro de preocupação e ação de vários órgãos de saúde internacionais. Estima-se que em 1980 havia 108 milhões

de diabéticos no mundo e que em 2012 essa população chegou a 422 milhões (8,5 % da população adulta). Esse quadro é reflexo do aumento de fatores de riscos associados como o sobrepeso e a obesidade. Em 2012 o diabetes causou a morte de 1,5 milhão de pessoas e, naquele ano, mais 2,2 milhões faleceram vítimas das consequências dos altos índices de glicose no sangue, principalmente por doenças cardiovasculares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Boa parte da preocupação com o controle desta doença se deve as complicações que os tipos de diabetes podem causar, como ataques cardíacos, derrames, falha renal, amputações, perda de visão, e danos no sistema nervoso. Além das graves consequências à saúde dos indivíduos existe também um impacto econômico importante, tanto para os pacientes quanto para os sistemas públicos de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Além das complicações mais bem caracterizadas relacionadas acima, estudos que utilizam testes neurofisiológicos em pacientes vêm apontando que o DM aumenta o risco do desenvolvimento de déficits cognitivos e demência (SAEDI et al., 2016).

A partir de uma investigação clínica realizada em 97 pacientes diagnosticados com diabetes tipo 1 e em 138 indivíduos similares não diabéticos, foi possível demonstrar que o primeiro grupo apresentou uma prevalência de déficits cognitivos clinicamente relevantes 5 vezes maior do que o segundo grupo (NUNLEY et al., 2015).

Uma meta-análise quantitativa realizada a partir de vários estudos longitudinais demonstrou que indivíduos acometidos por diabetes mellitus possuem um maior risco de desenvolver várias formas de demência, como a doença de Alzheimer, demência vascular e déficits cognitivos, do que indivíduos não diabéticos (CHENG et al., 2012). Porém, as causas e mecanismos que levam a esses estados demenciais relacionados a diabetes ainda são pouco conhecidos.

Com o aumento da urbanização e do envelhecimento da população a quantidade de indivíduos idosos com DM tipo 2 vem crescendo, e isso vem se tornando um desafio para os profissionais de saúde, pois as complicações da doença são muito mais severas nesta faixa etária. Além disso, complicações pouco presentes em indivíduos mais jovens, como a demência, estão se tornando mais prevalentes.

Algo semelhante também ocorre com indivíduos acometidos pela diabetes tipo 1 mas, nesse caso, há um aumento significativo da expectativa de vida desde o

início da produção de insulina humana através do uso de tecnologia recombinante de DNA, no início da década de 1980 (MILLER et al., 2012).

Nesse contexto, hoje a população de pacientes em idade avançada com diabetes mellitus tipo 1 e 2 tende a ser muito maior do que um dia fora, e a incidência das consequências a longo prazo dessa doença, como os prejuízos cognitivos, só tende a aumentar. Assim, compreender e investigar os mecanismos pelos quais a DM causa defeitos cognitivos é imprescindível, tanto para o desenvolvimento de terapias quanto para a mudança da avaliação de risco dessa doença.

## 1.2 – PATOGÊNESE DA DIABETES MELLITUS TIPO 1 E TIPO 2

Os níveis de glicose no sangue são normalmente mantidos em uma faixa pouco variável de 70 a 110 mg/dl (ou de 3.9 mmol/l a 6.1 mmol/l), com algumas flutuações, logo após as refeições ou a prática de atividade física. O sistema que regula essa concentração depende da secreção de hormônios do pâncreas, sendo fundamental para a homeostase do organismo. Como os neurônios não podem sintetizar glicose e os astrócitos tem uma capacidade reduzida de armazenamento, o sistema nervoso central (SNC) necessita de um influxo contínuo desse combustível metabólico, assim, uma redução brusca na concentração de glicose no sangue (hipoglicemia) pode acarretar em danos neurológicos severos (CRYER, 2007).

Da mesma forma, níveis elevados de glicose no sangue (hiperglicemia) podem causar sérios distúrbios no organismo, o mais grave deles, o estado hiperosmolar hiperglicêmico, que pode levar os indivíduos acometidos ao coma e a morte. Logo, a manutenção dos níveis de glicose em uma faixa normal é um ponto extremamente crítico e defeitos em seus mecanismos geralmente resultam em graves consequências (PASQUEL; UMPIERREZ, 2014).

A DM se manifesta quando há a desregulação de algum mecanismo responsável por reduzir os níveis de glicose no sangue. Na DM tipo 1, a insulina, hormônio pancreático responsável por induzir a entrada de glicose em algumas células, tem sua secreção comprometida pela destruição seletiva de suas células produtoras, as células  $\beta$  pancreáticas. Esse tipo de diabetes representa apenas 10% dos casos e normalmente é causada por doenças autoimunes crônicas, sendo a

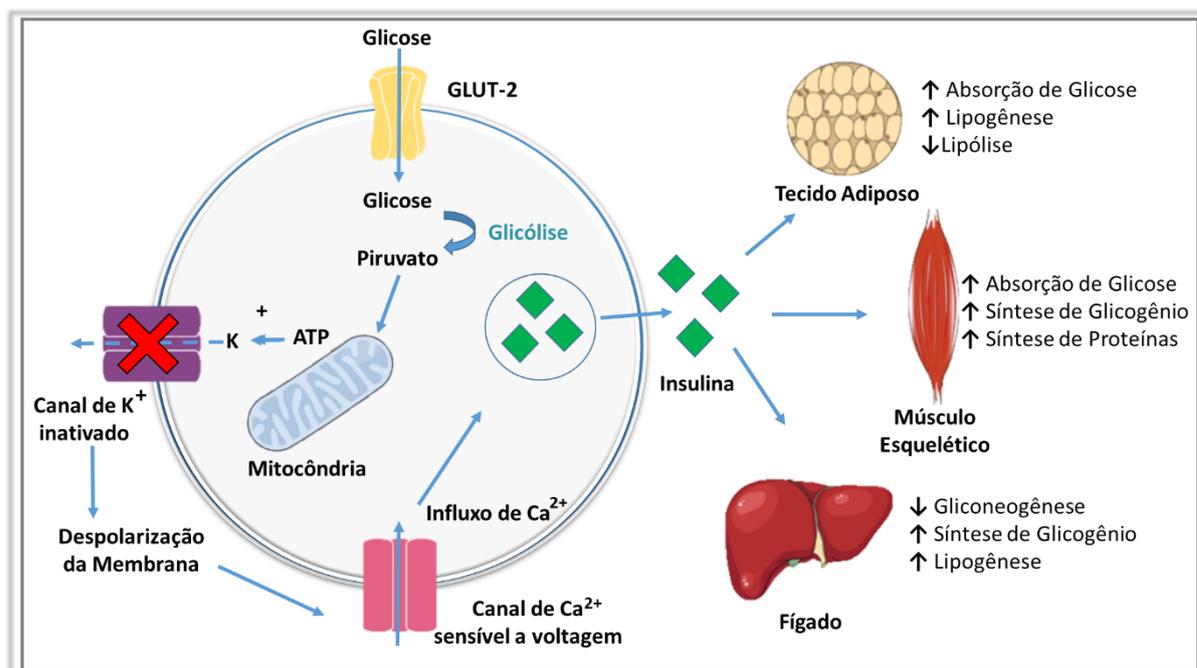
grande maioria dos pacientes diagnosticados antes dos 20 anos de idade (KUMAR et al., 2010).

Vários fatores regulam a síntese e a liberação de insulina nas células  $\beta$  pancreáticas, como alguns ácidos graxos e algumas catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), porém, o estímulo mais importante para a liberação de insulina é a própria glicose (HERMAN; KAHN, 2006). As células  $\beta$  ficam localizadas em uma região do pâncreas altamente vascularizada, que permite a detecção dos níveis de glicose no sangue. Estas estão agrupadas em formações conhecidas como Ilhotas de Langerhans, juntamente com as células  $\alpha$  (produtoras de glucagon) e as células  $\zeta$  (produtoras de somatostatina).

A glicose entra nas células  $\beta$  através do canal transportador de glicose 2 (GLUT-2), a partir de então inicia a respiração celular, que tem por produto final adenosina trifosfato (ATP). Esta molécula se liga a um canal de íons potássio inibindo-o e gerando uma despolarização da membrana (o potencial de membrana da célula passa a ficar levemente positivo), isso ativa um canal de íons cálcio sensível a voltagem e, quando este canal se abre, há um aumento significativo da concentração de íons cálcio citoplasmático, culminando na secreção de insulina armazenada em vesículas (Figura 1) (HERMAN; KAHN, 2006).

A insulina liberada tem por principal função aumentar a taxa de transporte de glicose dentro de alguns tipos celulares, aumentando assim a produção de energia. Essas células são as que formam os músculos estriados esqueléticos e os adipócitos, estas possuem um receptor de insulina que quando ativado gera uma cascata de fosforilação de vários substratos intracelulares, facilitando a migração e o acoplamento do transportador de glicose dependente de insulina 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática. Desta forma, a taxa de transporte de glicose para dentro destas células aumenta e a concentração no sangue é reduzida (KAHN, 1985).

Em vista disso, quando há a destruição das células  $\beta$  na DM tipo 1 a sinalização de insulina para o aumento de transportadores GLUT-4 na membrana dos tecidos periféricos é encerrada e os níveis de glicose no sangue passam a ser extremamente elevados (acima de 126 mg/dl, em jejum). Por isso, pacientes acometidos por DM tipo 1 são denominados de insulino dependentes, precisando fazer reposições constantes de insulina para controlar a sua glicemia (OZOUGWU et al., 2013).



**Figura 1 - Regulação da liberação de insulina e sua atividade.** A esquerda, mecanismo da liberação de insulina nas células  $\beta$  do pâncreas induzida por glicose. A direita, principais atividades da insulina em seus tecidos alvo.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma Mind the Graph.

A DM tipo 2 é a forma mais prevalente, acometendo cerca de 90% dos pacientes, que geralmente são afetados por dois defeitos metabólicos, a redução da resposta do tecido periférico à insulina (resistência à insulina) e uma disfunção na secreção de insulina pelas células  $\beta$ . Essa é uma doença multifatorial e complexa, com vários fatores de risco como sedentarismo, alimentação não balanceada, obesidade e um forte componente genético (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A resistência à insulina é o primeiro defeito metabólico a se manifestar e decorre de defeitos na sinalização da insulina, tanto nos seus receptores, quanto nas reações de fosforilação subsequentes que acoplam GLUT-4 à membrana. Esses defeitos podem ser decorrentes de vários fatores, como alto índice de triglicerídeo intracelular no tecido muscular e nos hepatócitos, inflamação, e a liberação de citocinas adiposas, sendo todos esses fatores intimamente relacionados à obesidade (OZOUGWU et al., 2013).

Como os tecidos alvo da insulina desenvolvem resistência a este hormônio, as células  $\beta$  iniciam um mecanismo compensatório e passam a produzir grandes

quantidades de insulina. Esse mecanismo de hiperinsulinemia pode controlar os níveis de glicose no sangue por vários anos, porém, eventualmente esta reposta chega a um limite e se torna inadequada, levando a hiperglicemia. Os fatores que levam à disfunção das células  $\beta$  podem ser múltiplos e vários defeitos genéticos vêm sendo apontados como protagonistas (BOUCHER; KLEINRIDDERS; KAHN, 2014).

## 1.2 – MODELOS ANIMAIS DE DIABETES MELLITUS TIPO 1

Ao longo de várias décadas pesquisadores vêm desenvolvendo modelos animais de DM tipo 1 para compreender a sua etiologia, patofisiologia e suas consequências no organismo. De fato, boa parte do que se conhece hoje sobre essa doença teve início nesses modelos.

A princípio os métodos utilizados eram extremamente invasivos e pouco específicos. A pancreatectomia e a injeção de extrato de pituitária eram largamente empregadas em ratos e outras espécies, porém, estes dois modelos acabavam comprometendo outros tecidos e órgãos, gerando efeitos colaterais graves geralmente não presentes na doença em si (CAGLE, 1950).

Em 1943, McLetchie e colaboradores anunciaram a descoberta de um novo método, mais específico. Eles investigavam a patogênese de lesões renais decorrentes de transfusões sanguíneas entre tipos sanguíneos não compatíveis, testando, em coelhos, substâncias semelhantes ao ácido úrico. Uma dessas substâncias era a aloxana, produto da oxidação do ácido úrico. Quando esta substância era administrada os animais tendiam a morrer cedo, apresentando sintomas não relacionados a falha renal. Assim que esses animais foram avaliados, através de estudos histopatológicos, foi possível observar que havia lesões em suas Ilhotas de Langerhans (CAGLE, 1950).

A partir de então, estudos utilizando a administração de aloxana confirmaram que várias espécies de animais apresentavam um quadro permanente de diabetes muito semelhante aqueles de pacientes com DM tipo 1 (BRUNSCHWIG; ALLEN, 1943).

A aloxana (1,3-diazinane-2,4,5,6-tetrone) é uma molécula bastante instável que possui uma estrutura muito semelhante à glicose, característica responsável pelo seu efeito citotóxico nas células  $\beta$  pancreáticas. Assim como a glicose, a aloxana



Esses radicais geram sérios danos ao DNA das células, o que acaba levando a necrose celular (Figura 2 – B) (LENZEN, 2008).

Outras células que também possuem o GLUT-2 na membrana celular, como os hepatócitos e algumas células dos túbulos renais, não sofrem os danos oxidativos iniciados pela aloxana por conterem mais defesas antioxidantes contra radicais hidroxila do que as células  $\beta$  pancreáticas, principalmente a enzima antioxidante catalase (MUNDAY, 1988).

Outro modelo de indução de DM tipo 1 muito empregado utiliza um agente antimicrobiano denominado de estreptozotocina. Este atua de forma semelhante à aloxana, causando a necrose específica das células  $\beta$  pancreáticas. Diferentemente da aloxana a estreptozotocina é uma molécula mais estável a 37°C, o que em algumas condições pode resultar em uma maior eficiência do seu efeito citotóxico. A estreptozotocina causa a necrose das células através da alquilação do DNA (LENZEN, 2008).

### 1.3 –HIPOCAMPO E MEMÓRIA

O caso de Henry Molaison é provavelmente um dos mais conhecidos e documentados da história das neurociências. Henry sofria a muitos anos com ataques epiléticos severos, que se mostraram intratáveis. Como tentativa de dar fim aos ataques, ele foi submetido a uma cirurgia drástica, seus dois lobos temporais mediais, porção que contem a formação hipocampal foram removidos. Após a cirurgia os ataques de epilepsia se tornaram menos frequentes, porém, o paciente apresentava um déficit de memória específico, sua amnésia era seletiva a acontecimentos recentes, enquanto grande parte de suas memórias anteriores a cirurgia permaneceram intactas (SCOVILLE; MILNER, 1957).

A partir do estudo do caso clínico de Henry Molaison, duas conclusões fundamentais para o entendimento da memória e do aprendizado puderam ser tomadas. Como o paciente não conseguia formar novas memória relacionadas a fatos e a experiências pessoais, mas conseguia, por exemplo aprender novas habilidades motoras, pode-se determinar que existem várias formas de memória e que para a retenção de alguns tipos a formação hipocampal é imprescindível (ANDERSEN et al., 2007).

Esses tipos de memória podem ser classificados de acordo com o período que são retidas em memória de curto prazo, e memória de longo prazo. A primeira categoria geralmente tem duração de alguns segundos e a segunda tempo indeterminado. A memória de longo prazo pode ser subdividida em duas categorias, a memória implícita, responsável por guardar informações que não necessitam ser evocadas conscientemente e a memória explícita, que depende da consciência. A memória explícita pode ainda ser dividida em duas categorias a memória semântica, responsável pelo armazenamento de fatos e conceitos e a memória episódica, responsável pelo armazenamento de memória autobiográfica (ALLEN; FORTIN, 2013).

Além disso o caso de Henry Molaison mostrou que a formação hipocampal é uma estrutura fundamental para a formação da memória de longa duração. Esta estrutura é formada pelo hipocampo propriamente dito, formado pelas subunidades Corno de Amon 1, 2 e 3 (CA1, CA2 e CA3), o giro denteado (GD), o subculum, o parasubculum, o pré-subculum e córtex entorrinal. O GD é uma região hipocampal cortical trilaminar que apresenta uma característica peculiar quanto à forma em V ou U. As principais células que constituem o GD são as células granulares, que recebem projeções do córtex entorrinal através da via perfurante e se conectam a CA3 a partir das fibras musgosas (ANDERSEN et al., 2007).

A memória espacial é um tipo de memória explícita dependente da formação hipocampal. Esta é responsável por armazenar informações sobre o espaço aloentríco (independente do ponto de vista). Esse tipo de memória envolve a habilidade para codificar, armazenar e recuperar informações sobre localizações espaciais, configurações ou rotas. Dessa forma, sua função permite lembrar a localização de objetos ou encontrar um trajeto dentro de um ambiente (SHRAGER et al., 2007).

A memória espacial é intensamente investigada em roedores através de testes comportamentais bastante consolidados na literatura. O mais predominante é o labirinto aquático de Morris, considerado o “padrão ouro” no estudo da memória principalmente em relação a danos nos circuitos da formação hipocampal (VORHEES; WILLIAMS, 2006). Outros testes bastante utilizados que refletem alterações hipocampais são os labirintos de braços radiais, principalmente o T-maze e o Y-maze.

## 1.5 –DIABETES MELITUS E DÉFICITS DE MEMÓRIA

Déficits cognitivos vêm sendo documentados em modelos de diabetes em roedores. Por exemplo, ratos e camundongos tratados com a toxina estreptozotocina, um modelo de diabetes tipo 1, demonstraram prejuízos na performance em testes dependentes de memória espacial. No entanto, os mecanismos responsáveis por tais disfunções cognitivas em quadros diabéticos ainda não foram estabelecidos (BIESSELS et al., 1994).

Na formação hipocampal modificações na força das sinapses entre grupos de neurônios são críticas para certos tipos de aprendizado e memória. No nível do giro denteado essas modificações vão além, pois nesta região há o constante surgimento de novos neurônios durante a vida adulta. Várias evidências vêm demonstrando que tanto a plasticidade sináptica quanto a neurogênese adulta são prejudicadas pela diabetes (ANDERSEN et al., 2007).

Pacientes que não realizam o controle da diabetes normalmente apresentam uma grande ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), resultando em níveis elevados de cortisol circulante. De maneira similar níveis elevados de corticosterona também são encontrados em roedores em modelos experimentais de diabetes.

A partir disto, um estudo realizado em camundongos utilizando o modelo de diabetes tipo 1, através do uso de estreptozotocina, deu um primeiro passo no entendimento de como a diabetes pode afetar a neurogênese e a memória. Utilizando métodos de controle dos níveis de corticosterona os autores puderam comparar dois grupos de camundongos diabéticos, um com níveis elevados de corticosterona e outro com níveis normais de corticosterona. O primeiro grupo apresentou uma redução significativa da proliferação celular na ZSG do DG e desempenho deficiente no labirinto aquático de Morris com relação ao segundo. Desta forma, os autores estabeleceram que o prejuízo da função hipocampal é mediada pelos altos índices de corticosterona (STRANAHAN et al., 2008).

Apesar de não se compreender por que mecanismos a corticosterona gera tais prejuízos, algumas evidências vêm sugerindo que componentes neuroinflamatórios estejam envolvidos. Ho e colaboradores demonstraram que o tratamento com indometacina (anti-inflamatório não esteroide não seletivo) por três semanas consegue reverter a redução da proliferação celular na ZSG do GD em

modelo murino de diabetes tipo 1 (HO et al., 2015). Porém, não se estabeleceu a influência de tal reversão no desempenho de animais diabéticos em testes comportamentais dependentes do hipocampo.

## 1.5 – INDOMETACINA E NEUROGÊNESE

A indometacina (Ácido 2-{1-[(4-clorofenil)carbonil]-5-metoxi-2-metil-1*H*-indol-3-il}acético) é um medicamento anti-inflamatório não esteroide (AINE) largamente utilizado no tratamento de artrite reumatoide, osteoartrite, lesões musculoesqueléticas, dismenorreia e dores pós-operatórias. O seu principal mecanismo de ação é a inibição da enzima ciclo-oxigenase, tal ação, bloqueia a produção de prostaglandinas e tramboxanos a partir do precursor ácido araquidônico (LUCAS, 2016).

Como a Indometacina é um AINE não seletivo, esse medicamento bloqueia as duas principais isoformas da ciclo-oxigenase a COX-1 e a COX-2. Essa última é considerada na maioria dos casos induzida, pois é expressa durante o processo inflamatório em vários tipos celulares que mediam a inflamação. Sua inibição está relacionada aos efeitos anti-inflamatório, analgésico e antipirético do fármaco. A COX-1 é considerada constitutiva, pois produz várias prostaglandinas responsáveis por manter a homeostase de vários tecidos e órgãos, como a citoproteção da mucosa gástrica. O bloqueio desta isoforma está relacionado na maioria dos casos aos efeitos adversos ocasionados pelo tratamento com Indometacina (LUCAS, 2016).

Assim como outros AINEs a Indometacina atravessa a barreira hematoencefálica atingindo rapidamente o sistema nervoso central após a sua administração. Estudos em modelos animais vêm demonstrando que o uso deste medicamento pode ter um papel importante na proteção e no combate de doenças neurodegenerativas como o Parkinson e o Alzheimer (PAREPALLY; MANDULA; SMITH, 2016).

Como a neuroinflamação é um dos fatores que prejudica o desenvolvimento normal da neurogênese do giro denteado da formação hipocampal o uso da indometacina vem sendo avaliado na redução de tais prejuízos. Bastos e colaboradores demonstraram em um modelo de neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS), em camundongos, que o tratamento com indometacina

apresentou um efeito protetor protegeu totalmente contra a redução da neurogênese causada pelo LPS (BASTOS et al., 2008).

Existem também evidências que a indometacina pode ter efeitos benéficos sobre a neurogênese na zona subventricular após uma lesão. Leal e colaboradores demonstraram que animais que sofreram isquemia estriatal focal induzida por endotelina-1 quando tratados com indometacina apresentam uma redução significativa da ativação microglial assim como um aumento da proliferação de neuroblastos na zona subventricular (LOPES et al., 2016).

Apesar do tratamento com indometacina se mostrar benéfico em relação a neurogênese, um componente fundamental da plasticidade neuronal, existe uma escassez de estudos que relacionam tal benefício à modificações comportamentais. Determinar se a ação deste fármaco sobre eventos celulares possui a capacidade de se refletir sobre a cognição é de fundamental importância para proposição de um possível tratamento clínico, principalmente em patologias tão frequentes quanto o diabetes mellitus.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do tratamento com indometacina sobre a memória e o aprendizado em um modelo murino de diabetes mellitus tipo 1.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar em camundongos submetidos a um modelo de diabetes mellitus tipo 1 os efeitos do tratamento com indometacina sobre:

- a) A locomoção e o estado ansioso dos animais em teste de campo aberto;
- b) A memória de trabalho empregando o labirinto de braços radiais Y-maze;
- c) O aprendizado espacial empregando o labirinto aquático de Morris;
- d) A memória espacial empregando o labirinto aquático de Morris.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi previamente analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade do Estado do Pará (CEUA-UEPA), conforme o protocolo nº 05/2017 (Anexo A) e toda a metodologia utilizada foi baseada nas Diretrizes Brasileiras Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos – DBCA.

#### 3.1 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 20 camundongos (*Mus musculus*) machos, da linhagem Swiss, com idade entre 6 e 7 semanas, pesando entre 25 e 30 gramas. Os animais foram oriundos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA e mantidos no Biotério do Laboratório de Neuropatologia Experimental no Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará.

Estes foram alojados em gaiolas de plástico (30 x 20 x 13 cm), sendo acomodados aleatoriamente 5 animais em cada uma, e todas as gaiolas permaneceram em um rack ventilado. Os animais tiveram acesso *ad libitum* a água e ração e o ambiente foi mantido em um ciclo de 12 h de claro e escuro e temperatura aproximada de 24°C. Foi adotado um período de aclimação de 7 dias antes do início dos experimentos.

#### 3.2 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

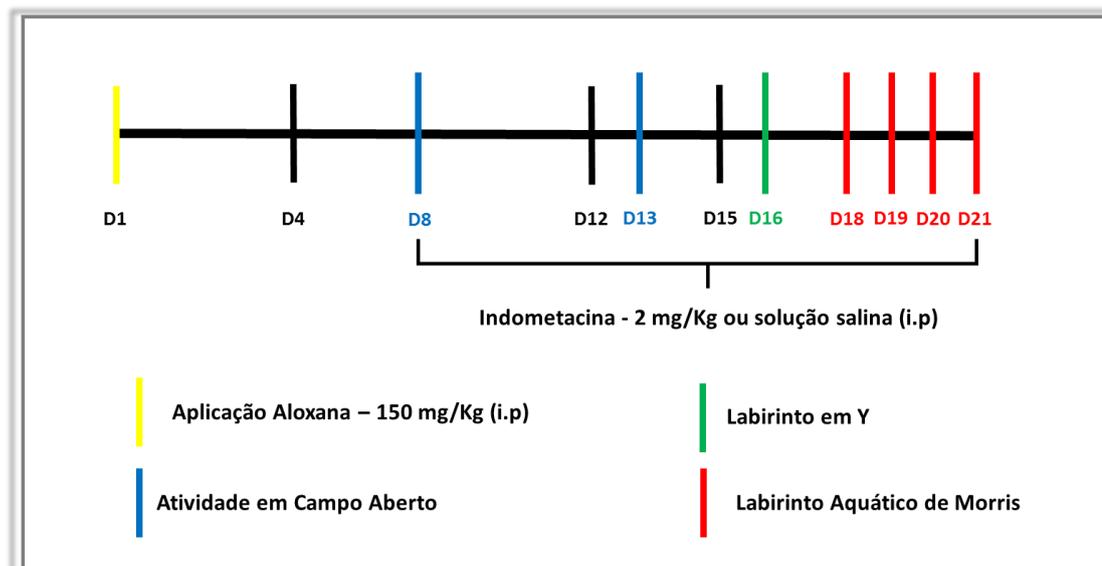
Após o período de aclimação os animais foram submetidos a um jejum de 24h e, após esse intervalo, divididos em dois grupos. O primeiro, composto por 15 animais, recebeu a aplicação do indutor de diabetes aloxana monoidratada na dose de 150 mg/Kg diluído em salina, via intraperitoneal (MAMUN et al., 2016). O segundo grupo, contendo 5 animais, recebeu um volume equivalente de solução salina intraperitoneal e formou o grupo veículo. Previamente, todos os animais tiveram suas

concentrações de glicose no sangue mensuradas, com um medidor de glicemia digital, através de amostras de sangue coletadas da cauda dos animais.

Após um intervalo de 72h os níveis glicêmicos foram novamente medidos. Animais com concentração de glicose no sangue igual ou superior a 200 mg/dl foram considerados diabéticos.

No sétimo dia após a aplicação da solução de aloxana monoidratada os grupos experimentais restantes foram formados. Como a expectativa de mortalidade dos animais é de 33%, foi feita a projeção de que apenas 10 animais dos 15 iniciais sobreviveriam até este dia. Desta forma, dois grupos contendo 5 animais foram formados, um grupo denominado “Aloxana + Indometacina” e outro denominado “Aloxana”. O primeiro recebeu uma dose diária do inibidor não seletivo de ciclo-oxigenases, indometacina, na dose de 2 mg/Kg via intraperitoneal (em solução salina com 1% de dimetilsufóxido) durante duas semanas, de acordo com protocolo previamente estabelecido (HO et al., 2015). O segundo grupo recebeu um volume equivalente de solução salina com 1% de dimetilsufóxido, via intraperitoneal, diariamente pelo mesmo intervalo de tempo.

Durante o período de tratamento foram realizadas avaliações periódicas da massa dos animais, para que se tenha um controle do seu estado geral de saúde e medições da glicemia e para que se confirme o estado diabético durante o experimento, além de testes comportamentais com o intuito de avaliar alterações no aprendizado, memória e na atividade exploratória dos animais, como é detalhado na Figura 3.



**Figura 3- Sequência de eventos do modelo experimental.** O período total do experimento foi de 21 dias, tendo como início a aplicação da solução de aloxana monoidratada. Durante este período foram realizadas 4 pesagens dos animais, nos dias D1, D8, D15 e D21. Foram também feitas 4 medições de glicemia, nos dias D1, D4, D12 e D21. O teste de atividade em campo aberto foi realizado duas vezes nos dias D8 e D13. O teste do labirinto em Y foi aplicado em um único dia, D16. E o teste do labirinto aquático de Morris ocorreu nos últimos quatro dias do período, D18, D19, D20 e D21. No último dia (D21) os animais foram perfundidos e o encéfalo e o sangue coletados para análises de imunofluorescência e análise bioquímica, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 3.2 – TESTES COMPORTAMENTAIS

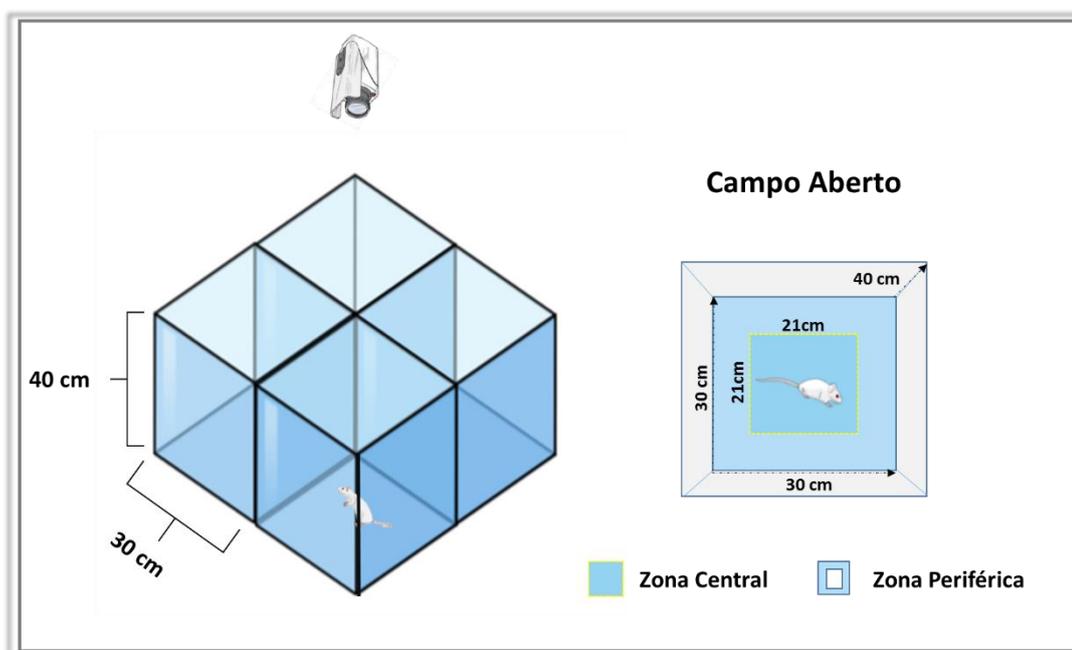
Todos os testes comportamentais foram realizados entre 8h e 12h (ciclo claro), na mesma sala de testes com o mesmo nível de luminosidade (15 Lux), medido através de um luxímetro. Os testes foram todos filmados através de um sistema de captação de imagem computadorizado e analisados através do software ANY-maze Video Tracking System (StoeltingCo©). Antes do início de cada teste os animais foram levados para a sala de experimentação e foi estabelecido um período de ambientação de 30 minutos.

### 3.2.1 – Teste de atividade em campo aberto

Para se avaliar a atividade exploratória e o estado de ansiedade dos animais, estes foram submetidos ao teste do campo aberto em dois dias diferentes (D8 e D13).

Tal teste consiste em se colocar o animal em um aparato quadrangular (30 x 30 x 40cm) feito de acrílico opaco com o fundo preto, por um período de 5 minutos. O aparato utilizado possui quatro espaços, o que permite a realização de quatro testes de maneira simultânea. Ao fim de cada teste o aparato foi limpo com solução de álcool etílico 10% para que pistas olfatórias sejam eliminadas.

Utilizando o software ANY-maze Video Tracking System, foi realizada a divisão da base do aparato em duas zonas. A primeira será a zona central (ZC), um quadrado de dimensões de 21 x 21 cm (441 cm<sup>2</sup>), a segunda a zona periférica (ZP), região mais próxima às paredes do aparato com dimensões de 30 x 30 cm (900 cm<sup>2</sup>), como pode ser observado na representação esquemática a seguir (Figura 4).



**Figura 4 - Representação ilustrativa do teste do campo aberto.** A esquerda, ilustração do aparato a ser utilizado com suas respectivas dimensões. A direita, visualização superior do esquema da divisão realizada pelo software em zona central zona periférica. O aparato real possui as paredes cinza e a base preta, para que se mantenha o maior contraste possível em relação a cor do animal.

Fonte: Elaborado pelo autor utilizando a plataforma Mind the Graph.

Os parâmetros avaliados pelo software foram o tempo de permanência (TP) e distância percorrida (DP) em ambas as zonas, ZC e ZP. Além da distância total (DT) percorrida durante o tempo total (TT) do teste, que é de 5 minutos. Utilizando estes parâmetros foi possível avaliar a diferença na atividade exploratória do animal entre

as duas zonas, de acordo com (SIQUEIRA MENDES, 2014). Tal diferença é dada pelo índice de contraste (IC), que é obtido através da seguinte equação:

$$IC = [(XP - XC) / (XP + XC)] * 100, \text{ onde:}$$

IC = índice de contraste

X = parâmetro em avaliação (tempo ou distância)

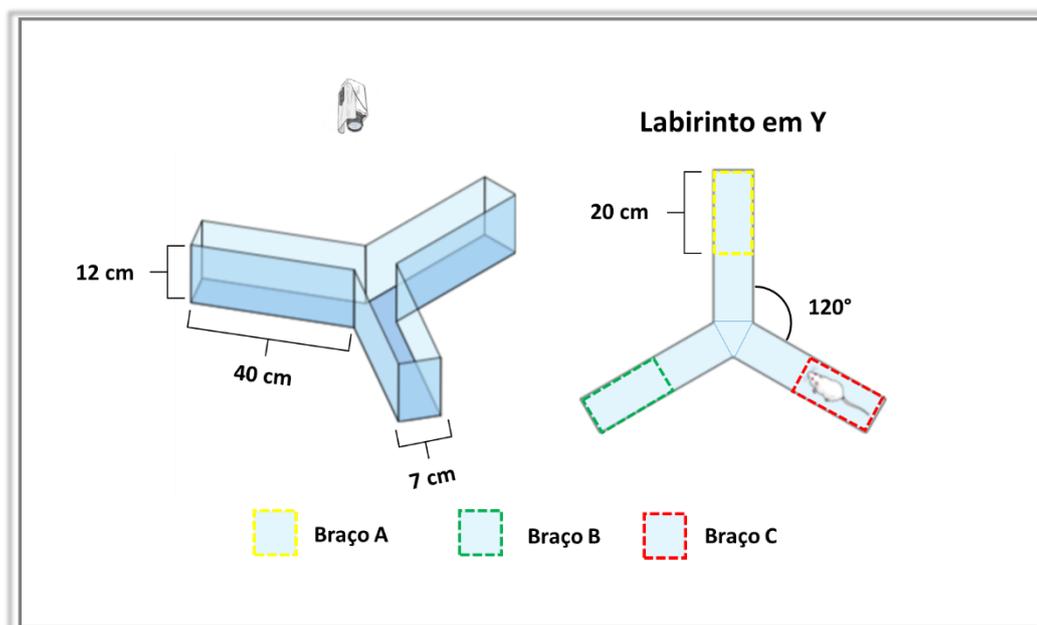
C = referente ao centro

P = referente a periferia

O índice de contraste permite uma melhor compreensão dos resultados obtidos, pois tem a capacidade de criar uma razão entre o comportamento do animal nas duas zonas delimitadas, tanto em relação ao tempo quanto em relação a distância. Desta forma, mostrando a preferência do animal por determinada zona em forma de porcentagem.

### **3.2.2 – Labirinto em Y**

No décimo sexto dia foi realizado o teste do labirinto em Y, tal teste tem como finalidade a avaliação da memória de trabalho. A metodologia a ser utilizada é baseada no trabalho de (MAURICE et al., 1994), com modificações pontuais. O aparato a ser utilizado consiste em 3 braços idênticos de 40 cm de comprimento, 7 cm de largura e 12 cm de altura, dispostos em forma de “Y”. Entre cada braço há um ângulo aberto de 120°, o que gera em sua convergência no centro um triângulo equilátero de lado 7cm, como é indicado na Figura 5.



**Figura 5 - Representação ilustrativa do teste do labirinto em Y.** A esquerda, ilustração do aparato utilizado com suas respectivas dimensões. A direita, visualização superior do esquema da divisão realizada pelo software em braço A, braço B e braço C. O aparato real é totalmente constituído de acrílico azul escuro, para que se mantenha o contraste em relação a cor do animal.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma Mind the Graph.

Os animais foram colocados na extremidade de um dos braços (escolhido de forma aleatória) e foi permitida a exploração espontânea do aparato durante 8 minutos. Toda a movimentação do animal durante este período foi gravada utilizando um sistema de captura de imagens computadorizado. Posteriormente foi realizada a análise de alternâncias espontâneas entre os braços.

Com o auxílio do software ANY-maze Video Tracking System, os braços foram divididos ao meio, e as extremidades de cada braço formaram três zonas distintas, a zona do braço A a zona do braço B e a zona do braço C, (Figura 5). Foi contado como uma entrada o momento em que o animal esteve com todas as patas dentro de uma zona. Desta forma foi possível fazer uma relação da ordem de todos os braços visitados pelo animal durante os 8 minutos.

A partir desta relação foi possível realizar o cálculo da porcentagem de alternância espontânea, ou seja, uma medida que reflete a preferência do animal em visitar um braço “novo” em relação a um braço previamente visitado. Esta medida é encontrada a partir da seguinte equação:

$$Ae = \left( \frac{\text{Número de Alternâncias realizadas}}{\text{Chance de realizar uma alternância} - 2} \right) * 100, \text{ onde:}$$

Ae = Porcentagem de Alternância Espontânea

Uma alternância foi considerada quando o animal entrou de forma consecutiva em três braços distintos (exemplo: ABC, BCA, CAB, mas não BCB). Sendo assim, o “número de alternâncias realizadas” é a soma de todas as alternâncias que ocorreram durante o teste. Já a “chance de realizar uma alternância” é o número total de entradas, pois cada entrada é considerada como uma oportunidade de o animal realizar uma alternância.

Desta forma um animal que realize a seguinte sequência de entradas: ABCABCACB, teria um número de alternâncias realizadas igual a 6 e as suas chances de realizar uma alternância igual a 9 (número total de entradas). Sendo assim, sua porcentagem de alternância será igual a 75%. Ou seja, de todas as chances que o animal teve para realizar uma alternância apenas em 75% delas ele de fato a realizou.

Após o término de cada teste o aparato foi totalmente limpo com uma solução de álcool etílico 10%, para eliminar qualquer pista olfativa remanescente do teste anterior.

### 3.2.3 – Labirinto aquático de Morris

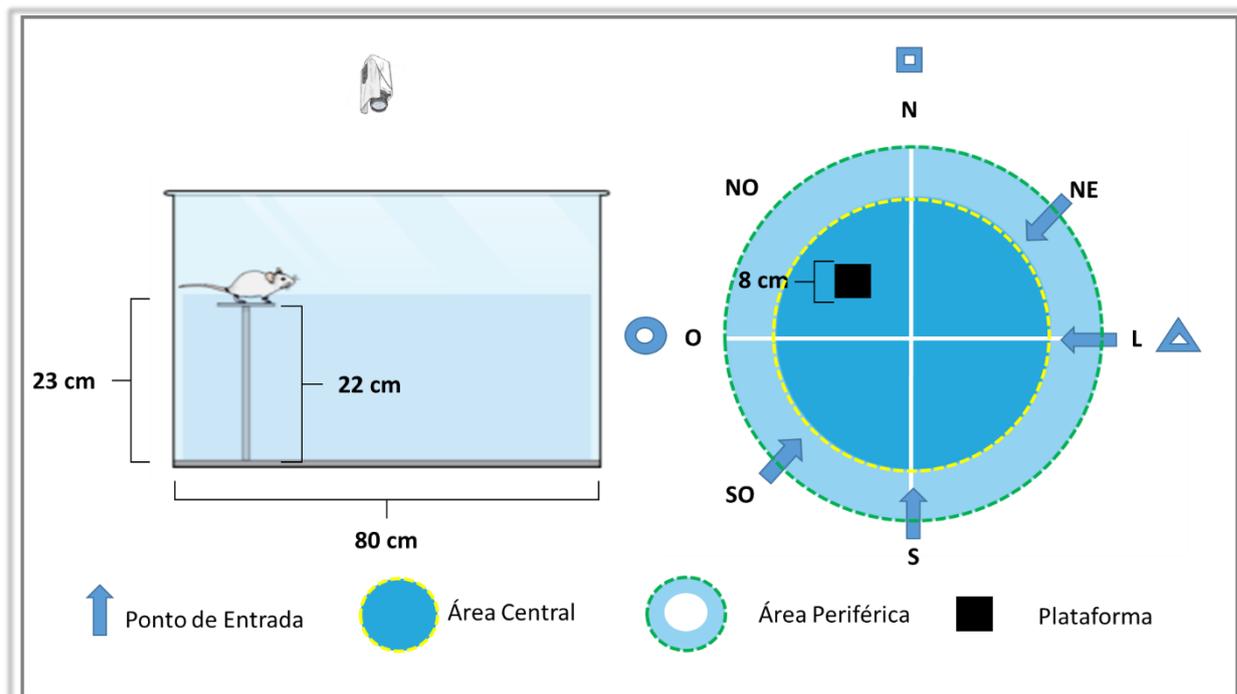
O teste comportamental do labirinto aquático de Morris foi desenvolvido por Richard Morris em 1981 para determinar alterações no aprendizado e na memória de ratos, a partir do protocolo original várias variantes surgiram para adaptar o teste a outras espécies ou a outras condições. O teste a ser realizado neste trabalho seguiu o protocolo de outros autores (CZECH; NIELSON; LAUBMEIER, 2000), com modificações pontuais.

O teste foi realizado em 4 quatro dias consecutivos (D18, D19, D20 e D21). Nos três primeiros dias o teste ocorreu em uma piscina cilíndrica (80 cm de diâmetro), preenchida com água até a altura de 23 cm, deixando submersa uma plataforma de 22 cm de altura, com base quadrada de 64 cm<sup>2</sup>. Esta plataforma permaneceu fixa

durante os três primeiros dias de teste e invisível, para tal a água será tingida com corante preto inodoro.

A piscina foi dividida em quatro quadrantes idênticos a partir de dois eixos virtuais perpendiculares que têm como referência os pontos cardiais, um eixo Norte-Sul e um eixo Leste-Oeste. A configuração de tais pontos foi determinada a partir da perspectiva do experimentador, o Sul do aparato foi o ponto mais próximo a ele, o Norte o ponto mais distante, o Oeste o ponto mais à esquerda e o Leste o ponto mais à direita. A partir de então um dos quadrantes foi selecionado para conter a plataforma durante os três dias iniciais, no caso deste experimento o quadrante noroeste (NO) foi escolhido, como pode ser observado na Figura 6.

Durante estes dias cada animal foi colocado no aparato por quatro vezes (quatro ensaios). Os pontos de entrada dos animais foram os mais equidistantes possíveis em relação a posição da plataforma, para isto foram selecionados dois pontos cardiais, Sul e Leste e dois pontos colaterais, Noroeste e Sudoeste (**Figura 6**). Os animais foram gentilmente colocados nestes pontos, na periferia da piscina com a cabeça virada para as paredes.



**Figura 6 - Representação ilustrativa dos três primeiros dias do teste do labirinto aquático de Morris.** A esquerda, ilustração do aparato utilizado com suas respectivas dimensões. A direita, visualização superior com todos os pontos de entrada utilizados, as divisões realizadas pelo software em zona central e zona periférica e as pistas visuais distais. O aparato real foi preenchido com água totalmente tingida com corante preto atóxico.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma Mind the Graph.

Cada um destes ensaios teve a duração máxima de 60 segundos ou foi encerrado 10 segundos após o animal ter encontrado a plataforma, o intervalo entre os ensaios foi de 60 segundos. Quando o período do teste se encerrava e a plataforma não era encontrada o animal era guiado até esta e lá permanecia por 10 segundos. As sequências dos pontos de entrada foram aleatoriamente rearranjadas a cada dia. Três pistas visuais distais foram dispostas fora do aparato, para servirem de pontos de referência e a água permaneceu com temperatura próxima de 22°C.

Todos os ensaios foram filmados utilizando um sistema de captura de imagens computadorizado e as análises foram realizadas no software ANY-maze Video Tracking System, com o auxílio deste foram criadas duas zonas, uma central (com área de 2826 cm<sup>2</sup>) e uma periférica (com área de 2198 cm<sup>2</sup>). A presença destas duas zonas permitiu avaliar o comportamento de tigmotaxia dos animais. Utilizando este software outros parâmetros também foram avaliados, como a velocidade média de deslocamento, distância total percorrida e a latência de escape.

A latência de escape (tempo que o animal leva para encontrar a plataforma) foi o parâmetro utilizado para determinar a taxa de aprendizado. Para tal, a latência do terceiro dia foi comparada com a do dia inicial, utilizando a equação do índice de contraste, como realizado anteriormente por outros autores (DINIZ et al., 2010). O índice de contraste foi obtido a partir da equação:

$$IC = \frac{(L1-L3)}{(L1+L3)}, \text{ onde:}$$

IC = índice de contraste;

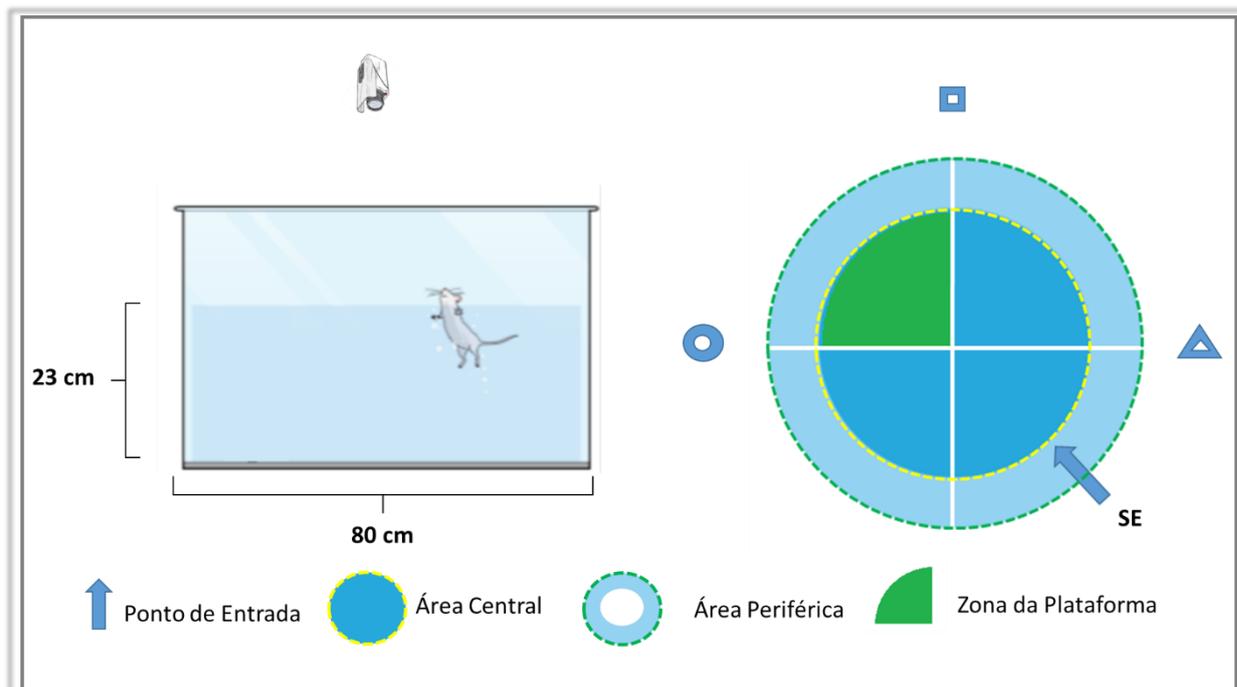
L1 = Latência para encontrar a plataforma no 1º dia;

L3 = Latência para encontrar a plataforma no 3º dia.

Tanto L1 quanto L3 foram obtidos a partir da média da latência de escape dos quatro ensaios realizados nos respectivos dias. Após isto, foi feita a análise do índice de contraste entre cada um dos três grupos.

Um dia após a última sessão de ensaios (4º dia), a plataforma foi removida e todos os outros elementos e condições do aparato permaneceram os mesmos dos dias anteriores. Isto foi feito com o intuito de se avaliar a memória de retenção dos animais. Neste dia o teste também teve a duração de 60 segundos, porém os animais foram colocados apenas uma vez no aparato em um ponto de entrada não utilizado anteriormente e com a maior distância possível da posição onde a plataforma estava, SE (Figura 7).

Neste dia uma zona adicional foi traçada no aparato, o quadrante no qual a plataforma estava localizada será a zona da plataforma. Também utilizando o software ANY-maze Video Tracking System foi avaliado a distância total percorrida, o tempo e a distância na zona central, na zona periférica e na zona da plataforma. Estes dois últimos parâmetros a serem avaliados foram utilizados para determinar a memória de retenção dos animais.



**Figura 7 - Representação ilustrativa do último dia do teste do labirinto aquático de Morris.** A esquerda, ilustração do aparato utilizado com suas respectivas dimensões. A direita, visualização superior com o ponto de entrada utilizado, as divisões realizadas pelo software em zona central, zona periférica, zona da plataforma e as pistas visuais distais. O aparato real terá a água totalmente tingida com corante preto atóxico.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma Mind the Graph.

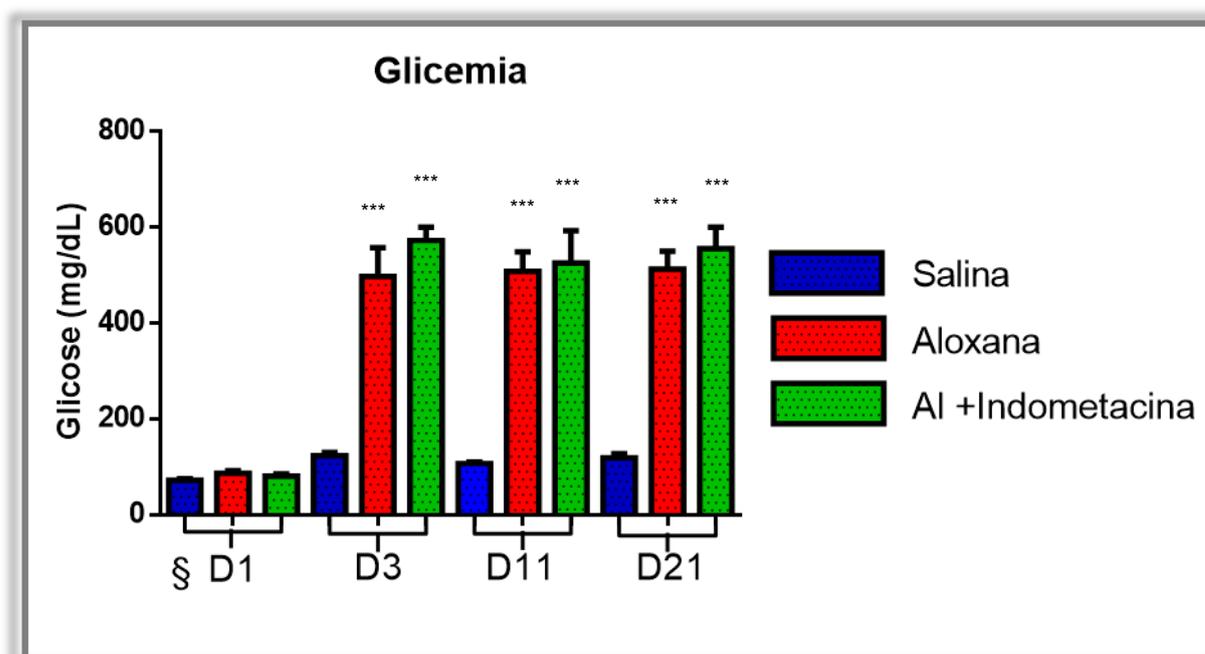
### 3.3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de todos os parâmetros coletados durante os testes comportamentais foram analisados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni, sendo as diferenças consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 – EFICIÊNCIA E MORTALIDADE

O modelo de indução de DM utilizando o agente diabetogênico aloxana se mostrou bastante eficiente. Dos 15 animais que passaram por tal tratamento apenas 2 não tiveram seus níveis de glicose sanguínea elevados acima do patamar considerado normal, resultando em uma eficiência de 86,6%. Todos os outros animais apresentaram uma hiperglicemia severa durante todo o período do teste, independente do tratamento como pode ser observado na Figura 8.

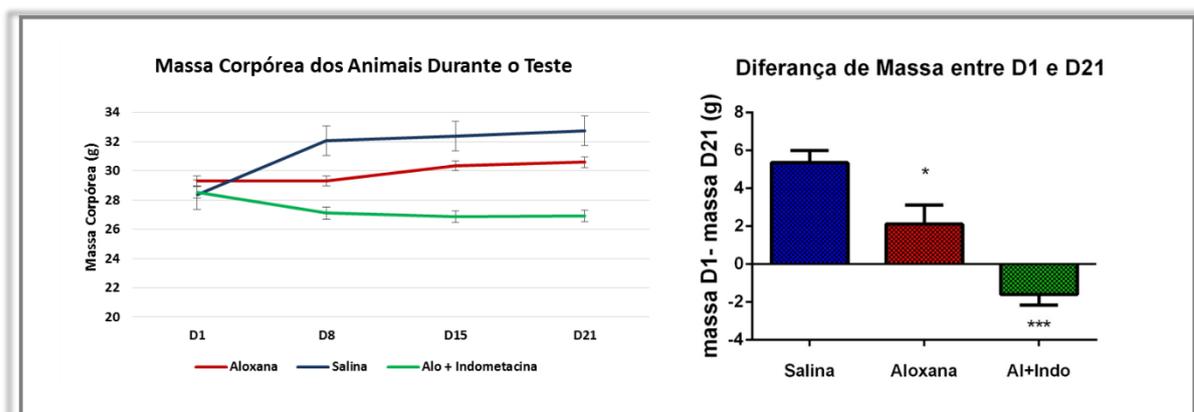


**Figura 8 – Glicemia dos Animais em Quatro Medições Diferentes.** Medição do nível de glicose no sangue nos dias D1, D3, D11 e D21. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. As diferenças estatísticas apresentadas são relativas ao grupo salina em cada um dos dias. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ . O “§” indica que a primeira medição foi realizada em jejum.

O índice de mortalidade foi de aproximadamente 23% já que dos 13 animais restantes 3 morreram no decorrer dos experimentos, todos antes do oitavo dia.

## 4.2 – SAÚDE GERAL DOS ANIMAIS

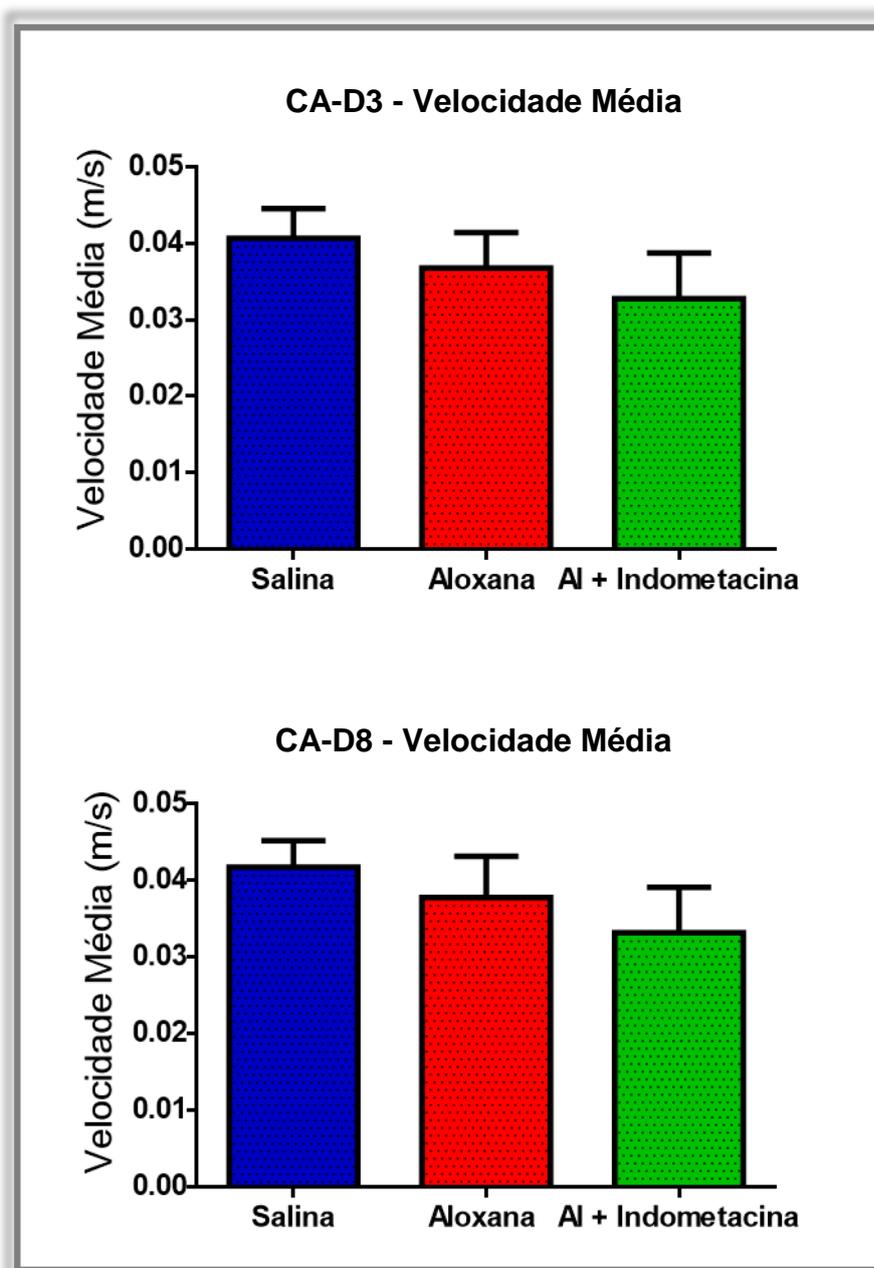
Para acompanhar a saúde geral dos animais a massa corpórea foi avaliada em quatro dias (D1, D8, D15 e D21). Desta forma, pôde-se observar que os animais diabéticos tiveram uma redução no ganho de peso em relação ao grupo controle. Tal diferença foi mais acentuada no grupo tratado com indometacina, como pode ser observado na Figura 9.



**Figura 9 – Massa Corpórea dos Animais Durante o Teste.** A direita, medição da massa corpórea dos animais no decorrer do teste D1, D8, D15 e D21. A esquerda diferença das massas apresentadas entre o último (D21) e o primeiro dia (D1). Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. As diferenças estatísticas apresentadas são relativas ao grupo salina. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 4.3 – ATIVIDADE EM CAMPO ABERTO

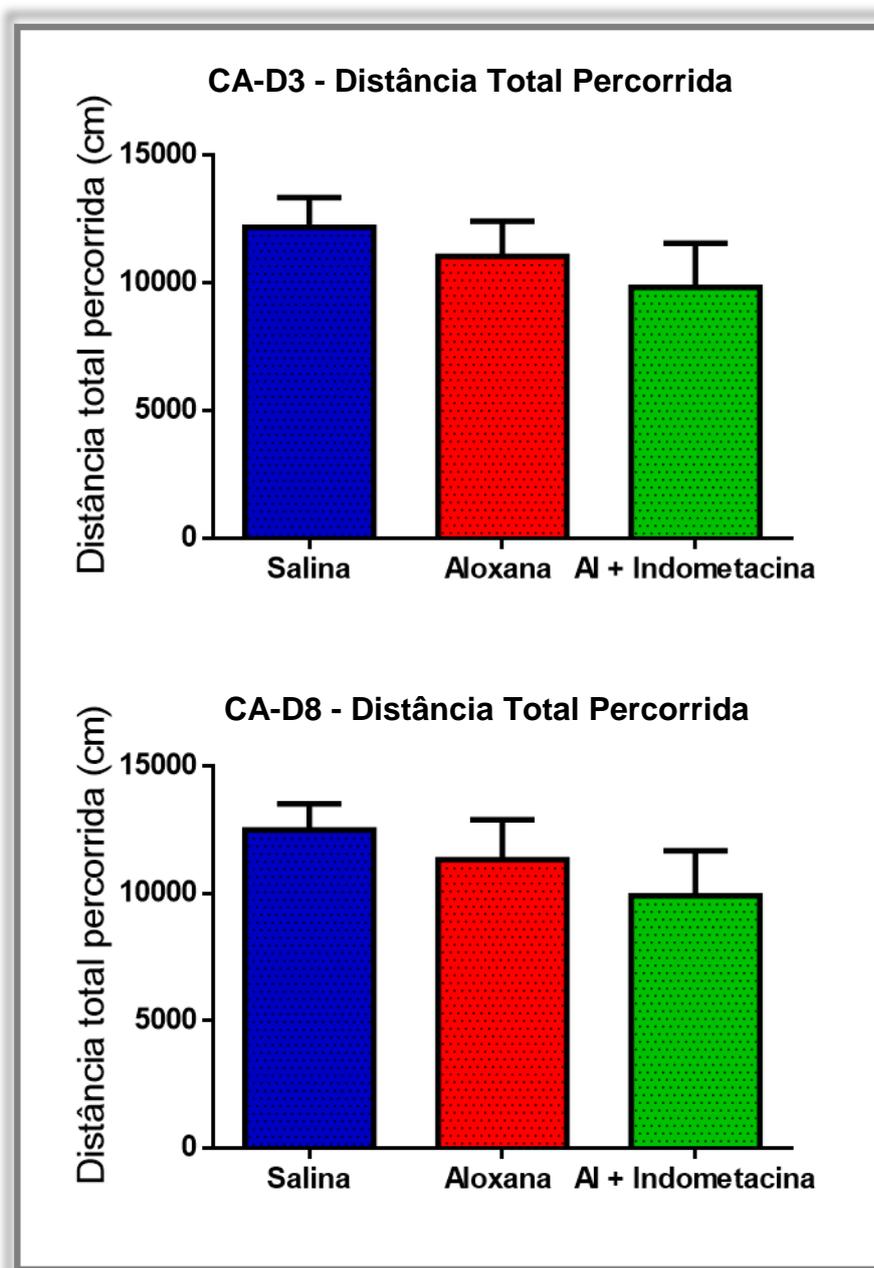
O teste de atividade em campo aberto foi realizado duas vezes, em dois dias diferentes (**D8 e D13**) com um intervalo de cinco dias entre os testes. Os padrões relacionados a atividade locomotora dos animais não foram modificados em nenhum dos grupos. A velocidade média dos animais durante os 5 minutos de teste em CA-D3 ( $p = 0,5006$ ) e CA-D8 ( $p = 0,4297$ ) não foi significativamente alterada, como pode-se observar na Figura 10.



**Figura 10 – Avaliação da Velocidade Média nos Testes de Campo Aberto.** Acima, representação da média e respectivos valores de desvio padrão da velocidade média com a qual os animais exploraram o aparato em CA-D3. Abaixo, representação da média e respectivos valores de desvio padrão da velocidade média com a qual os animais exploraram o aparato em CA-D8. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum dos dois dias de teste. CA-D3  $p > 0,05$ , CA-D8  $p > 0,05$ .

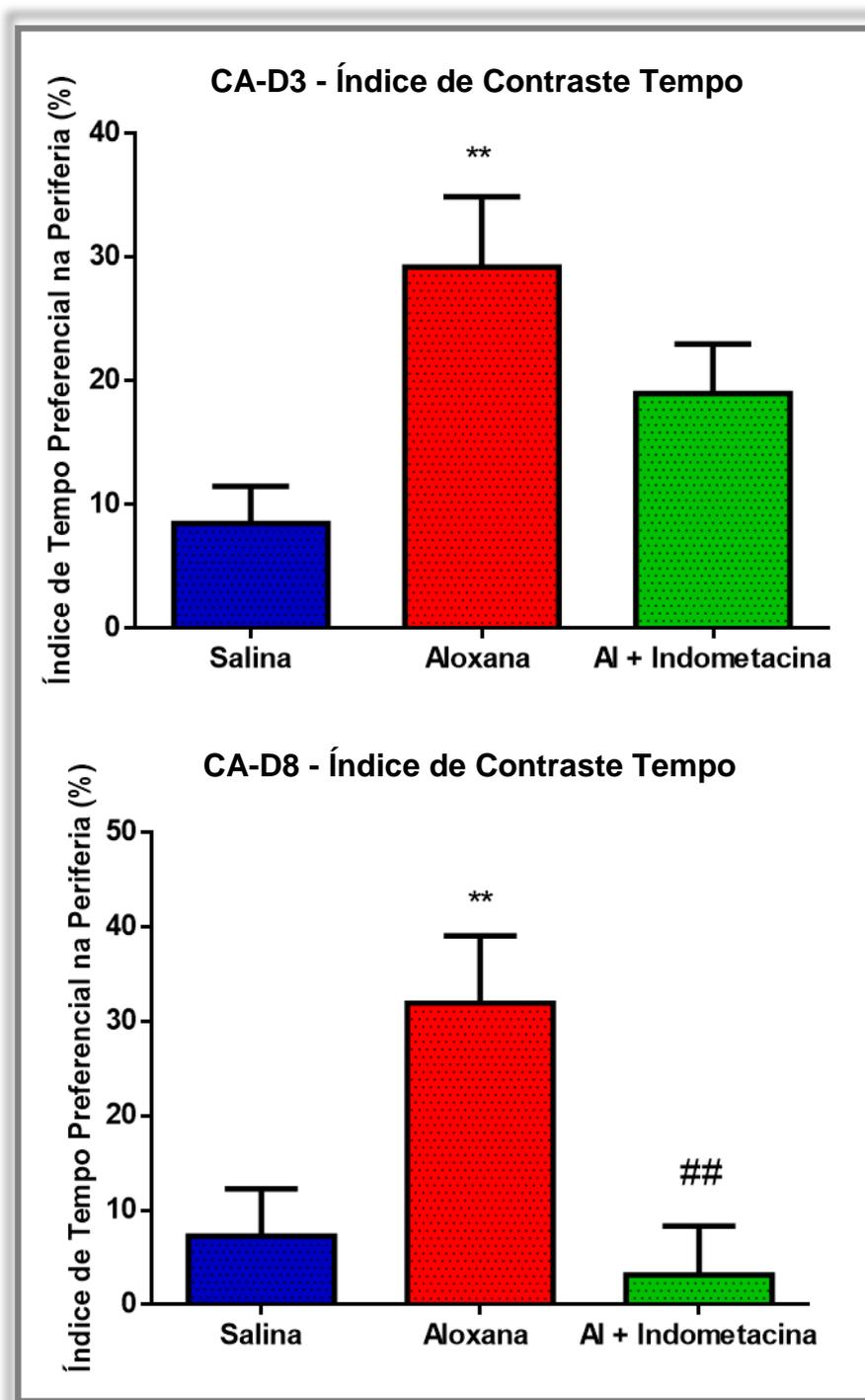
De maneira semelhante as médias da distância total percorrida pelos animais durante o período de teste em CA-D3 ( $p=0,4933$ ) e em CA-D8 ( $p=0,4212$ ) não apresentaram diferenças significativas. O estado diabético e o tratamento com

indometacina também não influenciaram alterações neste parâmetro, como indica a Figura 11.



**Figura 11 – Avaliação da Distância Total Percorrida nos Testes de Campo Aberto.** Acima, representação da média e respectivos valores de desvio padrão da distância total percorrida pelos animais durante a exploração em CA-D3. Abaixo, representação da média e respectivos valores de desvio padrão da distância total percorrida pelos animais durante a exploração em CA-D8. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum dos dois dias de teste. CA-D3  $p > 0,05$ , CA-D8  $p > 0,05$ .

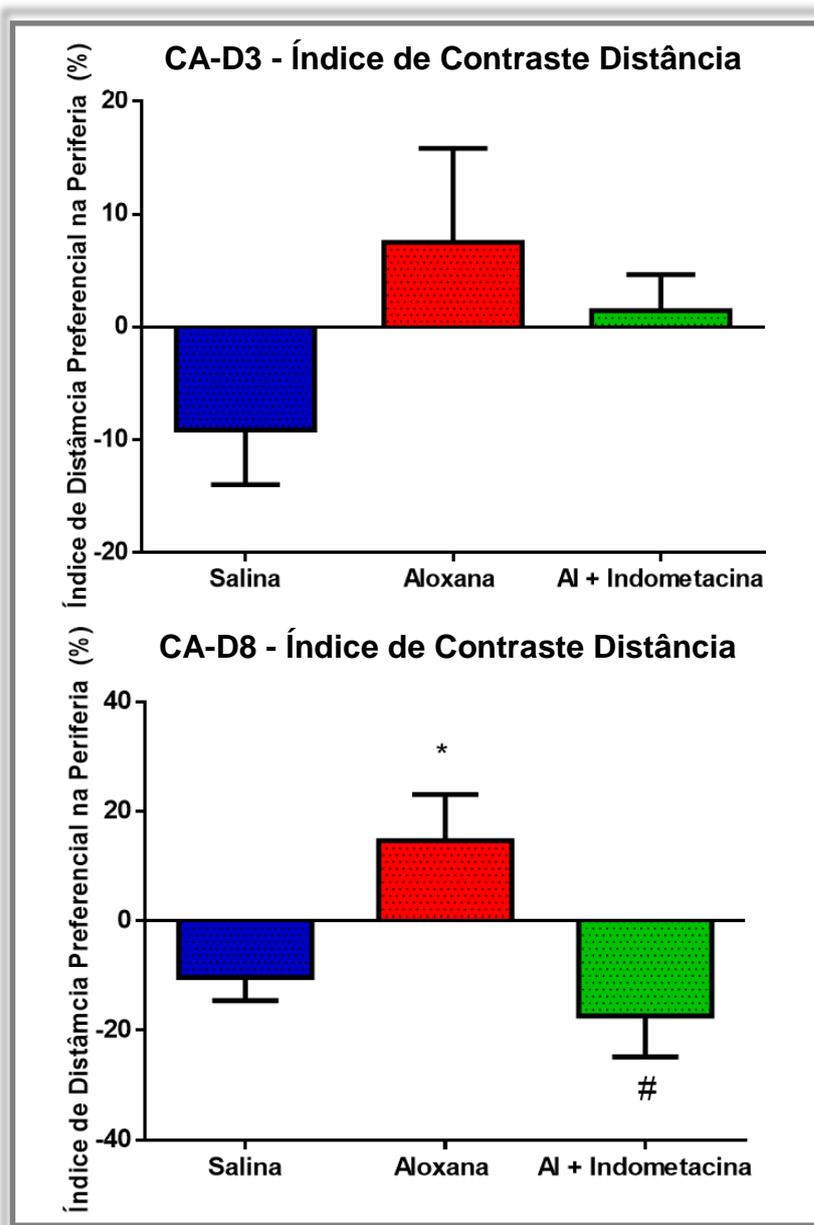
Através do cálculo do índice de tempo preferencial pela zona da periferia, realizado com os dados obtidos no primeiro teste (CA-D3), foi possível demonstrar que os animais diabéticos (Aloxana) mas não os diabéticos tratados com indometacina (AI + Indo) apresentaram um maior índice de preferência pela zona periférica em relação ao controle (Salina). Este quadro foi parcialmente modificado no segundo teste (CA-D8), onde o grupo Aloxana continuou apresentando diferença significativa em relação ao grupo salina, porém se estabeleceu uma diferença robusta entre o grupo Aloxana e o grupo AI + Indometecina, como indica Figura 12.



**Figura 12 – Índice de Tempo Preferencial na Periferia em CA-D3 e CA-D8.** Acima, representação da média e respectivos valores de desvio padrão do índice de contraste em porcentagem da preferência dos animais pela periferia em CA-D3. Abaixo, representação da média e respectivos valores de desvio padrão do índice de contraste em porcentagem da preferência dos animais pela periferia em CA-D8. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Os “\*\*” indicam o nível de significância em relação ao grupo Salina: \*\*  $p < 0,01$  e os “##” o nível de significância em relação ao grupo Aloxana: ##  $p < 0,01$ .

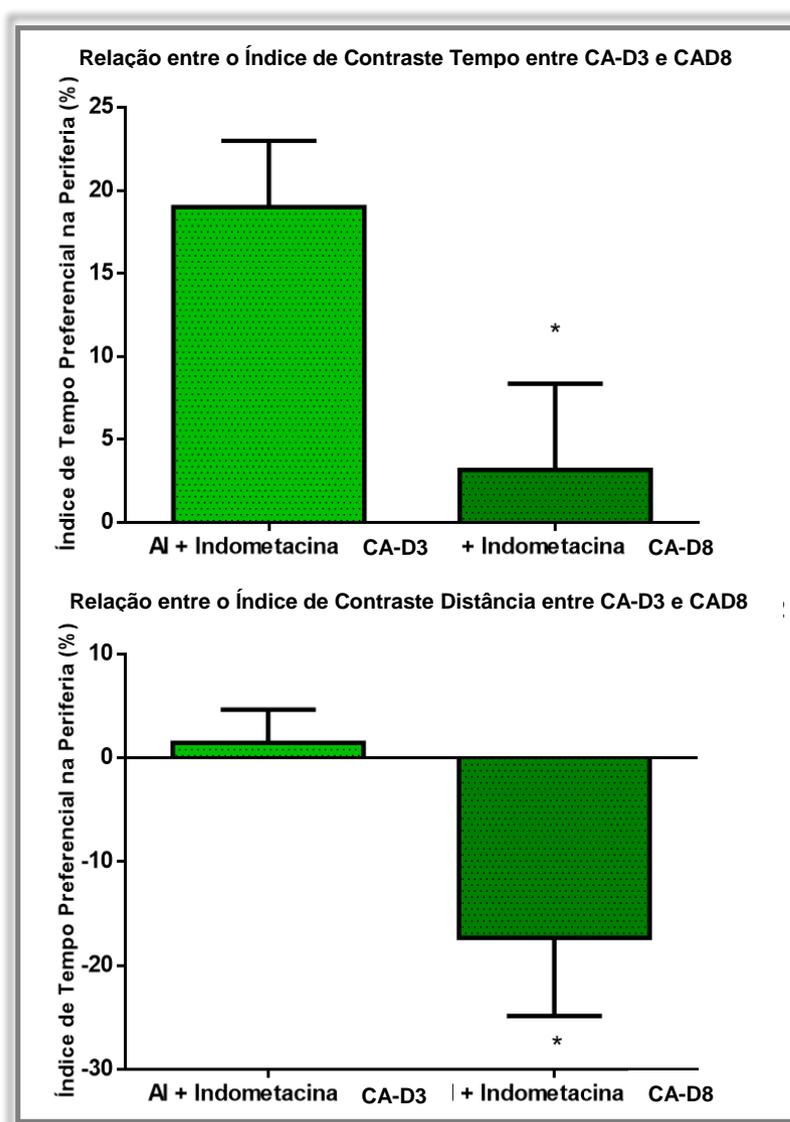
Com base no cálculo do índice da distância preferencial na periferia, realizado com os dados obtidos em CA-D3, foi possível demonstrar que não houve diferença

significativa entre nenhum dos grupos neste parâmetro. Porém, em CA-D8 foi possível demonstrar que o grupo Aloxana apresentou um índice de distância preferencial na periferia maior do que aqueles apresentados pelos grupos Salina e AI + Indometacina, tendo estes apresentado índices negativos para este parâmetro, como demonstrado na Figura 13.



**Figura 13 – Índice de Distância Preferencial na Periferia em CA-D3 e CA-D8.** Acima, representação da média e respectivos valores de desvio padrão do índice de contraste da distância, apresentado em porcentagem da preferência dos animais pela periferia em CA-D3. Abaixo, representação da média e respectivos valores de desvio padrão do índice de contraste da distância, apresentado em porcentagem da preferência dos animais pela periferia em CA-D8. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Os “\*” indicam o nível de significância em relação ao grupo Salina: \*  $p < 0,05$  e os “#” nível de significância em relação ao grupo Aloxana: #  $p < 0,05$ .

Estes resultados demonstram que os animais diabéticos apresentam uma tendência a apresentar um comportamento semelhante ao ansioso, já que apresentaram seus índices de contraste preferencias pela periferia elevados. Porém, os animais diabéticos tratados com indometacina demonstraram uma reversão de tal tendência, levando-se em conta ambos os índices de contraste, como pode ser observado na Figura 14.

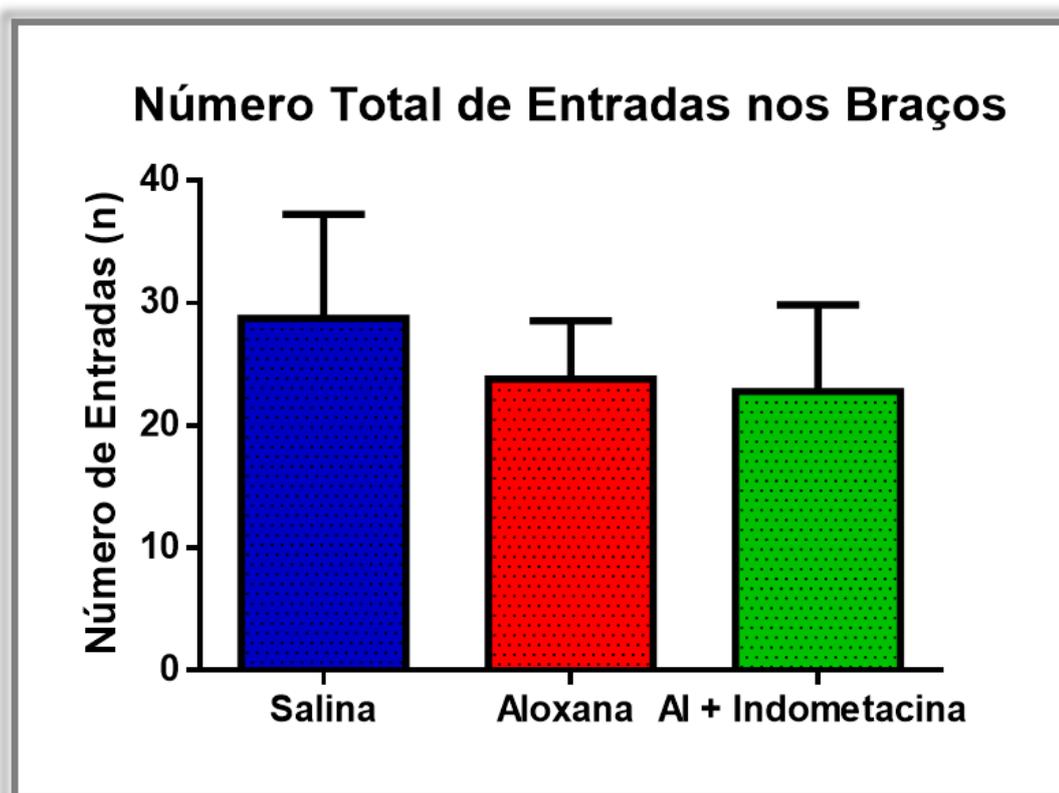


**Figura 14 – Comparação dos Índices de Contraste Entre CA-D3 e CA-D8 referentes ao grupo AI + Indometacina.** Acima, representação da média e respectivos valores de desvio padrão do índice de contraste tempo, apresentado em porcentagem da preferência dos animais pela periferia em CA-D3 e CA-D8. Abaixo, representação da média e respectivos valores de desvio padrão do índice de contraste distância, apresentado em porcentagem da preferência dos animais pela periferia em CA-D3 e CA-D8. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de teste t. \* p < 0,05.

#### 4.4 – LABIRINTO EM Y

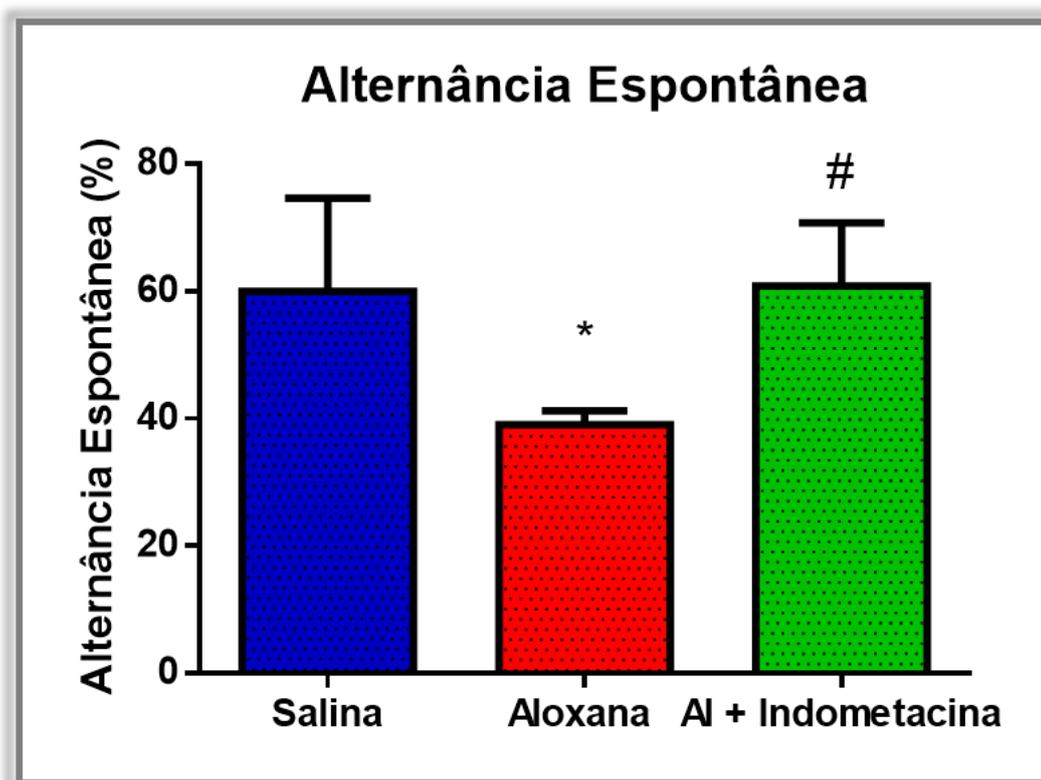
A avaliação de alterações na memória de trabalho foi acessada através do teste do labirinto em Y. Neste, dois parâmetros foram avaliados, o número total de entradas nos braços realizadas pelos animais e a porcentagem de alternâncias espontâneas.

No primeiro parâmetro, não se observou qualquer diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Desta forma, nem o quadro diabético, gerado pela administração de aloxana e nem o tratamento crônico com indometacina tiveram influência sobre o comportamento exploratório dos animais neste teste, como pode ser observado na Figura 15.



**Figura 15 – Número Total de Entradas nos Braços do Labirinto em Y.** Representação da média e respectivos valores de desvio padrão do número de entradas total nos braços realizadas pelos animais nos oito minutos de teste. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. A diferença entre as médias não foi estatisticamente diferente  $p > 0,05$ .

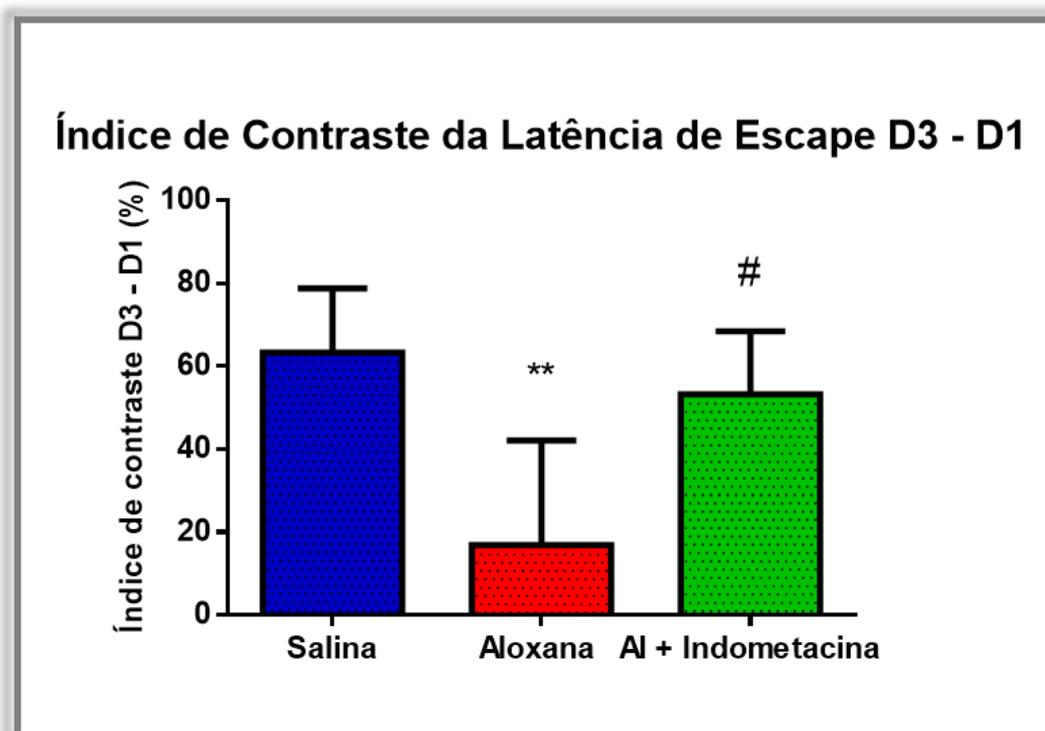
Diferentemente, a porcentagem de alternâncias espontâneas, que é obtida através da razão entre o número de alternâncias espontâneas realizadas e o número total de entradas nos braços menos 2, apresentou diferenças significativas, o grupo aloxana demonstrou uma redução significativa de alternância espontânea em relação aos outros dois grupos. Porém, o grupo Salina e o grupo tratado com indometacina não apresentaram diferenças significativa. Desta forma, o tratamento com indometacina apresentou uma influência positiva sobre a memória de trabalho dos animais, aumentando a porcentagem de alternância espontânea dos animais diabéticos, como pode ser observado na Figura 16.



**Figura 16 – Porcentagem de Alternância Espontânea.** Representação da média e respectivos valores de desvio padrão da porcentagem de alternância espontânea obtida pelos animais nos oito minutos de teste. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. O “\*” indica o nível de significância em relação ao grupo Salina: \*  $p < 0,05$  e o “#” o nível de significância em relação ao grupo Aloxana: #  $p < 0,05$ .

#### 4.4 – LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

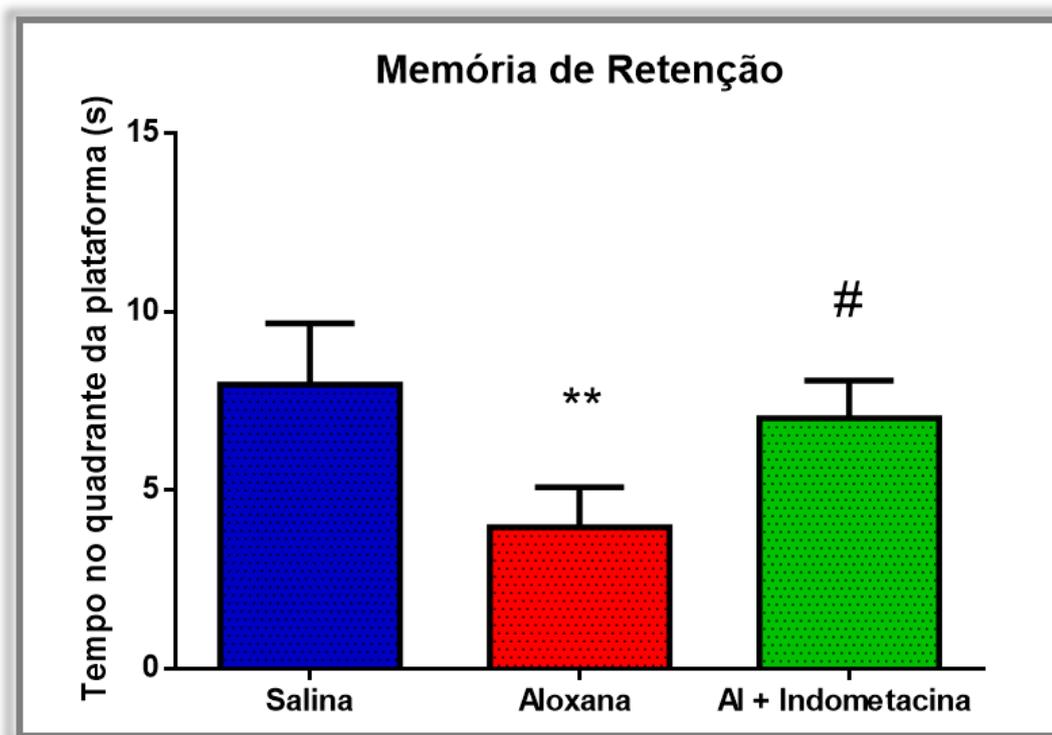
As alterações no aprendizado e na memória espacial dos animais tratados cronicamente com indometacina foram avaliadas com o emprego do labirinto aquático de Morris. Através da comparação das médias de latência de escape apresentadas, entre o primeiro e o terceiro dia de testes, foi possível observar que o grupo Aloxana apresentou um índice de contraste muito menor do que os outros dois grupos e o grupo diabético tratado com indometacina apresentou um índice de contraste estatisticamente maior do que o grupo Aloxana e igual ao grupo não diabético. Este resultado, apresentado na Figura 17, demonstra que o tratamento crônico com indometacina possui a capacidade de reverter o déficit de aprendizado apresentado pelos animais diabéticos.



**Figura 17 – Índice de Contraste Referente a Comparação da Latência de Escape entre D3 e D1.** Representação da média e respectivos valores de desvio padrão do índice de contraste obtido a partir da comparação entre as latências de escape obtidas no primeiro e no terceiro dia do teste, representado em porcentagem. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Os “\*\*” indicam o nível de significância em relação ao grupo Salina: \*\*  $p < 0,01$  e o “#” o nível de significância em relação ao grupo Aloxana: #  $p < 0,05$ .

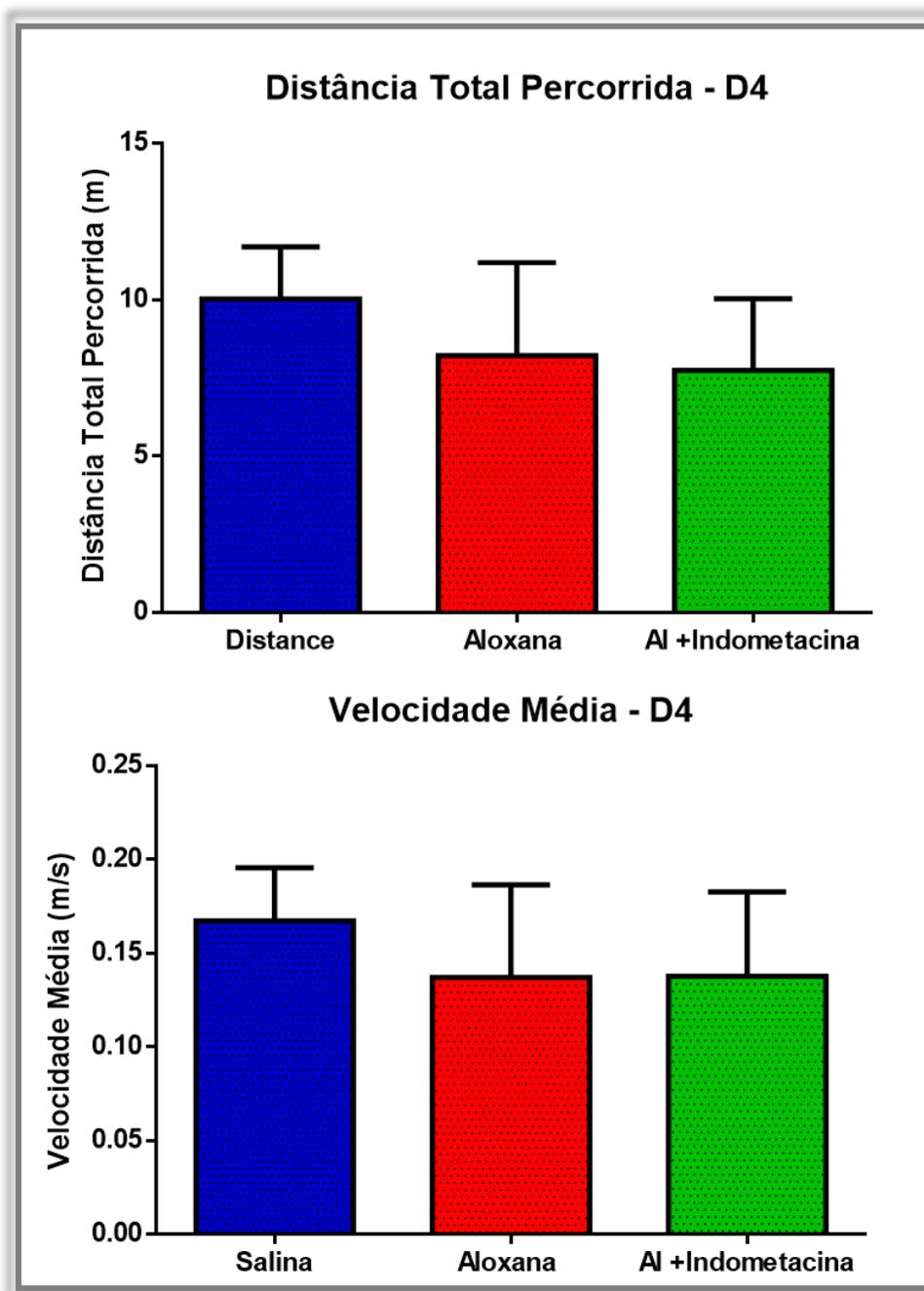
De maneira semelhante, a análise de retenção de memória, avaliada através do tempo despendido pelo animal no quadrante da plataforma, demonstra que o grupo de animais diabéticos obteve uma performance bastante reduzida neste teste, porém os animais diabéticos tratados cronicamente com indometacina apresentaram uma

performance estatisticamente igual ao grupo não diabético e maior em relação ao grupo Aloxana, como pode ser observado na Figura 18.



**Figura 18 – Memória de Retenção no Labirinto Aquático de Morris.** Representação da média e respectivos valores de desvio padrão do tempo que os animais despenderam no quadrante da plataforma no quarto dia de teste, representado em segundos. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Os “\*\*” indicam o nível de significância em relação ao grupo Salina: \*\*  $p < 0,01$  e o “#” o nível de significância em relação ao grupo Aloxana: #  $p < 0,05$ .

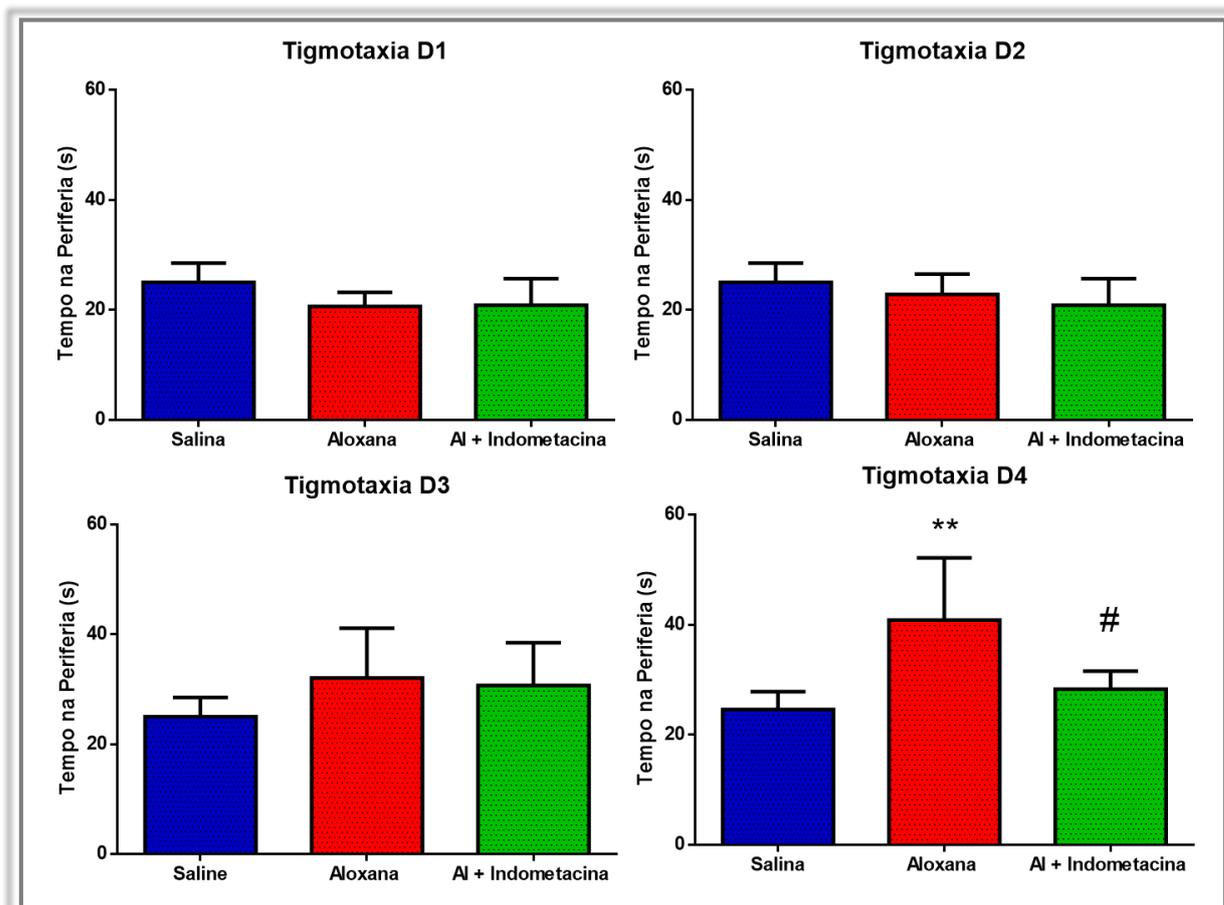
Os padrões relacionados a atividade locomotora dos animais não foram modificados em nenhum dos grupos. Quando a velocidade média e a distância total percorrida pelos animais durante os 60 minutos de teste, foram avaliadas foi possível demonstrar que nenhum destes parâmetros foi significativamente modificado no último dia de testes, como pode-se observar na Figura 19.



**Figura 19 – Distância Total Percorrida e Velocidade Média em D4.** Acima, representação da média e respectivos valores de desvio padrão da distância total percorrida pelos animais durante a exploração em do labirinto aquático de Morris no quarto dia, representação em metros. Abaixo, representação da média e respectivos valores de desvio padrão da velocidade média com a qual os animais exploraram o aparato em no quarto dia, representação em metros por segundo. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni.

Por fim, avaliou-se também neste teste a tigmotaxia, tendência dos animais em permanecer na área periférica do aparato comportamento que pode ser relacionado a um estado de ansiedade. Este parâmetro foi analisado nos quatro dias de teste, desta forma foi possível demonstrar que nos três primeiros dias de teste este

comportamento foi igual para todos os grupos, porém, no último dia de testes este parâmetro foi alterado. Os animais do grupo Aloxana passaram em média muito mais tempo na zona da periferia do que aqueles do grupo Salina e do grupo Al + Indometacina, como demonstra a Figura 20.



**Figura 20 – Tigmotaxia em D1, D2, D3 e D4.** Representação da média e respectivos valores de desvio padrão do tempo despendido pelos animais na zona periférica do aparato do labirinto aquático de Morris, no dia 1 (canto superior esquerdo), dia 2 (canto superior. Análise estatística realizada pelo software GraphPad Prism 6, através da análise de variância (ANOVA) com apenas um critério, e o pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Os “\*\*” indicam o nível de significância em relação ao grupo Salina: \*\* p < 0,01 e o “#” o nível de significância em relação ao grupo Aloxana: # p < 0,05.

## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi testada a hipótese de que o tratamento com o anti-inflamatório não esteroide, indometacina, poderia estar atuando sobre alterações comportamentais induzidas por aloxana em modelo de diabetes tipo 1. Tal influência foi avaliada sobre o comportamento semelhante ao ansioso, utilizando-se o teste de campo aberto, a memória de trabalho através do teste do labirinto em y e o aprendizado e a memória espacial através do teste do labirinto aquático de Morris.

Os resultados obtidos permitiram demonstrar que o tratamento com indometacina teve influência sobre o comportamento semelhante ao ansioso e reverteu significativamente déficits de memória e aprendizado espacial apresentados pelos animais diabéticos, possivelmente relacionadas ao processo de neuroinflamação induzido neste modelo.

O modelo animal de diabetes mellitus tipo 1, utilizando a substância aloxana como indutora, vem sendo largamente utilizado na investigação de alterações fisiopatológicas associadas a tal doença com grande relevância clínica, como a arteriosclerose (MATSUURA et al., 2017) e a retinopatia (GAUCHER et al., 2007). Desta forma, este modelo foi selecionado para o presente estudo com o intuito de mimetizar o quadro de DM tipo 1, permitindo a investigação de alterações comportamentais relacionadas a esta doença.

A eficácia do modelo foi acessada a partir de medições do nível glicêmico em diferentes períodos. Os resultados obtidos, demonstrados na Figura 8 foram consistentes com a resposta dos níveis de glicose no sangue apresentada por animais submetidos a este modelo. Segundo Lenzen, 2008 após um período de aproximadamente 48h todas as células  $\beta$ -pancreáticas sofrem degranulação completa pela ação citotóxica da aloxana, gerando um quadro hiperglicêmico irreversível (LENZEN, 2008). Como demonstrado na figura em questão, todos os animais que sobreviveram a este tratamento apresentaram altos índices glicêmicos até o último dia de teste, provavelmente devido ao efeito citotóxico induzido por aloxana.

Este modelo é descrito na literatura por apresentar um alto índice de mortalidade, principalmente em ratos (MISRA; AIMAN, 2012). Apesar disto, os dados relacionados a taxa de mortalidade de camundongos submetidos a este modelo são bastante limitados e pouco expositivos. Porém, se for realizada uma comparação da taxa de mortalidade determinada para ratos, por Misra e Aiman, observou-se que

utilizando a mesma dose e a mesma via de administração empregada neste trabalho encontra-se uma grande similaridade. De acordo com estes autores a taxa de mortalidade para ratos, foi de 25% e no presente estudo esta taxa foi de 23%. Ou seja, o presente estudo conseguiu padronizar o modelo em camundongos com uma taxa de mortalidade menor que a taxa de ratos descrita na literatura.

Devido a esta característica, a saúde geral dos animais foi avaliada através da medição da massa corpórea em diferentes dias. Como observado na Figura 9 os grupos de aloxana e indometacina mais aloxana, demonstraram alterações no ganho de peso em relação ao grupo controle. O grupo Aloxana teve um menor acréscimo na massa corpórea em comparação ao grupo controle e o grupo diabético tratado com indometacina, apresentou uma perda da massa corpórea significativa e este achado é compatível ao de estudos que avaliaram a massa de animais tratados com indometacina pelo mesmo período (21 dias) (HO et al., 2015). Esta perda de massa corpórea pode estar relacionada aos efeitos adversos da indometacina, principalmente aqueles relacionados ao trato gastrointestinal.

Como esta perda poderia estar relacionada a um estado debilitante, fator que influenciaria o comportamento dos animais durante as sessões dos testes, várias análises foram realizadas em cada etapa do experimento com o intuito de avaliar o nível de locomoção dos animais e o comportamento exploratório, fatores que quando alterados podem indicar um estado debilitante.

Desta forma, no teste de campo aberto e no labirinto aquático de Morris dois padrões comportamentais relacionados a locomoção foram avaliados, a distância total percorrida pelos animais e a velocidade média com a qual estes se deslocaram. Como demonstram os dados das Figuras 10, 11 e 19, em ambos os testes estes padrões não apresentaram modificações significativas entre o grupo diabético tratado em relação aos outros dois grupos. A partir da análise destes dados, pudemos demonstrar que o tratamento crônico com indometacina, apesar de reduzir a massa corpórea dos animais não exerce influência sobre sua locomoção.

Já no labirinto em Y foi possível avaliar o comportamento exploratório dos animais. Este parâmetro foi avaliado, pois um estado debilitante poderia ter influência direta sobre a avaliação da memória de trabalho espacial analisada neste teste. Os dados indicados na Figura 15 demonstram que o número de visitas aos braços do aparato foi estatisticamente igual, indicando que o comportamento exploratório dos animais não foi alterado pelo tratamento com indometacina.

É importante salientar, que esta perda de massa não parece ter influência sobre o comportamento exploratório ou sobre a locomoção dos animais nos testes comportamentais realizados (Figura 15, 10, 11 e 19).

Após a padronização do modelo os testes de labirinto em Y, campo aberto e Labirinto aquático de Morris, foram utilizados para as avaliações comportamentais no modelo de diabetes. Os resultados apresentados na Figura 15, demonstram que no teste do labirinto em Y o grupo tratado com indometacina visitou o mesmo número de braços do que os outros grupos. No teste de campo aberto, pode-se demonstrar a partir dos dados representados na Figura 10 e na Figura 11, que os animais não apresentaram diferenças na velocidade média nem na distância total percorrida em relação aos outros dois grupos, respectivamente. De forma semelhante, os dados ilustrados na Figura 19 demonstram que estes mesmos parâmetros não foram modificados no labirinto aquático de Morris em nenhum dos grupos.

Com o intuito de se avaliar a presença de padrões comportamentais relacionados a um estado ansioso, fator que pode estar relacionado a neuroinflamação, foram realizadas duas análises diferentes em dois testes distintos.

A primeira delas, avaliou a preferência dos animais pelas zonas do campo aberto. Através desta análise pudemos demonstrar que os animais diabéticos não tratados apresentaram maior preferência pela zona periférica em relação aos outros grupos, como pode-se observar na Figura 12 e na Figura 13, estes dados sugerem que essa predileção seja uma resposta frente a um estado semelhante ao ansioso. A partir destes dados, também foi possível demonstrar que o tratamento agudo (CA-D3) e pré-crônico (CA-D8) reverteram de forma significativa a preferência dos animais pela zona periférica, sugerindo que ambos os tipos de tratamento têm a capacidade de reverter o comportamento semelhante ao ansioso.

A segunda análise foi realizada nos quatro dias do labirinto aquático de Morris, esta teve por objetivo analisar a tigmotaxia, ou seja, a tendência dos animais em permanecerem próximos as bordas, um comportamento que reflete um estado semelhante ao ansioso. Os resultados ilustrados na Figura 20 demonstram que no quarto dia do teste do labirinto aquático de Morris, este comportamento foi reduzido pelo tratamento crônico com indometacina em relação ao grupo não tratado.

Como o tratamento com o anti-inflamatório indometacina mostrou a capacidade de reverter este tipo de comportamento, pode-se relacionar estas

alterações comportamentais semelhantes ao estado ansioso à uma possível influência neuroinflamatória.

Em modelos animais de diabetes mellitus aspectos neuroinflamatórios vêm sendo relacionados a alterações comportamentais. Um fator que vem se mostrando primordial para essas modificações são os altos índices de glicocorticoides produzidos pois atuam na redução da proliferação de células neurogênicas. Recentemente uma série de estudos vem apontando um papel pró-inflamatório para glicocorticoides no sistema nervoso central (STRANAHAN et al., 2008).

Apesar destes hormônios serem caracterizados como agentes anti-inflamatórios e imunossupressores e utilizados farmacologicamente para tais fins, um conjunto de evidências recentes vêm apontando para um efeito oposto em algumas condições no sistema nervoso central, com um papel importante na neuroinflamação. A produção aumentada destes hormônios durante o estresse crônico e o envelhecimento é responsável por ativar a micróglia colocando-a em um “estado iniciado”. Foi demonstrado anteriormente que neste estado a micróglia aumenta a expressão de TLR4 (toll-like receptor 4), o que gera uma expressão exacerbada de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-8 através da ativação do fator nuclear kappa b (NF $\kappa$ B), quando estas células entram em contato com um insulto posterior (DUQUE; MUNHOZ, 2016).

Assim como no envelhecimento e no estresse crônico, foi demonstrado que este tipo de ativação microglial também ocorre em um modelo genético de diabetes tipo 2 e é dependente de corticosterona. Através da estimulação de uma cultura de micróglia isolada do hipocampo, com LPS, demonstrou-se que as células de animais diabéticos possuíam uma resposta muito mais intensa do que as células de animais também diabéticos que tiveram os níveis de corticosterona normalizados por metirapona, um inibidor da síntese de corticosterona (DEY et al., 2014)

A relação entre a neuroinflamação e o comportamento ansioso em animais é relativamente bem descrita. Estudos que utilizam a administração periférica da endotoxina LPS demonstram que os níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 são aumentados no sistema nervoso central (QUAN; SUNDAR; WEISS, 1994). Unido a isto, animais tratados com LPS quando submetidos a testes comportamentais, apresentam comportamentos semelhantes ao estado ansioso. Por exemplo, no teste de transição claro/escuro esses animais passam mais tempo na região escura, no teste de cruz elevada estes animais passam mais tempo

nos braços fechados e passam menos tempo explorando objetos novos apresentados no campo aberto (LACOSTA; MERALI; ANISMAN, 1999).

Desta forma, estudos utilizando o tratamento com substâncias anti-inflamatórias vêm demonstrando que a diminuição da expressão de citocinas pró inflamatórias no hipocampo, como IL1-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 a uma redução do comportamento ansioso em vários testes comportamentais, inclusive reduzindo a locomoção de animais na zona periférica do campo aberto (SULAKHIYA et al., 2016).

Algumas citocinas pró inflamatórias vêm sendo apontadas como a chave na regulação do comportamento ansioso durante quadros de neuroinflamação. Por exemplo, a administração intraventricular de IL1-1 $\beta$ , além de causar ansiedade em camundongos reduz a sensibilidade dos receptores canabinóides 1 (CB1Rs) alterando o funcionamento de sinapses gabaérgicas no estriado. Tais sinapses estão relacionadas ao sistema de recompensa e desta forma, podem modular o comportamento ansioso (ROSSI et al., 2012).

O tratamento com inibidores de COX-2 vem se mostrando efetivo na redução da expressão de citocinas pró inflamatórias como IL1-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (SIL; GHOSH, 2016). Desta forma, o tratamento com indometacina pode ter inibido a expressão de tais citocinas, revertendo, portanto, o comportamento semelhante ao ansioso no teste de campo aberto neste trabalho. Porém, a medição do nível de expressão de tais citocinas é necessário para se confirmar tal hipótese.

Além de alterarem comportamentos relacionados a ansiedade, citocinas pró inflamatórias, como a IL1 $\beta$  podem prejudicar fatores intimamente relacionados às funções hipocampais, como a formação de potenciais de longa duração (KATSUKI et al., 1990) e o fortalecimento sináptico (BELLINGER; MADAMBA; SIGGINS, 1993). Tais prejuízos podem se refletir sobre desempenho de funções hipocampais, como a formação da memória espacial. Desta forma, investigamos o desempenho dos animais em testes comportamentais relacionados a esta função.

O teste do labirinto em Y foi utilizado para investigar a influência do tratamento com indometacina sobre a memória de trabalho espacial dos animais. As análises dos resultados representados na Figura 16 demonstraram que os animais diabéticos tiveram uma redução da porcentagem de alternância espontânea, o que indica déficit no desempenho da memória de trabalho. Além disto, esse resultado demonstrou que tratamento com indometacina mostrou um efeito de reversão desse déficit, não apresentando diferença entre o grupo Salina.

Até pouco tempo acreditava-se que o córtex pré-frontal era a estrutura primordial para na execução das funções dependentes da memória de trabalho espacial. Porém, um estudo recente, utilizando optogenética demonstrou que projeções diretas do hipocampo ventral para o córtex pré-frontal medial são necessárias na fase de codificação da memória. Portanto, em um teste comportamental dependente da memória de trabalho espacial, como o labirinto em Y esta projeção eferente em relação ao hipocampo é fundamental para a atualização de informações espaciais que vão ser integradas no córtex pré-frontal e permitirão a realização da tarefa (SPELLMAN et al., 2015).

De fato, a memória de trabalho espacial é prejudicada em modelos de neuroinflamação no qual a sensibilização da micróglia tem um papel fundamental no estabelecimento da neuroinflamação no hipocampo. Como em modelos de animais idosos que recebem administração de LPS, nestes animais há um aumento significativo da expressão de citocinas pró inflamatórias (IL1-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) no hipocampo, fator que é correlacionado pelo autor com a redução da performance desses animais no teste de labirinto radial (CHEN et al., 2009).

Os achados do presente trabalho são compatíveis com os de Oliveira e colaboradores, que demonstrou que prejuízos na memória de trabalho de animais diabéticos podem ser revertidos pelo uso da substância metformina. Este fármaco conhecido por regular a atividade do fator nuclear kappa b (NF $\kappa$ B), reduziu a o número de micróglias ativadas e diminuiu a expressão de IL1-1 $\beta$  no hipocampo. A metformina, portanto reverteu a neuroinflamação e restaurou a memória de trabalho desses animais no teste de labirinto em T (OLIVEIRA et al., 2016).

Demonstrou-se também que a indometacina possui uma atividade de modulação do fator de transcrição NF $\kappa$ B em um modelo animal da doença de Alzheimer, o tratamento crônico com este fármaco reduziu significativamente a atividade do NF $\kappa$ B (SUNG et al., 2004), sendo este um complexo proteico fundamental para a atividade exacerbada da micróglia sensibilizada. Desta forma como indicam os resultados da Figura 16, o tratamento com indometacina pode ter revertido os déficits atuando sobre o NF $\kappa$ B inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Para se avaliar a influência do tratamento com indometacina sobre a memória e o aprendizado espacial foi realizado o teste do labirinto aquático de Morris. O teste foi realizado em duas etapas, nos três dias primeiros foi avaliado o aprendizado através de vários testes consecutivos e no quarto dia foi avaliada a memória espacial.

Os resultados ilustrados na Figura 17 demonstram que o tratamento com indometacina reduziu de forma significativa os défices de aprendizado em relação aos animais diabéticos não tratados. Da mesma forma, os resultados relativos à memória de retenção, apresentados na Figura 18 demonstram que o tratamento crônico com indometacina melhora a performance dos animais em relação aos animais diabéticos não tratados. Estes achados podem ser relacionados a uma redução da neuroinflamação, que protege ou reverte danos a estruturas relacionadas a este tipo de memória.

A performance de animais submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris vem sendo relacionada a formação de potenciais de longa duração (JEFFERY; MORRIS, 1993) e a função do receptor N-metil D-aspartato (NMDA) (BANNERMAN et al., 1995), desta forma vem sendo uma técnica chave para a investigação da função hipocampal, pois alterações nesta estrutura normalmente se refletem sobre a performance nesse teste.

Estudos anteriores demonstraram que animais diabéticos, submetidos a modelos de DM tipo 1 e tipo 2 apresentam déficits de memória e aprendizado nesse teste, e tais alterações são dependentes dos altos índices de glicocorticoides. Sugerindo que a sensibilização da micróglia por estes hormônios e a posterior resposta inflamatória exacerbada sejam muito provavelmente a causa de tais déficits (STRANAHAN et al., 2008).

A neuroinflamação pode afetar a plasticidade hipocampal de várias maneiras. Foi demonstrado anteriormente, que a neuroinflamação crônica prejudica a formação de dois tipos fundamentais de potenciais de longa duração, a dependente de receptor NMDA e independente de receptor NMDA. As formações de tais potenciais são primordiais na via das colaterais de Schaffer que conectam as regiões CA1 e CA3 do hipocampo (MIN et al., 2009).

Além de tais alterações relacionadas a CA1 e CA3 a neuroinflamação prejudica a neurogênese que ocorre no giro denteado da formação hipocampal, através da liberação de citocinas pró inflamatórias, como: 1L-1 $\beta$  (KOO; DUMAN, 2008), IL6 (MONJE et al., 2003) e TNF- $\alpha$  (KEOHANE et al., 2010).

A redução da proliferação do número de células neurogênicas do giro denteado da formação hipocampal é uma delas. Foi demonstrado anteriormente que a indução da DM tipo 1 resulta em uma diminuição significativa da proliferação

neurogênica hipocampal e que o tratamento com indometacina por 21 dias reverte esta perda celular (HO et al., 2015).

Apesar de não se compreender totalmente os mecanismos pelos quais novas células funcionais integralizadas ao circuito hipocampal modulam o aprendizado e a memória, estudos eletrofisiológicos e computacionais apontam que estas novas células geradas tem o papel de atuar como separadores de padrão, recrutando populações distintas de neurônios para processar memórias muito semelhantes (MCAVOY; BESNARD; SAHAY, 2015).

A neurogênese é especialmente afetada pela neuroinflamação, a administração sistêmica de LPS aumenta a taxa de morte de neurônios hipocampais e reduz a sobrevivência de células neurogênicas. Estas alterações no hipocampo foram protegidas pelo tratamento com indometacina, o que indica que a COX-2 possui um papel importante na regulação destes eventos celulares durante a neuroinflamação (BASTOS et al., 2008).

Um estudo recente também demonstrou, que a administração do inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe consegue reverter os déficits de memória e aprendizado de animais diabéticos no labirinto aquático de Morris. Sugerindo que a inibição da COX-2 tem um papel crucial na reversão de danos a plasticidade neuronal, já que o tratamento com celecoxibe melhorou o potencial de longa duração hipocampal prejudicado em animais diabéticos (YANG; GAO, 2017).

Desta forma, a inibição da enzima COX-2 é importante tanto para a proteção quanto para a reversão de alterações da plasticidade neuronal no hipocampo em modelos que envolvem a neuroinflamação. Este efeito pode ser atribuído a redução da inflamação no hipocampo, acarretando em uma possível redução das citocinas pró inflamatórias expressas e conseqüentemente a proteção do nicho hipocampal.

Apesar da importância dos achados deste trabalho é crucial a realização de análises do encéfalo de animais diabéticos tratados cronicamente com indometacina que comprovem que este tratamento atua sobre aspectos neuroinflamatórios e por este motivo consegue reverter os déficits de memória e aprendizado demonstrados neste trabalho.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram determinar que:

- a) Que o tratamento crônico com indometacina não tem influência sobre a hiperglicemia de animais diabéticos induzida por aloxana;
- b) O tratamento crônico com indometacina parece acentuar a perda de massa corpórea de animais diabéticos sem influenciar em sua atividade locomotora e exploratória em testes comportamentais;
- c) O tratamento agudo, subcrônico e crônico com indometacina reduz comportamentos sugestivos de estado ansioso em animais submetidos a modelo de diabetes mellitus tipo 1;
- d) O tratamento crônico com indometacina reverte déficits de memória de trabalho espacial de animais submetidos a modelo de diabetes mellitus tipo 1;
- e) O tratamento crônico com indometacina reverte défices de aprendizado apresentados por animais submetidos a modelo de diabetes mellitus tipo 1;
- f) O tratamento com indometacina reverte défices de memória espacial apresentados por animais submetidos a modelo de diabetes mellitus tipo 1.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T. A; FORTIN, N. J. The evolution of episodic memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110 Suppl, p. 10379–86, 2013.

ANDERSEN, P. et al. **The Hippocampus Book**. Primeira ed. Nova York: Oxiford Unoversity Press, 2007.

BANNERMAN, D. M. et al. **Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade** *Nature*, 1995. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/378182a0>>

BASTOS, G. N. et al. Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 155, n. 2, p. 454–462, 2008.

BELLINGER, F. P.; MADAMBA, S.; SIGGINS, G. R. Interleukin 1 beta inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. **Brain Research**, v. 628, n. 1–2, p. 227–234, 1993.

BIESSELS, G.-J. et al. Place Learning and Hippocampal Synaptic Plasticity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Diabetes**, v. 45, n. 9, p. 1259–1266, 1994.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, R. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2014, v. 6, n. 4, p. 23, 2014.

BRUNSCHWIG, A.; ALLEN, J. G. Specific Injurious Action of Alloxan Upon Pancreatic Islet Cells and Convoluted Tubules of the Kidney . Comparative Study in the Rabbit , Dog , and Man Attempted Chemotherapy of Insulin-Producing Islet Cell Carcinoma in Man \*. **Cancer Research**, v. 37, p. 12, 1943.

CAGLE, J. L. **The Effects of Alloxan on the Histology of the Pancreas , Thyroid and Adrenal Glands of the White Rat**. [s.l.] University of Tennessee, 1950.

CHEN, J. et al. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. **Brain Behavior Immunology**, v. 22, n. 3, p. 301–311, 2009.

CHENG, G. et al. Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: A meta-analysis of longitudinal studies. **Internal Medicine Journal**, v. 42, n. 5, p. 484–491, 2012.

CRYER, P. E. Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 868–870, 2007.

CZECH, D. A.; NIELSON, K. A.; LAUBMEIER, K. K. Chronic Propranolol Induces Deficits in Retention but Not Acquisition Performance in the Water Maze in Mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 74, n. 1, p. 17–26, 2000.

DEY, A. et al. Glucocorticoid sensitization of microglia in a genetic mouse model of obesity and diabetes Aditi. **Journal of Neuroimmunology**, v. 269, n. 0, p. 20–27, 2014.

DINIZ, D. G. et al. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 3, p. 509–519, 2010.

DUQUE, E. DE A.; MUNHOZ, C. D. The Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids in the Brain. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. June, p. 1–7, 2016.

GAUCHER, D. et al. Microglial changes occur without neural cell death in diabetic retinopathy. **Vision Research**, v. 47, n. 5, p. 612–623, 2007.

GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 2, p. 137–149, 2014.

HERMAN, M. A.; KAHN, B. B. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1767–1775, 2006.

HO, N. et al. Indomethacin Reverses Decreased Hippocampal Cell Proliferation in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 22, n. 2, p. 134–139, 2015.

JEFFERY, K. J.; MORRIS, R. G. M. Cumulative long-term potentiation in the rat dentate gyrus correlates with, but does not modify, performance in the water maze. **Hippocampus**, v. 3, n. 2, p. 133–140, 1993.

KAHN, R. The Molecular Mechanism of Insulin Action. **Annual reviews**, v. 36:429-451, p. 8, 1985.

KATSUKI, H. et al. Interleukin-1 beta inhibits long-term potentiation in the CA3 region of mouse hippocampal slices. **European journal of pharmacology**, v. 181, n. 3, p. 323–326, 1990.

KEOHANE, A. et al. Tumour necrosis factor-alpha impairs neuronal differentiation but not proliferation of hippocampal neural precursor cells: Role of Hes1. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 43, n. 1, p. 127–135, 2010.

KOO, J. W.; DUMAN, R. S. IL-1 is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 2, p. 751–756, 2008.

KUMAR, V. et al. **Robbins and Cotran Pathologic basis of disease (8thedtn)**. 8thedtn. ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2010.

LACOSTA, S.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: Anxiogenic-like effects. **Brain Research**, v. 818, n. 2, p. 291–303, 1999.

LAKHTAKIA, R. The history of diabetes mellitus. **Medical History**, v. 13, n. August, p. 368–370, 2010.

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

LOPES, R. S. et al. Indomethacin treatment reduces microglia activation and increases numbers of neuroblasts in the subventricular zone and ischaemic striatum after focal ischaemia. **Journal of Biosciences**, v. 41, n. 3, p. 381–394, 2016.

LUCAS, S. The Pharmacology of Indomethacin. **Headache Currents**, v. 56, n. 2, p. 436–446, 2016.

MAMUN, A. AL et al. Neurodefensive Effect of *Olea europaea* L. in Alloxan-Induced Cognitive Dysfunction and Brain Tissue Oxidative Stress in Mice: Incredible Natural Nootropic. **Journal of Neurology and Neuroscience**, v. 7, p. 1–9, 2016.

MATSUURA, Y. et al. Altered glucose metabolism and hypoxic response in alloxan-

induced diabetic atherosclerosis in rabbits. **PloS one**, p. 1–17, 2017.

MAURICE, T. et al. Behavioral evidence for a modulating role of ?? ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. **Brain Research**, v. 647, n. 1, p. 44–56, 1994.

MCAVOY, K.; BESNARD, A.; SAHAY, A. Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: a role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 9, n. August, p. 1–7, 2015.

MILLER, R. G. et al. Improvements in the life expectancy of type 1 diabetes: The pittsburgh epidemiology of diabetes complications study cohort. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2987–2992, 2012.

MIN, S. S. et al. Chronic brain inflammation impairs two forms of long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 area. **Neuroscience Letters**, v. 456, n. 1, p. 20–24, 2009.

MISRA, M.; AIMAN, U. Alloxan: An unpredictable drug for diabetes induction? **Indian Journal of Pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 538, 2012.

MONJE, M. L. et al. Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3835889> Your use of the JSTOR archive indicates your acceptance of the Terms & Condit. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1760–1765, 2003.

MUNDAY, R. E. X. Dialuric Acid Autoxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 409–413, 1988.

NUNLEY, K. A. et al. Clinically relevant cognitive impairment in Middle-Aged adults with childhood-onset type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 9, p. 1768–1776, 2015.

OLIVEIRA, W. H. et al. Effects of metformin on inflammation and short-term memory in streptozotocin-induced diabetic mice. **Brain Research**, v. 1644, p. 149–160, 2016.

OZOUGWU, J. et al. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Journal of Physiology and Pathophysiology**, v. 4, n. 4, p. 46–57, 2013.

PAREPALLY, J. M. R.; MANDULA, H.; SMITH, Q. R. Brain uptake of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Ibuprofen, flurbiprofen, and indomethacin. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 5, p. 873–881, 2016.

PASQUEL, F. J.; UMPIERREZ, G. E. Hyperosmolar hyperglycemic state: A historic review of the clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Diabetes Care**, v. 37, n. 11, p. 3124–3131, 2014.

PORETSKY, L. **Principles of diabetes mellitus**. Second ed. Nova York: Springer US, 2010.

QUAN, N.; SUNDAR, S. K.; WEISS, J. M. Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. **Journal of Neuroimmunology**, v. 49, n. 1–2, p. 125–134, 1994.

ROSSI, S. et al. Interleukin-1 Causes Anxiety by Interacting with the Endocannabinoid System. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 40, p. 13896–13905, 2012.

SAEDI, E. et al. Diabetes mellitus and cognitive impairments. **World Journal of Diabetes**, v. 7, n. 17, p. 412–422, 2016.

SCOVILLE, W.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 20, n. 11, p. 11, 1957.

SHRAGER, Y. et al. Spatial memory and the human hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 8, p. 2961–6, 2007.

SIL, S.; GHOSH, T. Role of cox-2 mediated neuroinflammation on the neurodegeneration and cognitive impairments in colchicine induced rat model of Alzheimer's Disease. **Journal of Neuroimmunology**, v. 291, p. 115–124, 2016.

SIQUEIRA MENDES, F. **Influência da atividade mastigatória e do ambiente sobre o aprendizado espacial e o padrão da atividade exploratória em modelo murino senil**. [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2014.

SPELLMAN, T. et al. Hippocampal–prefrontal input supports spatial encoding in working memory. **Nature**, v. 522, n. 7556, p. 309–314, 2015.

STRANAHAN, A. M. et al. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. **Nature neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 309–17, 2008.

SULAKHIYA, K. et al. Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. **Neuroscience Letters**, v. 611, p. 106–111, 2016.

SUNG, S. et al. Modulation of nuclear factor-kappa B activity by indomethacin influences A beta levels but not A beta precursor protein metabolism in a model of Alzheimer's disease. **The American journal of pathology**, v. 165, n. 6, p. 2197–206, 2004.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, v. 50, p. 10, 2001.

VORHEES, C. V; WILLIAMS, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 848–858, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. **Isbn**, v. 978, p. 88, 2016.

YANG, Y.; GAO, L. Celecoxib Alleviates Memory Deficits by Downregulation of COX-2 Expression and Upregulation of the BDNF-TrkB Signaling Pathway in a Diabetic Rat Model. **Journal of Molecular Neuroscience**, n. 136, 2017.

## ANEXO- A



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS

## PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo nº 05/2017

Título do Projeto de Pesquisa: **Avaliação da influência do tratamento com indometacina na memória espacial e em aspectos neuro-inflamatórios em modelo murino de diabetes tipo 1**

Pesquisador Responsável: **Anderson Bentes de Lima**  
Instituição: **Universidade do Estado do Pará**

Data do Parecer: 06/04/2017

**PARECER**

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do CONCEA. O referido projeto utiliza 25 camundongos pertencentes a espécie *Mus musculus*, com 60 dias e peso de 30g a 40g, para fins de pesquisa, tratando-se de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata, do sexo masculino, originários da Seção de Criação e Produção de Animais de Laboratório (SACPA) do Instituto Evandro Chagas. Desse modo, após as avaliações o CEUA-UEPA, manifesta-se pela sua aprovação.

O projeto será desenvolvido no período de 03/2017 a 03/2018.

Parecer: **APROVADO**

**Liberado para o início da pesquisa sendo obrigatória a entrega neste CEUA do relatório semestral e a conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.**

Belém, 06 de abril de 2017.

**Prof. Dr. Anderson Bentes de Lima**  
Coord. do CEUA/CCBS/UEPA



Universidade do Estado do Pará - UEPA - Campus II / CCBS  
Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA. End.: Trav. Perebebuí nº 2623 - Marco - CEP: 66087-670  
Belém/Pará. Fone: (91) 3276-3387, e-mail: [ceuauepa2017@gmail.com](mailto:ceuauepa2017@gmail.com)

