

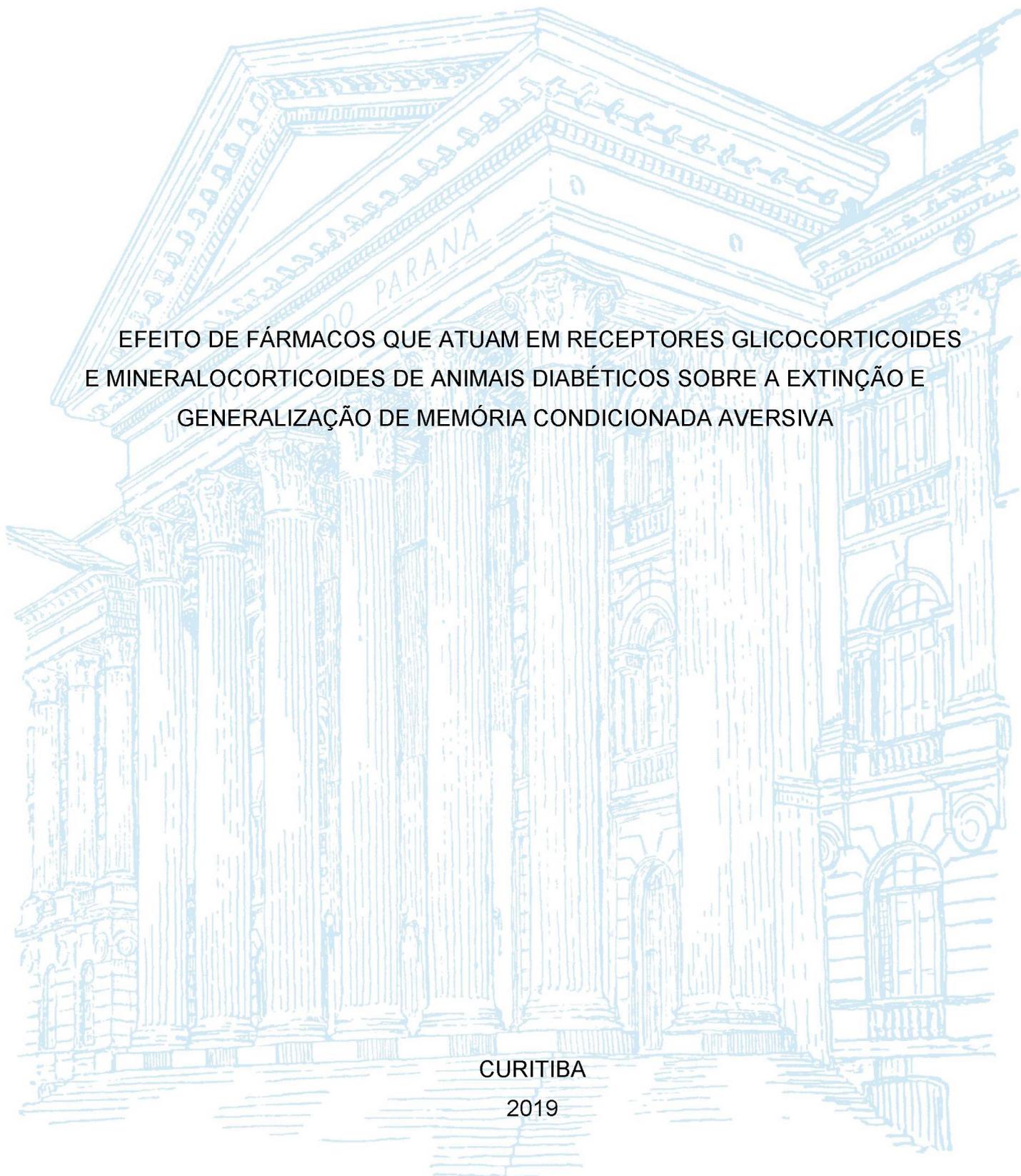
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO OLIARI RIBEIRO

EFEITO DE FÁRMACOS QUE ATUAM EM RECEPTORES GLICOCORTICOIDES
E MINERALOCORTICOIDES DE ANIMAIS DIABÉTICOS SOBRE A EXTINÇÃO E
GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIA CONDICIONADA AVERSIVA

CURITIBA

2019



THIAGO OLIARI RIBEIRO

EFEITO DE FÁRMACOS QUE ATUAM EM RECEPTORES GLICOCORTICOIDES E
MINERALOCORTICOIDES DE ANIMAIS DIABÉTICOS SOBRE A EXTINÇÃO E
GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIA CONDICIONADA AVERSIVA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Janaina Menezes Zanoveli

CURITIBA

2019

Ribeiro, Thiago Oliari

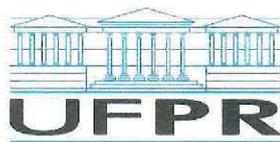
Efeito de fármacos que atuam em receptores glicocorticoides e mineralocorticoides de animais diabéticos sobre a extinção e generalização de memória condicionada aversiva [recurso eletrônico] / Thiago Oliari Ribeiro – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Janaina Menezes Zanoveli

1. Estreptozotocina. 2. Diabetes. 3. Hipocampo. 4. Córtex pré-frontal. 5. Receptor de glicocorticoides. 6. Memória aversiva. 7. Ansiedade. 8. Medo condicionado ao contexto. I. Zanoveli, Janaina Menezes. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

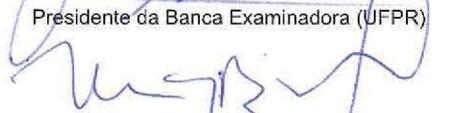
TERMO DE APROVAÇÃO

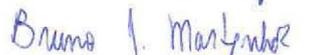
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **THIAGO OLIARI RIBEIRO** intitulada: **EFEITO DE FÁRMACOS QUE ATUAM EM RECEPTORES GLICOCORTICOIDES E MINERALOCORTICOIDES DE ANIMAIS DIABÉTICOS SOBRE A EXTINÇÃO E GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIA CONDICIONADA AVERSIVA**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Junho de 2019.


JANAÍNA MENEZES ZANOVELI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL
Avaliador Interno (UFPR)


BRUNO JACSON MARTYNHAK
Avaliador Externo (UFPR)

A todos que se dispuseram a **não ter certeza** alguma.

AGRADECIMENTOS

Emprestando o título da famosa obra do historiador Eric Hobsbawm, ousou afirmar que vivemos uma “era dos extremos”, mesmo que esses extremos sejam apenas fantasmas calcados na expressão mais icônica de nossos tempos: as *fake news*.

Dentro dessa peça – de diretor sarcástico – que se desenrola nos campos político, social e econômico, devo agradecer aqueles atores que me dão sentido e esperança dentro dessa caótica tragicomédia.

Agradeço à minha mãe, pelo esforço incomensurável e hercúleo – um pouco mais pra Sísifo do que Hércules para ser sincero – que fez e faz para que eu pudesse estudar e ser quem sou. A meu pai por filosofar ao meu lado, criando em mim uma constante certeza de não saber e a necessidade de não saber um pouco além.

Gostaria de destacar a presença da Camila em minha vida. Sem ela, esse mestrado não seria uma realidade. Minha parceria de vida, uma grande fogueira que me contagia e me aquece. Impossível não me apaixonar todos os dias pela sua beleza, inteligência e espontaneidade. Não esquecendo do nosso filhotinho: o Pepperoni, a fonte de metade da minha rinite. Além disso tudo, a Camila trouxe consigo sua família que se tornou minha também. Em especial a Dani, que insiste em ser a minha mais nova irmã – e pentelha.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos Enrico, Franco, João, Rafael, Rodrigo e Vitor, seres fenomenais e que eu tenho a felicidade de partilhar tantas memórias divertidas e algumas amnésias também.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha orientadora que deu o voto de confiança em mim, além do apoio, direcionamento, cuidado e amizade. Junto a isso aos meus colegas de bancada, ou troca de caixas, Ana Paula, Álvaro, Manu, Yane e Helen, por todas as conversas, ensinamentos e momentos de desespero e descontração que partilhamos.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.” - PORTARIA Nº 206, DE 4 DE SETEMBRO DE 2018.

“Não se pode comer um bolo sem o perder”

Fernando Pessoa

RESUMO

Estudos apontam que a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) está desregulada no diabetes *mellitus* e como uma consequência os níveis de cortisol/corticosteroide encontram-se aumentados. No entanto, pouco se sabe sobre o impacto dessa desregulação e o envolvimento dos receptores mineralocorticóides (MR) e glicocorticóides (GR) na memória aversiva e na resposta do tipo ansiosa associada ao diabetes. O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar a extinção da memória do medo e a generalização dessa memória de medo em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (DBT) e ratos não-DBT juntamente com a expressão dos receptores MR e GR no hipocampo (HIP) e córtex pré-frontal (CPF), duas áreas cerebrais que medeiam parte das respostas defensivas. No segundo conjunto de experimentos, tendo em vista que estudos apontam um efeito benéfico da ativação de MR ou bloqueio de GR nos parâmetros específicos relacionados ao diabetes, avaliamos o efeito da ativação de MR e do bloqueio de GR na aquisição da extinção da memória do medo e na generalização de memórias de medo. Quando apropriado, o comportamento do tipo ansioso foi avaliado. Para isso, ratos machos da linhagem Wistar receberam uma dose de estreptozotocina (60 mg/kg; i.p.) para induzir o diabetes, os animais normoglicêmicos (NGL) receberam o tampão citrato. Após quatro semanas, todos os animais (DBT, NGL e/ou não-DBT, *i.e.* animais que não se tornaram DBT após injeção de estreptozotocina) foram submetidos a um protocolo de medo contextual condicionado e o comportamento de congelamento foi avaliado como índice para a memória de medo. Os resultados mostraram uma dificuldade de extinção e uma maior generalização das memórias de medo no grupo DBT quando comparados aos grupos não-DBT, enquanto a expressão de MR e GR no HIP e CPF de todos os grupos de animais foram similares. Uma dose única de fludrocortisona, agonista MR, facilitou a aquisição da extinção da memória do medo e prejudicou sua generalização, enquanto a mifepristona, antagonista GR, prejudicou a generalização da memória do medo. No entanto, este efeito foi bloqueado por dose prévia do antagonista MR, espirolactona. Todos os tratamentos foram capazes de exercer efeitos do tipo ansiolítico. Em conjunto, esses resultados indicam que a ativação de MR em animais DBT parece ser primordial para facilitar a aquisição da extinção da memória do medo e dificultar a generalização da memória do medo, sem descartar o envolvimento do comportamento emocional nesses processos.

Palavras-chave: estreptozotocina, diabetes, hipocampo, córtex pré-frontal, receptor de glicocorticóides, memória aversiva, ansiedade, medo condicionado ao contexto.

ABSTRACT

It is known that hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA) activity is dysregulated in the diabetes *mellitus* showing increased cortisol/corticosteroid levels. However, little is known about the impact of this dysregulation and of the involvement of mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) receptors on aversive memory and anxiety-like response associated with diabetes. The first aim of this study was to evaluate the fear memory extinction and the generalization of this fear memory in streptozotocin-induced diabetic (DBT) rats and non-DBT rats alongside the expression of the MR and GR receptors in the hippocampus (HIP) and prefrontal cortex (PFC), two brain areas involved in the mediation of defensive responses. In the second set of experiments, since some studies point out a beneficial effect of MR activation or GR blockade on specific parameters related to diabetes we intended to evaluate the effect of the MR activation and GR blockade on the acquisition of fear memory extinction and on the generalization of fear memories. When appropriated, anxiety-related behavior was evaluated. For that, male Wistar rats received one injection of streptozotocin (60 mg/kg; i.p.) to induce diabetes, the normoglycemic (NGL) animals received the citrate buffer. After four weeks, all animals (DBT, NGL and/or non-DBT, i.e. animals that did not become DBT after streptozotocin injection) were subjected to a conditioned contextual fear protocol and the freezing behavior was evaluated as an index for fear memory. The results showed an impaired extinction and enhanced generalization of fear memories in the DBT group when compared to the non-DBT groups, whereas the expression of MR and GR in the HIP and PFC of all groups of animals were similar. The single injection of MR agonist fludrocortisone was able to facilitate the acquisition of fear memory extinction and to impair its generalization, while the injection of GR antagonist mifepristone impaired the generalization of the fear memory. However, this effect was blocked by the previous injection of the MR antagonist spironolactone. All treatments were able to exert anxiolytic-like effects. Taken together, these results indicate that MR activation in DBT animals seems to be primordial in facilitating the acquisition of the fear memory extinction and impairing the generalization of fear memory, without discarding the involvement of emotional behavior in these processes.

Keywords: streptozotocin, diabetes, hippocampus, prefrontal cortex, glucocorticoid receptor, aversive memory, anxiety, contextual conditioned fear.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da representação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal e seu funcionamento.....	18
Figura 2: Divisão dos grupos experimentais.....	25
Figura 3: Esquema da representação do teste de condicionamento de medo ao contexto:.....	28
Figura 4: Expressão de receptor glicocorticóide (GR) e mineralocorticóide (MR) no córtex pré-frontal de animais submetidos ao protocolo de medo contextual condicionado.	35
Figura 5: Expressão de GR e MR no hipocampo de animais submetidos ao protocolo de medo contextual condicionado.	36
Figura 6: Efeitos do protocolo de indução do diabetes no tempo de congelamento na extinção e generalização da memória do medo.	38
Figura 7: Efeitos da injeção do agonista MR na extinção e generalização da memória do medo.	40
Figura 8: Efeitos da injeção de antagonista de GR na extinção e generalização da memória do medo.	42
Figura 9: Efeitos do antagonista de GR na presença do antagonista de MR na extinção e generalização da memória do medo.	44
Figura 10: Efeitos dos antagonistas de MR e GR ou agonista de MR no comportamento semelhante à ansiedade.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do procedimento de diabetização <i>per se</i> sobre os parâmetros de glicemia e peso dos animais.	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

CCA – Córtex Cingulado Anterior

CPF – Córtex Pré-Frontal

CPFm – Córtex Pré-Frontal Medial

CPFvl – Córtex Pré-Frontal Ventrolateral

DBT – Diabético

DM – Diabetes *mellitus*

DSM-V – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição

EPM – Erro padrão da média

FLU – Fludrocortisona

GC – Glicocorticoides

GR – Receptor de glicocorticoide

HIP – Hipocampo

HPA – Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

i.p. - Intraperitoneal

IDF – *International Diabetes Federation*

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

MIFE – Mifepristona

MR – Receptor de mineralocorticoide

NGL – Normoglicêmicos

Não-DBT – animais que passaram pela indução ao diabetes e não se tornaram diabéticos

s.c – Subcutânea

SPIRO – Espironolactona

STZ – Estreptozotocina

TAG – Transtorno de Ansiedade Generalizada

TP – Transtorno do Pânico

VEI – Veículo

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

YLD – *Years Lived with disability*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	O DIABETES <i>MELLITUS</i>	13
1.2	TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO ASSOCIADO AO DIABETES.....	15
1.3	EIXO HPA E O DIABETES, TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO	17
1.4	DIABETES E AS ALTERAÇÕES GERADAS PELA HIPERCORTISOLEMIA ..	20
2	OBJETIVOS E HIPÓTESE.....	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
2.3	HIPÓTESE.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	ANIMAIS	24
3.2	DROGAS E TRATAMENTO	24
3.3	INDUÇÃO DO DIABETES	25
3.5	TESTES COMPORTAMENTAIS	26
3.5.1	Teste de condicionamento ao medo contextual e teste de generalização.....	26
3.6	EUTANÁSIA.....	28
3.7	WESTERN BLOTTING	28
3.7.1	Retirada do material.....	28
3.7.2	Extração das proteínas	29
3.7.3	Quantificação das proteínas	30
3.7.4	Corrida e transferência	30
3.7.5	Revelação e análise das imagens	31
3.8	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	31
3.9	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	32
3.9.1	Experimento 1.....	32
3.9.2	Experimentos 2 e 3.....	32
3.9.3	Experimento 4.....	33
3.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
4	RESULTADOS	34

4.1	EFEITO DO PROTOCOLO DE DIABETIZAÇÃO SOBRE PARAMÊTROS FISIOLÓGICOS CARACTERÍSTICOS DO DIABETES <i>MELLITUS</i>	34
4.2	EXPRESSÃO DE RECEPTORES MR E GR	35
4.2.1	Expressão de receptores MR e GR no córtex pré-frontal	35
4.2.2	Expressão de receptores MR e GR no hipocampo	36
4.3	EFEITO DO PROTOCOLO DE DIABETIZAÇÃO SOBRE A EXTINÇÃO E GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS	37
4.4	EFEITO DO AGONISTA MR SOBRE A EXTINÇÃO E GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS DE ANIMAIS DIABÉTICOS	38
4.5	EFEITO DO ANTAGONISTA GR SOBRE A EXTINÇÃO E GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS DE ANIMAIS DIABÉTICOS	41
4.6	EFEITO DO ANTAGONISTA GR NA PRESENÇA DE ANTAGONISTA MR SOBRE A EXTINÇÃO E GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS DE ANIMAIS DIABÉTICOS	43
4.7	EFEITO DOS ANTAGONISTAS MR E GR E AGONISTA MR SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO E LOCOMOÇÃO DE ANIMAIS DIABÉTICOS.....	45
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 O DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico que têm como principal característica o nível glicêmico elevado. Eles são comumente divididos em tipo 1, geralmente associado à destruição de células β pancreáticas por células imunes e, por consequência, incapacidade de excreção insulínica; e tipo 2, caracterizado pela resistência à insulina e deficiência de produção desse hormônio em graus variados (Kerner & Brückel, 2014). Existem ainda tipos menos prevalentes, como o diabetes gestacional e um grupo classificado como outros tipos de diabetes, que agrupa diferentes etiologias (Kharroubi & Darwish, 2015; American Diabetes Association, 2010).

O diagnóstico do DM, segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* – WHO; 2006) em parceria com a Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation* – IDF; 2006), é feito a partir da medição do nível de glicose no plasma. São considerados diabéticos aqueles que apresentarem mais ou igual a 7,0 mmol/l (126 mg/dl) de glicose no plasma quando em jejum, ou 11,1 mmol/l (200 mg/dl) duas horas depois do consumo de 75 g de glicose via oral, tanto para diabéticos do tipo 1 quanto para o tipo 2. No caso do diabetes gestacional, a glicemia pode ficar abaixo dos valores indicados, desde que acima do considerado normoglicêmico (WHO, 2016).

Os principais sintomas do estado hiperglicêmico são a polidipsia, poliúria, polifagia, perda de peso, visão turva e fadiga (Kerner & Brückel, 2014; ADA, 2010). Esses sintomas são mais perceptíveis em paciente com DM tipo 1 pelo seu início mais abrupto, diferentemente do tipo 2 que se estabelece gradualmente de maneira mais lenta (WHO, 2016; Kerner & Brückel, 2014). A longo prazo, o estado de hiperglicemia é capaz de gerar danos em diferentes tecidos do organismo, sendo as consequências mais proeminentes desses danos a retinopatia, a neuropatia, a nefropatia, problemas cardiovasculares, disfunção sexual, dentre outros (WHO, 2016; ADA, 2010).

Para que não ocorram as consequências do estado hiperglicêmico o

tratamento do DM é baseado no controle glicêmico. No tipo 1, o tratamento principal baseia-se na aplicação de insulina, visto a incapacidade de produção desse hormônio pelos sujeitos acometidos por essa patologia. Já no tipo 2, baseia-se principalmente no uso de medicamentos hipoglicemiantes (WHO, 2016). Porém, a taxa de adesão ao tratamento, com o correto controle da glicemia é considerada baixa (Krass et al., 2015; Davies et al., 2013). Em uma revisão sistemática de Krass e colaboradores (2015), os números variam de uma adesão ao tratamento de 38,5% até 93,1%, no diabetes tipo 2, sendo que menos de 23% dos estudos relatam uma adesão maior que 80%.

O DM tipo 1 está classicamente associado a fatores genéticos; assim, o diagnóstico ocorre principalmente em crianças e jovens o que deveria levar a uma incidência populacional estável. Já o DM tipo 2 está mais associado aos hábitos e histórico de vida dos pacientes, acompanhando, a sua incidência, fatores de risco ambientais. Entretanto, no último século fora observado um aumento na incidência do DM tipo 1 na população mundial, fato que indica possíveis gatilhos ambientais para essa patologia, como infecção materna enteroviral no período de gestação, microbiota anormal, eventos estressores infantis, entre outros; há também a possibilidade de fatores como a puberdade e estresse psíquico levarem a uma maior progressão do DM tipo 1 (Snouffer, 2017; Gale, 2002). Interessante notar que apesar da descrição desses fatores para gatilho e progressão que auxiliam a explicar o aumento de incidência, o DM do tipo 1 não é evitável, diferentemente do tipo 2 para o qual existem recomendações de políticas públicas e mudanças de hábitos de vida visando a diminuição da sua prevalência (WHO, 2016). Ou seja, mais do que avanços políticos e transformações de comportamentos, no atual cenário, o DM do tipo 1 necessita de avanços na área médica para que se diminua seu impacto na vida do paciente e no mundo.

Quando pensamos em impacto global e econômico do DM, deve-se entender que devido ao alto valor para consolidar o diagnóstico diferencial entre tipo 1 e tipo 2, e também devido a sua semelhança sintomática, os dados globais acabam sendo apresentados conjuntamente (WHO, 2016). Assim, em seu relatório global sobre diabetes, a Organização Mundial da Saúde (2016) estimou que, no ano de 2014, 442 milhões de adultos viviam com diabetes. Com tal prevalência, aferiu-se um gasto

direto de 827 bilhões de dólares anuais para os sistemas de saúde (WHO, 2016; NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), 2016; Seuring et al., 2015), além da perda de 1,7 trilhão de dólares para os produtos internos brutos à nível mundial (WHO, 2016; Smith-spangler et al., 2012) . Para o ano de 2017, estimou-se uma prevalência de 8,7% de diabéticos no Brasil, contra a média mundial de 8,8% (IDF, 2017a, 2017b). Quando lançado o olhar sobre a progressão de casos de DM do tipo 1 no Brasil, um estudo regional de Bauru/São Paulo mostra o aumento anual de casos em 3,1%, muito semelhante ao reportado 3,0% da média mundial (Negrato et al., 2017). Um número bastante importante e significativo, dado que o Brasil ocupa o terceiro lugar no *ranking* de surgimento de casos novos de DM do tipo 1 (IDF, 2017a).

1.2 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO ASSOCIADO AO DIABETES

Na psiquiatria moderna, os transtornos de ansiedade se caracterizam por respostas de medo e ansiedade mal adaptativos a diferentes objetos e contextos. A ansiedade se caracteriza por uma resposta a uma ameaça potencial, enquanto o medo surge de uma ameaça real e proximal (American Psychiatry Association, 2013) Dentre os transtornos de ansiedade estão o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG) o Transtorno do Pânico (TP) Fobia Específica, Agorafobia, entre outros. Para o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5 (DSM-V) (2013), o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) não está incluso dentro da classificação de transtorno de ansiedade, no entanto a Organização Mundial da Saúde (2017) o classifica sob a mesma nomenclatura de transtornos de ansiedade, para fins de dados epidemiológicos, por ter esse transtorno diversas características semelhantes com os demais citados. Ainda é importante ressaltar que os transtornos de ansiedade costumam ter longa duração na vida dos sujeitos acometidos, podendo ser entendido como uma doença crônica (WHO, 2017).

Os transtornos de ansiedade e o TEPT tem impactos sociais importantes. Utilizando a medida de impacto social YLD (*Years Lived with Disability*) estimou-se que em 2015, no mundo, esses transtornos seriam 3,4% dos YLDs de todas as doenças somadas. Esses transtornos acometem 3,6% da população mundial. No

Brasil, os dados se tornam ainda mais expressivos. O Brasil é o país com maior incidência de transtorno de ansiedade na população: 9,3%. Além disso, esses transtornos correspondem a 8,3% de YLD quando em relação ao total das patologias (WHO, 2017).

A incidência de DM, na população, apresenta-se ao lado de uma elevada taxa de prevalência de estados psicopatológicos. Pacientes diabéticos apresentam uma maior probabilidade de serem diagnosticados com transtornos de ansiedade, TEPT e seus sintomas (Smith et al., 2013). Em um estudo brasileiro, Santos e colaboradores (2014) observaram que, a prevalência de TAG em sujeitos com DM e dependentes de insulina chegou a 34,1% contra 21,8% para indivíduos não diabéticos, além de uma maior prevalência de TP, 25,7% contra 12,3%. Um estudo conduzido na Índia, encontrou um prevalência de Ansiedade de 26,7% na população diabética e apenas 12,7% em pacientes sem DM (Rajput et al., 2016). Em outro estudo conduzido na China, foi reportado uma prevalência de 11,89% de incidência de Ansiedade em pessoas diabéticas, contra 5,82% em não diabéticos. Apesar dessa maior incidência de DM em pacientes diagnosticados com Transtornos de Ansiedade, a direção dessa associação não está completamente elucidada. Um estudo de meta análise de Smith e colaboradores (2018) apontou para a possibilidade da Ansiedade ser um preditor para um futuro desenvolvimento do DM e do DM também ser uma possível variável para o desenvolvimento de Transtornos de Ansiedade. Em relação ao TEPT, este também parece ser uma possível comorbidade do DM (Miller-archie et al., 2014). Um estudo de Boden (2018) encontrou uma prevalência de 6,1% contra 4,5% de pacientes com TEPT em diabéticos quando comparado a sujeitos não diabéticos. Em um estudo longitudinal de 22 anos, mulheres que tiveram maiores escores em sintomas de TEPT tiveram o risco de desenvolver DM do tipo 2 aumentado em 2 vezes (Roberts et al., 2015).

Em termos comportamentais, os Transtornos de Ansiedade (principalmente o TAG e TP), incluindo também o TEPT, podem ser compreendidos como um processo de generalização do medo e/ou da ansiedade. Dado que o processo de generalização do medo/ansiedade é a ampliação de respostas comportamentais de medo e/ou ansiedade para estímulos que não apresentaram, até então, a capacidade de elicitar esses estados fisiológicos (Dymond et al., 2015).

Sob uma outra perspectiva, evidências obtidas de estudo neurobiológicas relacionados ao TEPT apontam para uma diminuição na atividade do córtex cingulado anterior (CCA) em sua porção ventral, do córtex pré-frontal medial (CPFm) e córtex órbito-frontal. Mais ainda, tem sido relatado um aumento significativo na ativação da amígdala, ínsula anterior, porção dorsal do CCA e uma atividade hipocampal basal mais pronunciada (Patel et al., 2012). As funções alteradas ainda são acompanhadas da diminuição do volume do hipocampo (HIP), CPFm e CCA (Heim & Nemeroff, 2009). Outra região de interesse é o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), por ser muito relevante para os processos mnemônicos que envolvam estresse e medo. Assim, o desenvolvimento do TEPT provavelmente está ligado a uma desregulação prévia do eixo HPA, fato que levaria a respostas inadequadas a eventos traumáticos. Importante ressaltar que há dados controversos quanto às alterações na atividade do eixo HPA durante o curso do TEPT, sendo essas alterações dependentes do tempo de evolução, do curso da doença e dos sintomas apresentados. (Dunlop & Wong, 2018).

Da mesma forma que no TEPT, na neurobiologia do TAG, os dados apontam uma disfunção no CCA ventral e dorsal, assim como no CPFm (Patel et al., 2012). Existe ainda um aumento compensatório da atividade do córtex pré-frontal ventrolateral (CPFvl) e grande ativação da ínsula e amígdala, além de um possível maior volume dessa última (Martin et al., 2013; Strawn et al., 2012). Assim como o que ocorre no TEPT, uma resposta inadequada do eixo HPA e alterações prévias aos transtornos, aparecem como fatores de risco. Vários estudos relacionam o TAG com a hiperativação do eixo, mas não sem evidências contraditórias, assim como ocorre no TEPT (Faravelli et al., 2012).

1.3 EIXO HPA E O DIABETES, TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O eixo HPA é um sistema neuroendócrino tendo três componentes principais: o hipotálamo, pituitária (ou hipófise) e adrenais. O principal hormônio do eixo HPA é o glicocorticoide (GC) (principalmente cortisol em humanos e corticosterona em roedores). O glicocorticoide funciona como um modulador negativo de sua própria

A seletividade da ligação aos sítios está relacionada ao nível de glicocorticoides circulantes, sendo que em taxa basal os sítios de MR estão ocupados, tendo em vista sua maior afinidade com os GCs. Com o aumento da quantidade de GCs ocorre a ocupação de sítios nos GRs (Joëls & de Kloet, 2017; Pace & Spencer, 2005). É importante destacar que os GCs têm efeitos genômicos e não-genômicos alterando nas células em que se encontram fatores ligados à neuroplasticidade, produção e liberação de neurotransmissores e proteínas. Sabe-se que os GRs são expressos com alta densidade em centros reguladores do estresse, como hipotálamo e circuitaria amígdala-hipocampo-córtex pré-frontal; enquanto o MR está em várias áreas límbicas, mas principalmente no hipocampo, septo lateral e amígdala (Joëls & de Kloet, 2017; Gray et al., 2017). A regulação do eixo HPA depende de uma fina comunicação entre a amígdala que projeta e recebe projeções do córtex pré-frontal e áreas límbicas (como o hipocampo) e que concomitantemente modulam a liberação dos GCs (ver Figura 1) (Calhoon & Tye, 2015; Ross et al., 2017).

A importância dos MRs é dada pela capacidade em mediar respostas comportamentais iniciais a eventos estressores. Tal função é proposta dado que os MRs medeiam tanto a recuperação de eventos mnemônicos quanto a atenção seletiva de roedores, fato que afeta diretamente a escolha comportamental desses animais frente aos eventos estressores que desencadearam a ocupação de MR. A importância dos GRs, mais tardiamente ocupados, para as repostas comportamentais se dá principalmente sobre a regulação do eixo HPA realizando o “*feedback*” negativo do eixo. Ademais, os GRs desempenham um importante papel na consolidação de memórias ligadas a eventos estressores. Ou seja, os GRs auxiliam na geração dos traços mnemônicos que serão acessados rapidamente na ativação dos MRs (Joëls & de Kloet, 2017). O equilíbrio de ativação entre MR e GR é fundamental para uma resposta comportamental adaptativa frente ao estresse. Todavia, e de importância para este estudo, sabe-se que no diabetes o eixo HPA está hiperativado (Diz-chaves et al., 2016).

O aumento do nível de corticosterona chega à ser duas vezes maior em um modelo de DM tipo 1, ou seja, em ratos diabetizados com estreptozotocina, quando comparado com animais normoglicêmicos (Kuznetsova et al., 2014). Essa hiperativação é acompanhada de uma capacidade diminuída de reestabelecimento

das taxas basais de corticosterona em animais diabetizados com estreptozotocina, após passarem por um evento estressor, indicando que o “*feedback*” negativo do eixo HPA esteja prejudicado na condição do diabetes (Chan et al., 2002). Assim, ocorreria um maior nível de GCs circulantes, tanto no modelo de DM tipo 1, como do tipo 2 (Erickson et al., 2017). Diz-Chaves e colaboradores (2016) concordam que há uma ativação crônica do eixo HPA em sujeitos diabéticos, o que geraria esse aumento nos níveis de GCs e do hormônio liberador de corticotrofina. Essa hiperativação do eixo HPA é capaz de gerar alterações metabólicas que propiciam o desenvolvimento e/ou a piora do DM uma vez que os GCs podem aumentar a resistência à ação da insulina, gravando ainda mais o quadro hiperglicêmico.

Assim, uma doença metabólica como o DM, com o alto nível circulante de GCs, é capaz de gerar efeitos comportamentais parecidos com os efeitos induzidos pelo estresse crônico (Diz-chaves et al., 2016). Lukaschek e colaboradores (2013) propõem que a associação entre o TEPT e o DM pode ser explicada, parcialmente, pela ativação crônica das vias de estresse; no caso, a ativação do eixo HPA que ocasiona um aumento excessivo de cortisol em humanos e corticosterona em ratos e levaria a alterações metabólicas e cerebrais.

Interessante ainda notar que há estudos apontando que a ativação constante dessa via de estresse na infância apresenta correlação positiva com a incidência do DM (Huffhines et al., 2016). Dessa forma, os quadros ansiosos podem ter como uma das variáveis de sua gênese o estresse do organismo gerado pelo diabetes (Bystritsky et al, 2014), ao mesmo tempo em que o estresse gerados por essas psicopatologias podem também ampliar o risco de desenvolver o DM (Smith et al., 2018).

1.4 DIABETES E AS ALTERAÇÕES GERADAS PELA HIPERCORTISOLEMIA

Sabe-se que animais com diabetes induzido por estreptozotocina apresentam, além de respostas de medo mais pronunciadas (Gambeta et al., 2016; de Souza et al., 2019; da Silva Dias et al., 2016; Redivo et al., 2016; Ikeda et al. al., 2015; Zhang et al., 2018), apresentam uma série de alterações nas áreas cerebrais envolvidas na mediação de emoções, como o HIP e o CPF (da Silva Dias et al., 2016; Redivo et al.,

2016; Stranahan et al. 2010, 2008; Revsin et al., 2009; Zuo et al., 2011; Wrighten et al., 2009). Nessa direção, foram relatadas nessas áreas cerebrais, aumento citocinas pró-inflamatórias e astrogliose, alteração do o sistema de neurotransmissão, expressão reduzida do fator neurotrófico derivado do cérebro e neurogênese (Da Silva Dias et al., 2016; Stranahan et al., 2008; Revsin et al., 2009; Zuo et al., 2011; de Moraes et al., 2016; Muriach et al., 2014). Curiosamente, Stranahan et al. (2008) mostraram que a hipercortisolemia devido ao diabetes experimentalmente induzido parece ser responsável pela degeneração morfológica e funcional no HIP, demonstrando que a adrenalectomia com reposição de corticosterona em concentrações fisiológicas foi capaz de normalizar todos esses danos, ao lado de uma melhora do comprometimento, assim como melhora o déficit na potenciação de longo-prazo e o déficit no desempenho cognitivo. Em 2010, os mesmos autores (Stranahan et al.) mostraram que a ativação da MR induziu um efeito benéfico na potenciação de longo-prazo em fatias de hipocampo de animais diabéticos. Além disso, Zuo et al. (2011) evidenciaram que o tratamento com antagonista de GR (RU486 por 9 dias consecutivos) melhorou a função cognitiva em ratos com DM experimental induzida por estreptozotocina e reverteu a regulação negativa da proteína ácida fibrilar glial, um indicador chave da reatividade astrocítica, e do gene "*N-myc downstream-regulated 2*" de astrócitos, envolvido na diferenciação e desenvolvimento celular.

Como não há estudos investigando o papel da GR e da MR na memória aversiva em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, o presente estudo teve como objetivo investigar, utilizando o protocolo contextual de condicionamento do medo, a extinção da memória aversiva e a generalização dessa memória, comparando com animais não diabéticos. Além disso, a expressão de GR e MR citosólica e nuclear no HIP e no CPF foi avaliada nesses animais. No segundo conjunto de experimentos, pretendemos testar os efeitos comportamentais da ativação de MR ou do bloqueio de GR na aquisição da extinção de memória aversiva, na generalização da memória aversiva e nas respostas ansiosas.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESE

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta comportamental de animais diabéticos em relação a normoglicêmicos que tenham passado ou não por injeção de estreptozotocina e investigar a expressão de receptores MR e GR nesses animais.

Avaliar o efeito da manipulação farmacológica dos receptores MR e GR sobre a aquisição da extinção e sobre a generalização de memória aversiva de animais com DM tipo 1 induzida por estreptozotocina e submetidos ao teste de medo condicionado contextual.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar de forma comparativa a extinção e a generalização de medo em animais normoglicêmicos, animais diabéticos e animais que foram diabetizados com estreptozotocina mas que não se tornaram diabéticos;
- Avaliar a expressão de receptores glicocorticoides e mineralocorticoides no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos normoglicêmicos, diabéticos e daqueles que foram diabetizados com estreptozotocina mas que não se tornaram diabéticos;
- Avaliar o efeito do tratamento com fludrocortisona (agonista MR) sobre a aquisição da extinção e sobre a generalização do medo em animais diabetizados com estreptozotocina;
- Avaliar o efeito do tratamento com mifepristona (antagonista GR) sobre a aquisição da extinção e sobre a generalização do medo em animais diabetizados com estreptozotocina;
- Avaliar o efeito do tratamento com mifepristona (antagonista GR) em associação com espironolactona (antagonista MR) sobre a aquisição da extinção e sobre a generalização do medo em animais diabetizados com estreptozotocina;

- Avaliar o possível efeito ansiolítico das doses eficazes das drogas estudadas em animais diabéticos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado.

2.3 HIPÓTESE

Inicialmente hipotetizamos que haveria diferenças nas expressões de MR e GR entre o grupo diabético e os outros dois grupos normoglicêmicos. Além disso, fora levantada a hipótese de que o tratamento com fludrocortisona (agonista MR) se mostraria mais efetivo em facilitar a aquisição da extinção da memória de medo e, ainda, prejudicaria a generalização dessa memória nos animais diabéticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* (ratos Wistar) entre 180g e 200g foram utilizados para a pesquisa. Todos os animais foram providos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Os animais permaneceram sob condições controladas de biotério, com temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12:12 (luzes acesas às 7h e apagadas às 19h), água e ração *ad libitum* (à vontade), com sistema de exaustão na sala. Os animais foram alocados em 5 por gaiola plástica (41x 32x16,5 cm) forrada com maravalha sendo que a troca e limpeza das caixas foi feita diariamente para animais diabéticos e 3 vezes por semana para normoglicêmicos. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) sob o número de registro 1073, estando de acordo com a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos.

3.2 DROGAS E TRATAMENTO

Para o estudo, foram utilizadas as seguintes drogas provenientes das fontes indicadas: antagonista de receptor glicocorticóide (GR) mifepristona (Sigma, EUA), agonista de receptor mineralocorticóide (MR) fludrocortisona (Sigma, EUA), antagonista de MR espironolactona (Sigma, EUA) e estreptozotocina (Santa Cruz Biotechnology, EUA).

A fludrocortisona foi dissolvida em 0,5% de carboximetilcelulose, 0,4% de Tween-80, 0,9% de álcool benzílico e salina e foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 5, 10 mg/kg e 50mg/kg, 20 minutos antes do teste comportamental. Já a espironolactona e a mifepristona foram dissolvidas em propilenoglicol e administradas por via sub-cutânea (s.c.) na dose de 10 mg/kg (espironolactona e mifepristona) e 25 mg/kg (mifepristona), 60 minutos antes dos testes (Ninomiya et al., 2010).

A estreptozotocina (STZ) foi diluída em tampão citrato (10mM, pH 4,5) e administrada, por via intraperitoneal, na dose de 60mg/kg (de Moraes et al., 2016, 2014).

Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes da aplicação e administradas a um volume de 1 ml/kg.

3.3 INDUÇÃO DO DIABETES

O diabetes foi induzido por meio de uma dose única de estreptozotocina (STZ; 60mg/Kg, intraperitoneal; diluído em tampão citrato, 10 mM, pH 4,5) em animais após um jejum de 12 horas. O teste para confirmação da indução do diabetes foi realizado 3 dias após a dose aplicada. E foi feito com a retirada de 5µL de sangue caudal aplicadas em fitas de teste com glicose oxidase (Accu-CheckActive™, Roche). Foram considerados diabéticos os animais com valor glicêmico igual ou maior a 250 mg/dL. Os grupos controles normoglicêmicos receberão somente tampão citrato (10 mM, pH 4,5, volume equivalente) (de Moraes et al., 2014, 2016).

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 22 grupos experimentais, que estão representados na figura abaixo:

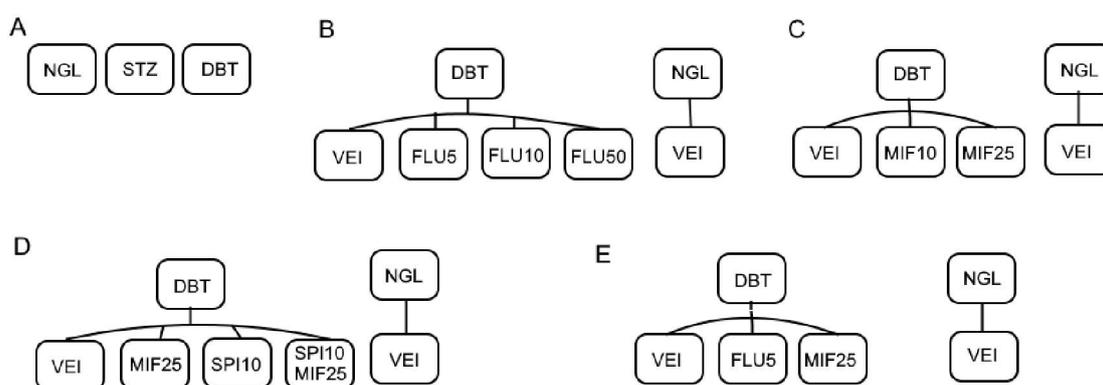


Figura 2: Divisão dos grupos experimentais. NGL = normoglicêmico, STZ = normoglicêmico para o qual foi aplicado estreptozotocina, DBT = diabético, VEI = veículo, FLU = fludrocortisona (5, 10 e 50 mg/kg), MIF = mifepristona (10 e 25 mg/kg), SPIR = (10 mg/kg). Experimento A = teste de medo

contextual e generalização, western blot; experimento B, C e D = teste de medo contextual e generalização; E = labirinto em cruz elevado.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.5.1 TESTE DE CONDICIONAMENTO AO MEDO CONTEXTUAL E TESTE DE GENERALIZAÇÃO

Para investigarmos comportamentos relacionados com a memória de medo/ansiedade, foi usado o modelo de condicionamento ao medo contextual, que pode auxiliar na compreensão de patologias como o TEPT e o TAG (Vanelzakker et al., 2014), mais ainda, este protocolo também nos permite avaliar a generalização da resposta de medo, visto que a generalização do medo é um processo presente principalmente no TEPT (Dymond et al., 2015).

O aparato utilizado consiste de uma caixa (contexto A) (26x31,5x21cm; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) a qual tem três lados de aço e o quarto lado é de acrílico transparente, o que permite a análise comportamental do animal, feito por meio de filmagens. O fundo da caixa consiste em pequenas barras de metal conectados a um estimulador elétrico que pode aplicar correntes elétricas nos animais e topo é feito de acrílico transparente. Para o teste de generalização o equipamento utilizado foi uma segunda caixa (contexto B) feita de acrílico transparente (30x30x30cm)

O condicionamento de medo contextual seguiu as seguintes etapas:

- 1º dia - familiarização ao contexto de condicionamento (contexto A – estímulo neutro): sendo uma apresentação do animal à câmara de condicionamento supracitada, na qual ele é colocado por 3 minutos sem que haja a apresentação de estímulos;

- 2º dia - condicionamento ao medo contextual (contexto A – estímulo neutro se torna estímulo condicionado): O animal é colocado na caixa de condicionamento. Porém, desta vez recebe 3 choques elétricos (estímulo incondicionado aversivo - 1mA, com duração de 3s), sendo que cada choque é precedido e sucedido de 30 segundos de latência, totalizando 129 segundos;

- 3º dia – treino de aquisição da extinção da memória de medo contextual

(contexto A – estímulo condicionado): O animal é inserido na caixa de condicionamento (contexto A) e permanece por 15 minutos sem a apresentação do estímulo incondicionado aversivo. Neste procedimento é avaliado o tempo (em segundos) que o animal permanece em congelamento. Nessa etapa, 20 minutos ou 1 hora (20min – fludrocortisona; 1h – mifepristona e espironolactona) antes do procedimento de extinção o fármaco (ou veículo) é aplicado, a fim de observarmos (no treino e teste de extinção) se o tratamento ou condição influencia a aquisição da extinção dessa memória.

- 4º dia - teste da aquisição extinção da memória demo contextual (contexto A – estímulo condicionado): O animal é recolocado na caixa de condicionamento (contexto A) por 3 minutos e quantifica-se novamente o tempo que o animal permanece em congelamento.

- 5º dia – teste de generalização de memória aversiva contextual (contexto B – estímulo neutro): O teste é realizado a fim de investigar uma possível resposta de generalização do medo. Assim, o animal é colocado em um novo contexto que é neutro (contexto B), durante 3 minutos.

O comportamento de congelamento de cada animal foi utilizado como um índice de memória aversiva ao contexto. Um animal foi considerado em congelamento quando este apresentou uma posição estereotipada com completa imobilidade, com exceção de movimentos de respiração. Para a limpeza entre os animais foi utilizado álcool etílico 20%.

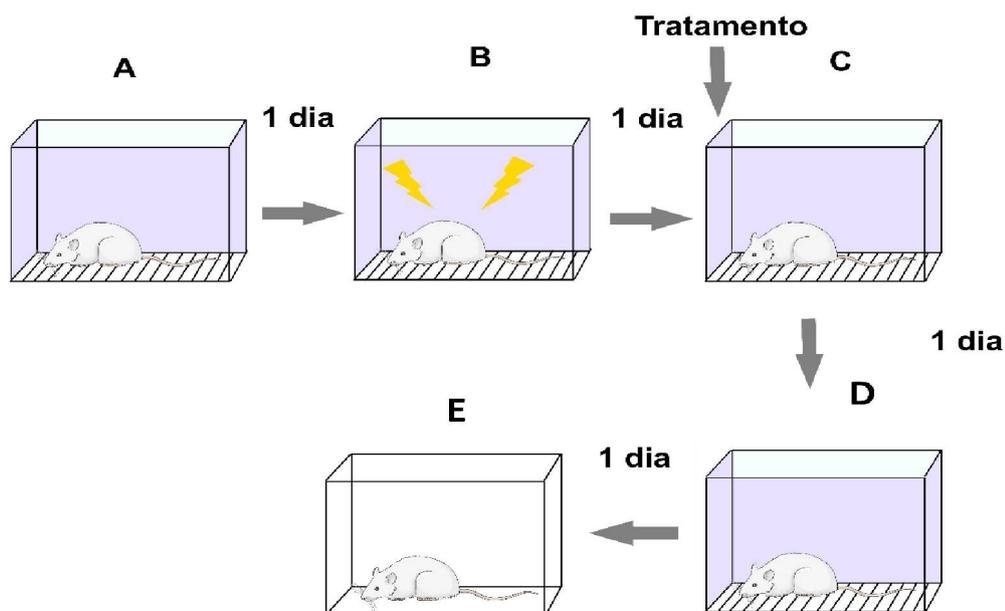


Figura 3: Esquema da representação do teste de condicionamento de medo ao contexto: Esquema da representação do teste de condicionamento de medo ao contexto. Momento “A” representa a familiarização (1º dia), momento “B” representa o condicionamento (2º dia), momento “C” representa o treino de extinção (3º dia), momento “D” representa o teste de extinção (4º dia) e “E” representa o teste de generalização (5º dia).

3.6 EUTANÁSIA

O método escolhido para eutanásia dos animais foi o da decapitação sem anestésico, seguindo as linhas mestras apresentadas pela American Veterinary Medical Association (2013). A preferência por esse protocolo de eutanásia se deu por gerar uma menor alteração na atividade eixo HPA (VAHL et al., 2005) e consequentemente diminuir vieses em testes com tecidos coletados.

3.7 WESTERN BLOTTING

3.7.1 Retirada do material

O hipocampo e córtex pré-frontal foram retirados dos animais logo após eutanásia (ver 3.6) colocados em tubos pré-refrigerados e colocados imediatamente em um isopor contendo gelo seco. Antes da passagem para o freezer -80, os

materiais foram transportados por 12h neste mesmo isopor.

3.7.2 Extração das proteínas

As amostras encefálicas que se encontravam congeladas a -80°C foram colocados em gelo molhado (temperatura média de 4°C), logo em seguida, foi adicionado às amostras o tampão de lise (10 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl_2 ; 10 mM KCl; 0,5 mM PMSF; 1 mM DTTT; cocktail comercial anti-proteases e fosfatases 1X (Halt™ Protease & phosphatase inhibitor cocktail (100X) #1861284, Thermo Scientific); qsp H₂O Milli-Q; sendo que foram utilizados 800 μl desse tampão para o hipocampo e 200 μl para o córtex pré-frontal). Depois, as amostras foram trituradas e homogeneizadas, durante o procedimento, os tubos permaneceram 10 minutos no gelo molhado. Ao fim desse procedimento, foi acrescentado 10 μl (a cada 400 μl de tampão de lise) de NP40 10%, os tubos ficaram 30 segundos no vórtex e foram centrifugados em 12.000g, também pelo período de 30 segundos, porém, à temperatura 4°C , para lisar a membrana celular. Com o surgimento do sobrenadante, contendo proteínas do citosol, esse foi transferido para um eppendorf (fração citosólica) para posteriormente serem quantificadas as proteínas. Ele foi, então, armazenado a -80°C . Enquanto, o pellet foi ressuspensionado com tampão de extração (20 mM HEPES pH 7,9; 1,5 mM MgCl_2 ; 300 mM NaCl; 0,25 mM EDTA; 25% glicerol P.A.; 0,5 mM PMSF; 1 mM DTTT; cocktail comercial anti-proteases e fosfatases 1X (Halt™ Protease & phosphatase inhibitor cocktail (100X) #1861284, Thermo Scientific); qsp H₂O Milli-Q; 200 μl para o hipocampo e 90 μl para o córtex frontal), e, por 30 minutos foi agitado a 300 rpm em uma temperatura de 4°C ; logo após foi centrifugado em 12.000g durante 20 minutos, em mesma temperatura. Dessa vez, visando a quebra da membrana nuclear das células. Esse sobrenadante com proteínas nucleares foi transferido para outro eppendorf (fração nuclear) para posteriormente serem quantificadas as proteínas contidas. E fora, então, armazenado a uma temperatura de -80°C . O protocolo de extração é uma adaptação do protocolo da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) de extração fracionada com NP40.

3.7.3 Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas seguiu em duplicatas por meio do método de Bradford (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) e uma medição da absorbância em 595 nm, utilizando o Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc, USA). O padrão, para comparar a concentração de proteínas, foi uma diluição de albumina (BSA) (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA). As amostras foram preparadas com 2µg/µl de proteínas, e 50% de tampão 2X Laemmli, 5% betamercaptoetanol e água Milli-Q, fervidas a 95°C por 5 minutos. Por até três meses as amostras foram armazenadas em menos - 20°C.

3.7.4 Corrida e transferência

O gel utilizado para a corrida foi o de SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 10% SDS), que na verdade, é composto de 2 géis que se sobrepõem durante o processo de polimerização, sendo então um gel de corrida e um stacking gel. Depois de passado o processo de polimerização, foi acrescentado o stacking gel (5%), e os pentes, ao gel de corrida (7,5%) nas raques.

Depois, os géis foram carregados com as amostras preparadas e submetidos à eletroforese em tampão de corrida (25 mM de trisbase, 0,192 M de glicina e 0,1% de SDS), durante o período 1 hora e 50 minutos a 90V. A transferência se deu por meio da eletroforese horizontal em um tampão de transferência (25 mM de tris-base, 192 mM de glicina) com 20% de metanol e 70% água destilada, por 2 horas a 400 mA com membranas de PVDF (Millipore Corporation, Bilerica, MA, USA), hidratadas em metanol. Ao fim desse procedimento, as membranas foram coradas, por 1 minuto, com uma solução de vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloroacético e água bidestilada) e lavadas, durante 5 minutos, com água destilada para tirar o excesso, tanto do TBS-T [TBS (100 mM tris-base; 0,9% NaCl e água destilada) e 0,1% de tween 20], quanto da solução de Ponceau (Salinovich e Montelaro, 1986). Logo após, iniciou-se a fase de bloqueio, para qual a membrana fora levada, que foi realizada por 2h com solução de 5% de leite desnatado/TBS-T (em incubações com o anticorpo anti-GR) e de 5% de BSA/TBS-T (em incubações com o anticorpo anti-

MR) tudo à temperatura ambiente para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Após a fase de bloqueio, foram, então, incubadas com o anticorpo primário de interesse - GR (M-20; SantaCruz sc1005) (1:1.000) e MR (NR3C2; Sigma-Aldrich #AV45599) (1:1.000) pernoitando sob agitação em uma temperatura de 4°C. No dia seguinte, passaram por 3 novas lavagem durante 10 minutos com TBS-T e, em seguida, incubadas com anticorpo HRP secundário (anti-Rb 1:2.000) por 2 horas. Por fim, passaram novamente pelo processo de 3 lavagens num período de 10 minutos.

3.7.5 Revelação e análise das imagens

Para a visualização das bandas foi acrescentado o Immobilon Forte Western HRP (WBLUF0500; Merck- Millipore, Darmstadt, Germany). A revelação feita no fotodocumentador ChemiDoc Imager (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA). Por último, a análise da densidade óptica das bandas usou o programa ImageLab 5.2 (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA).

3.8 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O teste foi inicialmente descrito por Pellow e colaboradores (1985) sendo um aparato validado para a avaliação do comportamento do tipo ansioso em modelo animal de ratos e camundongos (Walf & Frye, 2007).

O aparato é feito de madeira e fica a 50 cm do chão. O labirinto em cruz elevado (LCE) possui 4 braços de tamanho igual, 2 abertos e 2 fechados e no cruzamento entre os braços há uma área central de 10 cm². Durante 5 minutos da sessão de teste, cada animal foi colocado individualmente no centro do aparelho e seus movimentos foram registrados. Os comportamentos quantificados foram o tempo gasto nos braços abertos ou fechados e o número de entradas nestes mesmos braços. Após cada sessão de teste, o LCE foi limpo com uma solução de etanol a 20%.

3.9 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.9.1 Experimento 1

Para avaliar os efeitos da condição do DBT na memória aversiva, na quarta semana após a confirmação da condição diabética (dia 26) todos os grupos de animais - DBT, não-DBT (receberam injeção de estreptozotocina mas não se tornaram DBT) e NGL - foram submetidos ao protocolo de condicionamento de medo ao contexto: Familiarização (dia 26), condicionamento do medo ao contexto (dia 27), treino de extinção (dia 28), teste de extinção (dia 29) e teste de generalização (dia 30).

Vinte e quatro horas depois, todos os grupos de animais - DBT, não-DBT e NGL - foram eutanasiados por decapitação e o córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HIP) foram dissecados e mantidos congelados (-80) até a análise de Western Blotting para expressão de GR e MR nessas áreas cerebrais.

3.9.2 Experimentos 2 e 3

Para avaliar os efeitos da ativação de MR e bloqueio GR na aquisição de extinção de memória aversiva e generalização da memória aversiva, o delineamento dos experimentos foi o mesmo do Experimento 1, exceto que para o experimento 2 os animais DBTs receberam a injeção do agonista de MR fludrocortisona (i.p.), o do antagonista de GR mifepristona (s.c) ou veículo 20 minutos antes da sessão de treino de extinção. Dado que o bloqueio de GR poderia induzir um efeito pela ação agonista indireta da corticosterona endógena nos MRs, no Experimento 3 o antagonista de GR foi administrado na presença do antagonista MR. Assim, os animais receberam duas injeções antes da sessão do treino de extinção: injeção de espironolactona, antagonista de MR, ou o seu veículo (s.c.; 60 minutos antes) seguido da injeção de mifepristona, antagonista GR, ou do seu veículo (s.c.; 20 minutos antes).

3.9.3 Experimento 4

Com base no fato de que um efeito semelhante ao ansiolítico poderia alterar o comportamento de congelamento nos contextos (contexto A e B), também avaliamos os efeitos dos medicamentos no teste de LCE. Assim, na quarta semana após a confirmação da condição diabética (DBT) (dia 30), os animais DBT receberam uma dose única de fludrocortisona, agonista MR, mifepristona, antagonista GR, ou veículo. Vinte minutos depois, eles foram submetidos ao teste de LCE.

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi inicialmente utilizado para garantir que os dados preenchessem os critérios para a realização de testes paramétricos. Quando os critérios foram atendidos, os resultados foram relatados como a média \pm erro padrão da média (EPM). Para o Experimento 1, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, exceto para os dados obtidos para o treinamento de extinção, no qual aplicamos a ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Para os experimentos 2 e 3, os dados foram analisados com o teste *t* de Student para comparação entre os grupos NGL e DBT tratados com solução veículo. Entre os animais DBT, os dados foram analisados por ANOVA de uma via; exceto para os dados obtidos durante o treinamento de extinção em que aplicamos a ANOVA de duas vias com medidas repetidas. No experimento 4, o teste *t* de Student foi aplicado para comparação entre os grupos NGL e DBT tratados com solução veículo. Entre os animais DBT, ANOVA de uma via foi aplicada. Após a ANOVA, quando apropriado, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls foi usado para realizar comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism (versão 7, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DO PROTOCOLO DE DIABETIZAÇÃO SOBRE PARAMÊTROS FISIOLÓGICOS CARACTERÍSTICOS DO DIABETES *MELLITUS*

A ANOVA de uma via apresentou efeito estatístico para o fator condição [F (2,15) =22,69, $p<0,05$] quando analisado o ganho de peso dos animais normoglicêmicos (NGL), animais que passaram pelo procedimento de diabetização e não ficaram diabéticos (não-DBT) e animais diabéticos (DBT). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou uma diferença significativa ($p<0,05$) entre os animais DBT, que apresentaram um menor ganho de peso em comparação aos outros dois grupos, que não diferiram entre si.

Para a glicemia dos animais, o fator condição também se mostrou significativo, pelo teste de ANOVA [F (2, 15) =430,9, $p<0,05$]. Sendo que o grupo DBT novamente apresentando uma glicemia mais elevada que os dois (NGL, non-DBT), segundo análise com *post-hoc* de Newman-Keuls ($p<0,05$) (tabela 1).

Tabela 1: Efeito do procedimento de diabetização per se sobre os parâmetros de glicemia e peso dos animais. NGL = grupo normoglicêmico que não passou pelo processo de diabetização, não- DBT = grupo normoglicêmico que passou pelo processo de diabetização, DBT = grupo diabético.

Grupo	Glicemia (mg/dL)	Ganho de peso (g)
NGL	105,00 ± 4,457	89,00 ± 17,18
Não-DBT	110,20 ± 5,180	107,50 ± 11,64
DBT	472,20 ± 16,440*	11,17 ± 15,94*

Dados estão expresso em média ± EPM; n=6

4.2 EXPRESSÃO DE RECEPTORES MR E GR

4.2.1 Expressão de receptores MR e GR no córtex pré-frontal

Como pode ser observado na Figura 6, a ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença estatística entre os três grupos quando a expressão de GR e MR foi avaliada no citosol [GR: $F(2, 15) = 0,4792$, $p > 0,05$; MR: $F(2, 13) = 2,273$, $p > 0,05$] e núcleo [GR: $F(2, 15) = 0,5070$, $p > 0,05$; MR: $F(2, 13) = 0,01907$, $p > 0,05$] do CPF (figura 4).

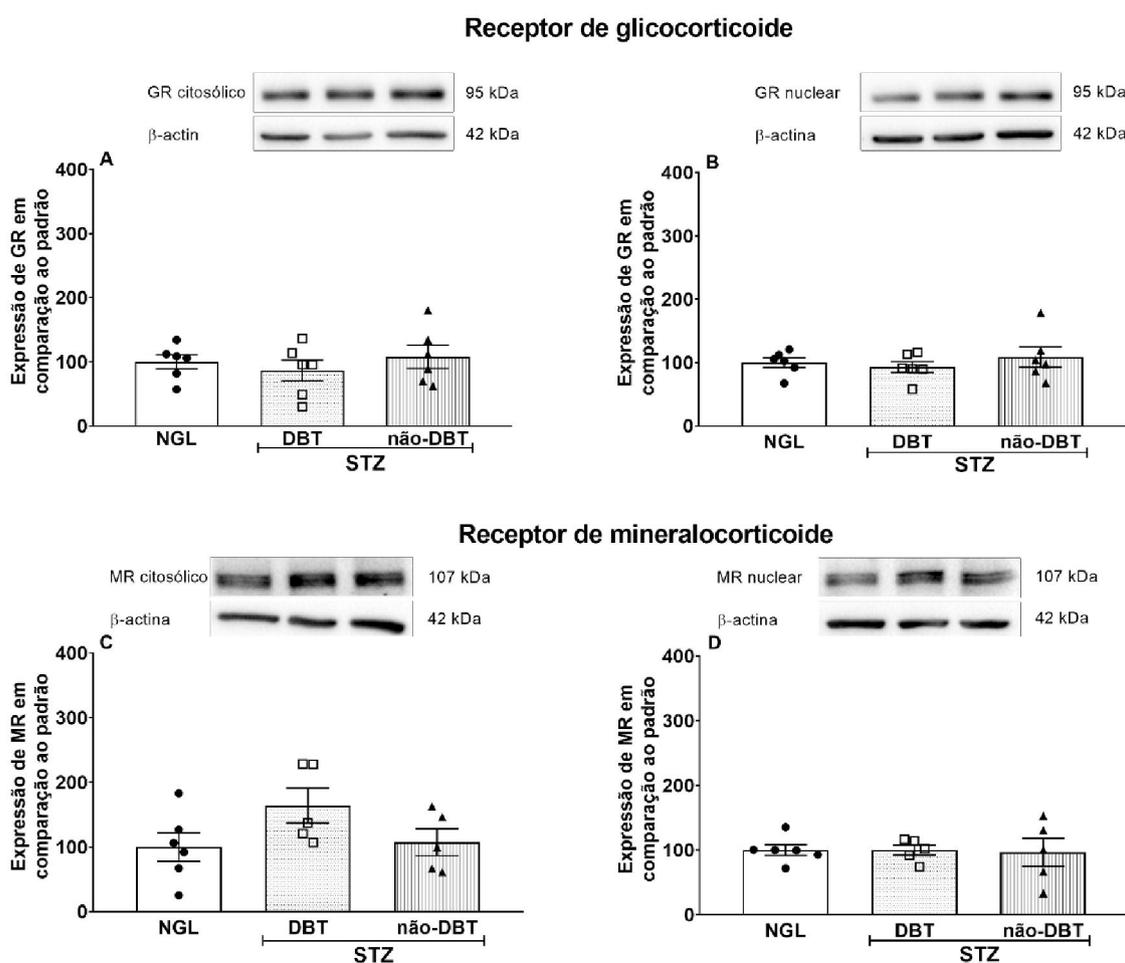


Figura 4: Expressão de GR e MR no córtex pré-frontal de animais submetidos ao protocolo de medo contextual condicionado. Expressão de GR citosólico (painel A) e nuclear (painel B); Expressão de MR citosolólico (painel C) e nuclear (painel D) no córtex pré-frontal. NGL = normoglicêmico, não-DBT = animais que receberam injeção de estreptozotocina, e não se tornaram diabéticos, DBT = animais diabéticos, STZ = protocolo de indução de diabetes. Os valores são expressos como média \pm EPM; $n = 6$ animais/ grupo.

4.2.2 Expressão de receptores MR e GR no hipocampo

ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença estatística entre os três grupos quando a expressão de GR e MR foi avaliada no citosol [GR: $F(2, 13) = 0,5518$, $p > 0,05$; MR: $F(2, 15) = 0,6543$, $p > 0,05$] e núcleo [GR: $F(2, 13) = 1,428$, $p > 0,05$; MR: $F(2, 15) = 2,311$, $p > 0,05$] do HIP (figura 5).

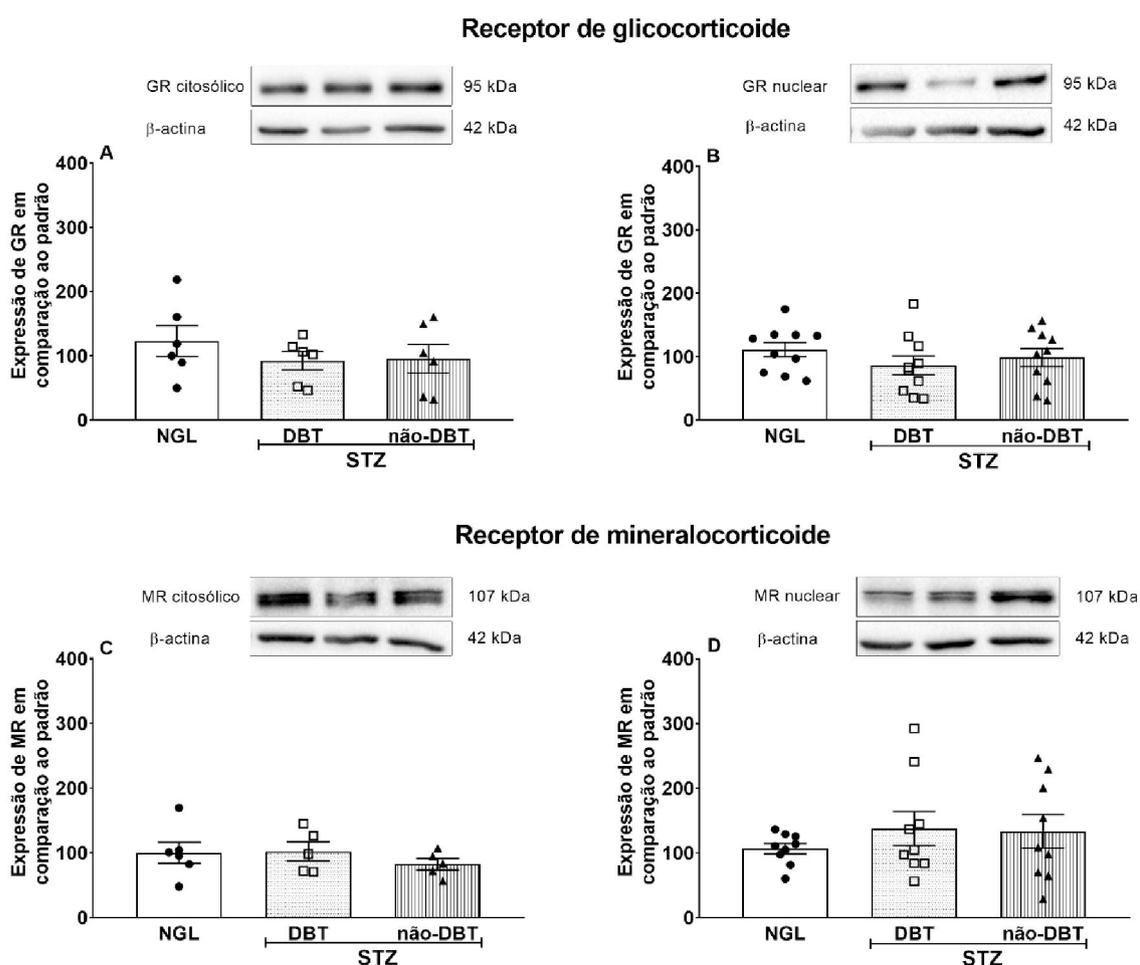


Figura 5: Expressão de GR e MR no hipocampo de animais submetidos ao protocolo de medo contextual condicionado. Expressão de GR citosólico (painel A) e nuclear (painel B); Expressão de MR citosólico (painel C) e nuclear (painel D) no hipocampo. NGL = normoglicêmico, não-DBT = animais que receberam injeção de estreptozotocina, mas não se tornaram diabéticos, DBT = animais diabéticos, STZ = protocolo de indução de diabetes. Os valores são expressos como média \pm EPM; $n = 6$ animais/grupo.

4.3 EFEITO DO PROTOCOLO DE DIABETIZAÇÃO SOBRE A EXTINÇÃO E GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS

A ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença entre os grupos quando a familiarização foi avaliada [$F(2, 15) = 0,9927, p > 0,05$]. Para a análise dos dados obtidos após o treinamento de extinção, a ANOVA de duas vias apresentou efeitos para o tempo e grupos [tempo: $F(4, 60) = 13,61, p < 0,05$; grupos: $F(2, 15) = 8,929, p < 0,05$] sem interação entre os fatores [$F(8, 60) = 1,455, p > 0,05$]. A análise post-hoc mostrou que, a partir do segundo bloco de tempo, ambos os grupos - NGL e non-DBT apresentaram menor tempo de congelamento que o grupo DBT ($p < 0,05$). A ANOVA unidirecional mostrou diferença entre os grupos quando os dados do teste de extinção [$F(2, 15) = 17,96, p < 0,05$] e teste de generalização [$F(2, 15) = 17,96, p < 0,05$] foram avaliados. O teste de Newman-Keuls mostrou que o NGL e o non-DBT mantiveram o menor tempo de congelamento quando comparado ao grupo DBT ($p < 0,05$) (figura 6).

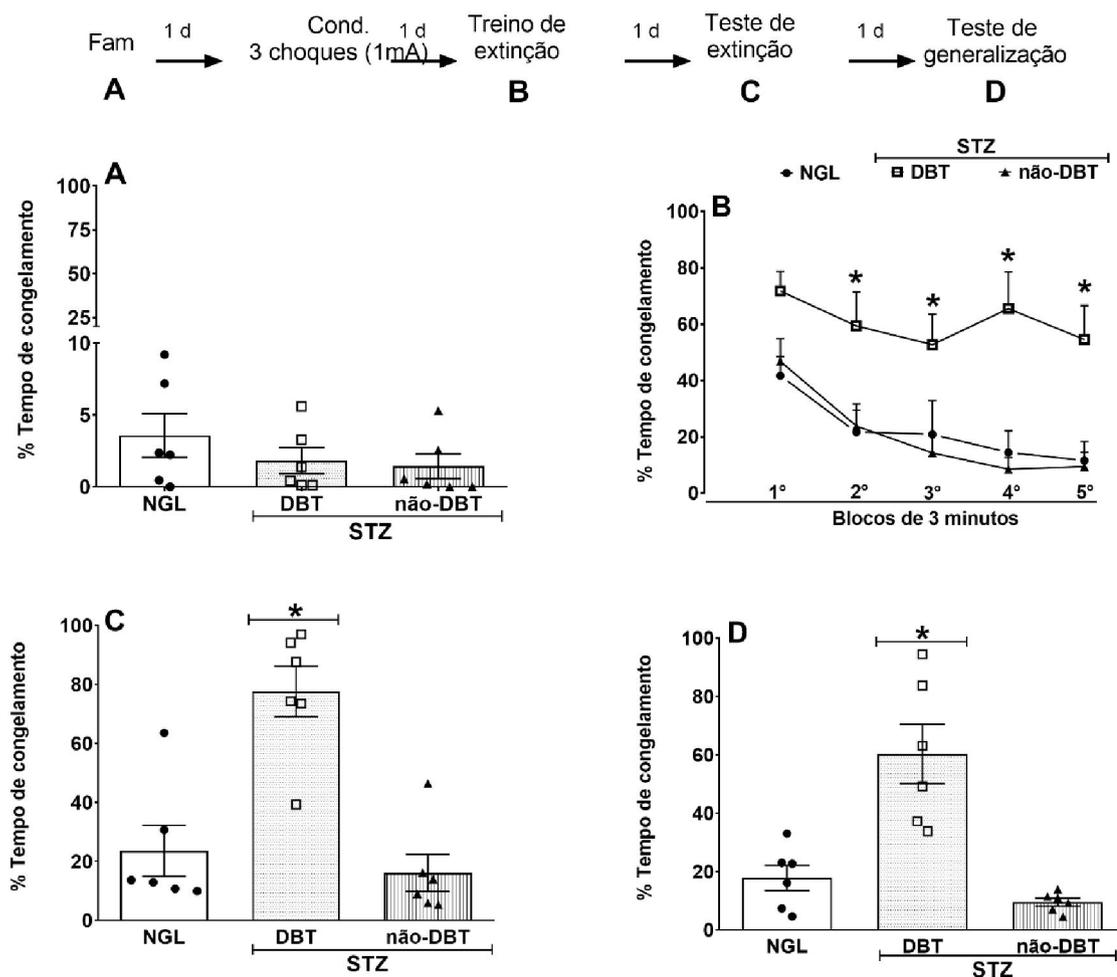


Figura 6: Efeitos do protocolo de indução do diabetes no tempo de congelamento na extinção e generalização da memória do medo. Grupos representados: NGL = animais normoglicêmicos, não-DBT = animais normoglicêmicos que foram submetidos ao protocolo de indução do diabetes, mas que não se tornaram diabéticos, DBT = animais diabéticos, STZ = protocolo de indução do diabetes. Os valores são expressos como média ± SEM. * $p < 0,05$ quando comparado a animais NGL; # $p < 0,05$ quando comparado aos animais DBT, $n = 6$ animais/grupo.

4.4 EFEITO DO AGONISTA MR SOBRE A EXTINÇÃO E GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS DE ANIMAIS DIABÉTICOS

Como pode ser visto na Figura 7 ao analisar os dados de treinamento de extinção (painel A), a ANOVA de duas vias mostrou diferença estatística para blocos de tempo [$F(4, 170) = 11,68, p < 0,05$] bem como tratamentos [$F(4, 170) = 16,22, p < 0,05$], mas não houve interação entre o tempo / tratamentos [$F(16, 170) = 0,4222,$

$p > 0,05$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou diferenças significativas entre os grupos DBT (DBT, FLU 5, FLU 25 e FLU 50), apresentando maior congelamento, e o grupo NGL nos blocos de tempo 2, 3 e 4 ($p < 0,05$).

Na análise da porcentagem de congelamento durante o teste de extinção, o teste t de Student indicou uma diferença estatisticamente significativa na qual o DBT apresentou maior congelamento que o grupo NGL ($t = 14,94$, $df = 12$, $p < 0,05$). A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento entre os grupos DBT [$F(3, 29) = 12,01$, $p < 0,05$], enquanto o teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que os animais DBT tratados com veículo apresentaram um maior congelamento diferindo dos animais DBT tratados com FLU 5 ($p < 0,05$), FLU 10 ($p < 0,05$), mas não FLU 50 ($p > 0,05$) (figura 7, painel B).

No teste de generalização, o teste t de Student demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos NGL e DBT, sendo que o último apresentou maior comportamento de congelamento ($t = 3,599$, $df = 13$, $p < 0,05$). Da mesma forma, o fator de tratamento foi significativo por ANOVA de uma via [$F(3, 30) = 4,810$, $p < 0,05$]. No entanto, o teste de extinção, a análise *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou um comportamento de congelamento significativamente menor entre todos os animais DBT tratados com FLU quando comparados aos animais DBT tratados com veículo (figura 7, painel C).

4.5 EFEITO DO ANTAGONISTA GR SOBRE A EXTINÇÃO E GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS DE ANIMAIS DIABÉTICOS

A Figura 8 mostra os dados observados após o tratamento com antagonistas de GR. Para o treinamento de extinção (painel A), a ANOVA de duas vias mostrou diferença estatística entre os diferentes blocos de tempo [$F(4, 104) = 18,04, p < 0,05$] entre os tratamentos [$F(3, 26) = 9,175, p < 0,05$], mas não houve interação entre o tempo/tratamentos [$F(12, 104) = 1,738, p > 0,05$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que os grupos DBT tratados com MIFE (10 e 25 mg/kg) apresentaram maior congelamento que o grupo NGL no terceiro tempo, enquanto o DBT apresentou maior congelamento que o NGL nos três últimos blocos de tempo. Os grupos MIFE foram significativamente diferentes do DBT do terceiro tempo ($p < 0,05$). Na análise da porcentagem de congelamento durante o teste de extinção (painel B), o teste t de Student indicou uma diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos DBT e NGL, com o grupo NGL apresentando menor congelamento ($t = 9,900, df = 12, p < 0,05$). A ANOVA de uma via não mostrou efeitos significativos dos tratamentos entre os grupos DBT [$F(2, 18) = 1,983, p < 0,05$]. O teste t de Student mostrou que o NGL apresentou um menor comportamento de congelamento quando comparado aos grupos DBT ($t = 7,317, df = 12, p < 0,05$) quando o teste de generalização foi avaliado (painel C). A ANOVA de uma via indicou o fator de tratamento para os grupos DBT como significativo [$F(2, 18) = 20,30, p < 0,05$], e o teste *post-hoc* de Newman-Keuls apontou para uma diminuição significativa no comportamento de congelamento para os grupos tratados (MIFE 10 e 25) em relação ao grupo veículo (DBT) ($p < 0,05$).

4.6 EFEITO DO ANTAGONISTA GR NA PRESENÇA DE ANTAGONISTA MR SOBRE A EXTINÇÃO E GENERALIZAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS DE ANIMAIS DIABÉTICOS

Como pode ser visto na Figura 9 ao analisar os dados de treinamento de extinção (painel A), a ANOVA de duas vias apresentou diferença estatística em diferentes blocos de tempo [$F(4, 152) = 20,28, p < 0,05$] bem como os tratamentos [$F(4, 38) = 4,678, p < 0,05$], mas não houve interação entre o tempo / tratamentos [$F(16, 152) = 0,9246, p > 0,05$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou um congelamento significativamente maior nos grupos DBT quando comparado ao grupo NGL nos blocos de tempo 3, 4 e 5 ($p < 0,05$).

Na análise da porcentagem de congelamento durante o teste de extinção, o teste t de Student indicou um comportamento estatisticamente significativo de congelamento maior para os grupos DBT na comparação entre os grupos DBT e NGL ($t = 8,764, df = 16, p < 0,05$). A ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo do tratamento entre os grupos DBT [$F(3, 30) = 0,7078, p > 0,05$] (Figura 9, painel B). No teste de generalização, o teste t de Student demonstrou um menor congelamento estatisticamente significativo quando comparado o grupo NGL ao grupo DBT ($t = 10,19, df = 16, p < 0,05$). Da mesma forma, o fator de tratamento foi significativo pela ANOVA de um fator [$F(3, 30) = 7,429, p < 0,05$]. Aqui, a análise *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou uma diferença significativa entre os grupos DBT, isto é, os DBT tratados com MIFE tiveram uma diminuição no comportamento de congelamento quando comparada aos animais tratados com veículo ($p < 0,05$) (figura 9, painel C).

4.7 EFEITO DOS ANTAGONISTAS MR E GR E AGONISTA MR SOBRE O COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO E LOCOMOÇÃO DE ANIMAIS DIABÉTICOS

Como mostrado na Figura 10 (painéis A e C), o teste t de Student mostrou diferença entre os animais NGL e DBT tratados com veículo (VEH) no tempo gasto nos braços abertos, sendo o tempo gasto nos braços abertos maior no NGL grupo [$t = 6,391$, $df = 14$, $p < 0,05$] e o mesmo padrão ocorre quando se avaliou o número de entradas nos braços abertos [$t = 2,370$, $df = 14$, $p < 0,05$], repetindo-se no observado (painéis B e D) no tempo gasto nos braços fechados [$t = 6,637$, $gl = 14$, $p < 0,05$] e o número de entradas nos braços fechados [$t = 4,451$, $gl = 14$, $p < 0,05$]. Entre os grupos DBT, ao anova de uma via ANOVA mostrou que o tratamento foi capaz de alterar o tempo gasto nos braços abertos $F(3, 29) = 6,030$, $p < 0,05$] e nos braços fechados [$F(3, 29) = 6,292$, $p < 0,05$], mas não foi capaz de alterar o número de entradas nos braços abertos [$F(3, 29) = 0,5042$, $p > 0,05$] e nos braços fechados [$F(3, 29) = 1,115$, $p > 0,05$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls mostrou que os tratamentos FLU e MIFE aumentaram o tempo de permanência em braços abertos ($p < 0,05$) e diminuíram o tempo gasto nos braços fechados ($p < 0,05$), sem alterar o braço aberto e fechado entradas ($p > 0,05$).

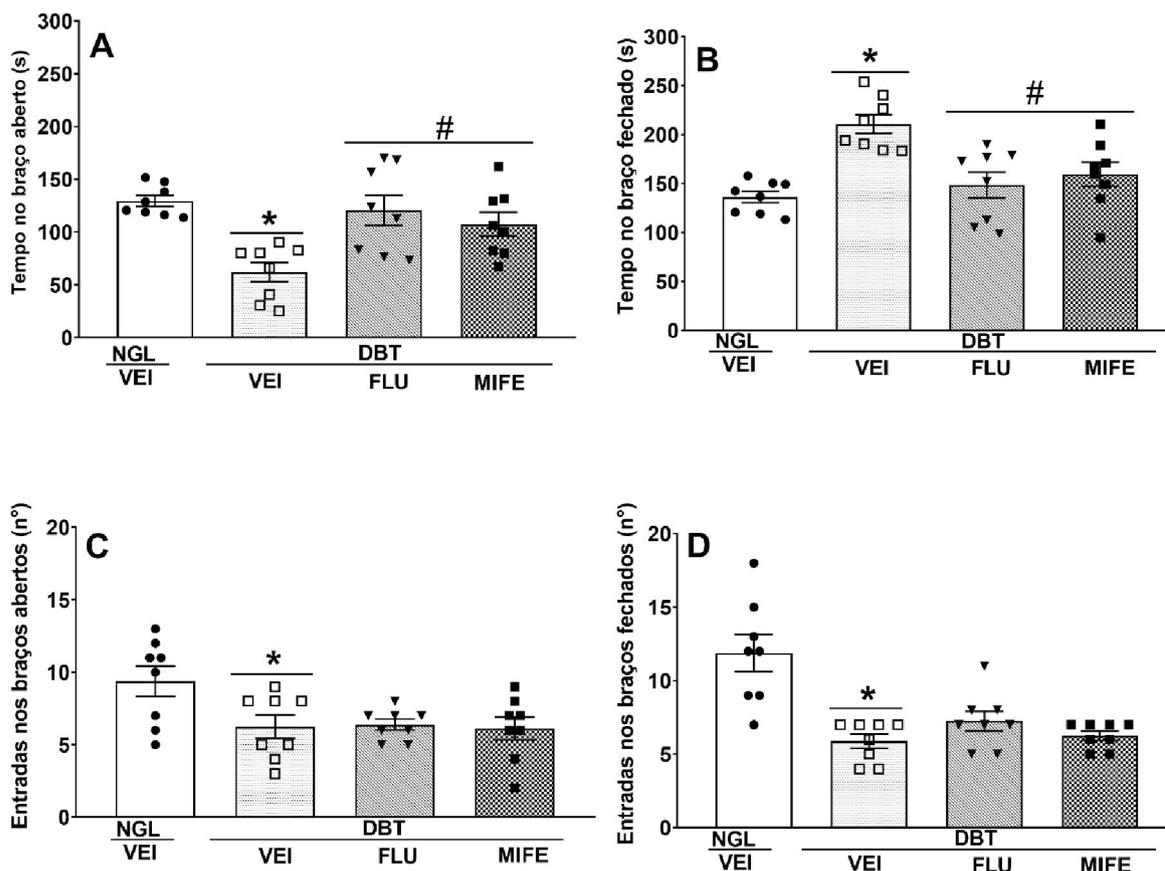


Figura 10: Efeitos dos antagonistas de MR e GR ou agonista de MR no comportamento semelhante à ansiedade. Os animais foram avaliados no teste LCE - tempo (s) gasto nos braços aberto (painel A) e fechado (painel B) e número de entradas nos braços aberto (painel C) e fechado (painel D). NGL = animais normoglicêmicos, DBT = animais diabéticos, VEI = veículo, FLU = fludrocortisona 5 mg/kg, MIFE = mifepristona 25 mg/kg. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado a animais NGL; # $p < 0,05$ quando comparado com animais DBT, $n = 7-9$ animais / grupo.

5 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo é que a ativação da MR em animais DBT desempenha um papel importante em facilitar a aquisição da extinção da memória do medo e em prejudicar a resposta generalizada da memória contextual do medo. É importante notar que o bloqueio de GR não exerce efeitos na presença de bloqueio de MR, indicando que a corticosterona endógena que ocupa a MR pode ser responsável pelos efeitos observados com o tratamento com antagonista de GR, por si só. Além disso, não se pode excluir o envolvimento de processos emocionais, uma vez que o efeito do tipo ansiolítico foi induzido pela ativação de MR ou bloqueio de GR.

Como os animais que receberam estreptozotocina, mas não se tornaram DBT, não apresentaram diferença quando comparados aos animais NGL (teste comportamental, análise molecular, glicemia e ganho de peso), podemos corroborar a hipótese de que todas as alterações observadas em nosso estudo se devem a hiperglicemia crônica induzida pela injeção de estreptozotocina, e não devido à injeção de estreptozotocina *per se*. Isso também é corroborado pelos achados de que a estreptozotocina não atravessa a barreira hematoencefálica e não tem ação central (Karunanayake et al., 1974). É importante ressaltar que as diferenças comportamentais entre animais DBT e não-DBT estão de acordo com dados prévios de nosso laboratório que mostram junto ao aumento do comportamento do tipo ansioso, uma extinção comprometida e uma maior generalização da memória de medo contextual (de Souza et al., 2019; Gambeta et al., 2016).

Estes resultados reforçam a narrativa de que o diabetes pode ser um fator causal para transtorno de ansiedade e transtornos relacionados ao estresse. Miller-Archie e colaboradores (2014) descobriram que os sobreviventes do ataque terrorista de 11 de setembro que foram diagnosticados com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) tiveram uma chance maior de relatar o diabetes. Além disso, Smith e colaboradores (2013) descobriram em seu estudo de metanálise que indivíduos com diabetes tinham maior probabilidade de desenvolver transtornos de ansiedade e ter maiores pontuações nos índices de mensuração da ansiedade. Nossos dados reforçam esses achados, indicando que o diabetes experimentalmente induzido em

ratos é capaz de ampliar os comportamentos relacionados a transtornos de ansiedade e TEPT (Dymond et al. 2015; Asok, Kandel e Rayman, 2019).

Quando olhamos para os receptores-alvo (MR e GR), surge um dado dependente do tempo. Assim, foi demonstrado que existem diferentes expressões de RNAm de MR no hipocampo de animais DBT. Revsin e colaboradores (2008) observaram uma menor expressão de RNAm de MR no 6º dia após a indução do diabetes, enquanto Chan e colaboradores (2001) encontraram uma maior expressão de RNAm de MR no 8º dia após esta indução. Esses dados ressaltam a importância do tempo após a indução do diabetes. Da mesma forma, tem sido demonstrado que a expressão de GR também parece ser dependente do tempo no curso do diabetes, ou seja, a expressão de GR é mais elevada na 3ª semana com uma redução de sua expressão na 4ª semana (Shin, Seong e Yi, 2014). Nesse aspecto, também não observamos na quarta semana após a indução do diabetes qualquer diferença na expressão citosólica ou nuclear de GR e MR entre os grupos DBT, não-DBT e NGL no hipocampo e no córtex pré-frontal. No entanto, é importante mencionar que um desequilíbrio de ações mediadas por MR e GR pode estar relacionado à função ou responsividade desses receptores preferencialmente, e pode ocorrer independentemente de mudanças na expressão deles.

É interessante ainda notar que apesar do efeito benéfico induzido pela ativação da MR, com o agonista fludrocortisona (FLU), no processo relacionado à aquisição da extinção da memória do medo e generalização da memória do medo, diminuindo o comportamento de congelamento; a dose mais alta de FLU não foi capaz de alterar esse comportamento de congelamento aumentado em animais DBT durante o teste de extinção, o que nos indica que o efeito pode ser dependente da dose. Além disso, a FLU tem alta afinidade pelos receptores MR, mas em altas concentrações também atua em GRs, sendo um potente agonista para ambos os receptores (de Kloet et al. 2016). Assim, hipotetizamos que altas doses poderiam saturar a MR e levar à ligação em GR.

Sabe-se que a ativação da MR é capaz de mediar a seleção de respostas comportamentais a eventos estressantes, induzindo efeitos semelhantes aos ansiolíticos e melhorando processos de aprendizagem e cognição, como a memória espacial. A expressão e a atividade de MR também apresentam uma correlação

positiva com a resiliência contra o estresse e eventos negativos (de Kloet et al., 2018, 2016). Nesse sentido, em camundongos com o gene MR inativado no prosencéfalo, os animais expressaram um comportamento de ansiedade e resposta ao medo mais pronunciado (Brinks et al., 2009), bem como um prejuízo na aprendizagem e na memória (Berger et al., 2006). Além disso, pacientes com transtorno depressivo maior mostraram uma expressão diminuída de MR indicando que a atividade desses receptores parece ser um fator relevante para uma resposta adaptativa do organismo quando confrontados com situações que envolvem estresse e memórias estressantes (ver Kanatsou et al., 2019). Curiosamente, os níveis de MR foram aumentados após o tratamento com um antidepressivo (Lopez et al., 1998) e em ensaios clínicos randomizados duplo-cegos controlados com placebo, a eficácia do tratamento antidepressivo foi aumentada quando em combinação com o agonista MR (Otte et al., 2010). Além disso, Stranahan e colaboradores (2010) relataram um efeito benéfico da ativação MR no HIP de ratos DBT por STZ. Eles observaram em fatias do hipocampo desses ratos DBT uma potenciação de longo prazo (LTP) reduzida nas sinapses do caminho perfurante medial no giro dentado o que induziu a um viés em favor da depressão de longo prazo (LTD). O agonista de MR aldosterona foi capaz de restaurar LTP em fatias desses animais DBT, indicando um papel restaurador do MR para o giro dentado, o que pode refletir em uma melhoria dos comportamentos mediados por esta área do cérebro.

Nossos dados mostraram que a injeção do antagonista de GR mifepristona (MIFE) foi capaz de diminuir significativamente o comportamento de congelamento de animais DBT no teste de generalização, mas não no teste de extinção. Nosso grupo já havia mostrado em animais NGL a ineficácia do MIFE em melhorar o processo de extinção da memória aversiva ou a expressão do medo condicionado (de Oliveira, et al., 2014; Ninomiya et al., 2010). Outros grupos mostraram que quando aplicados antes do choque, a administração na amígdala basolateral e hipocampo ventral levou a uma diminuição na retenção de memória aversiva, mas não no teste de extinção (Donley et al., 2005). Parece que o bloqueio GR pode ser valioso para modular alguns processos específicos de memória aversiva. Nesse sentido, Taubenfeld e colaboradores (2009) observaram que a MIFE administrada sistemicamente atua na reconsolidação da memória diminuindo o comportamento de

congelamento do animal em relação ao controle, e não é revertido por uma sessão de recuperação.

Relacionado ao diabetes, Revsin e colaboradores (2009) observaram que durante o início do DM tipo 1 em camundongos, o bloqueio de GR atenuou vários sinais morfológicos de anomalias no HIP, como o aumento da neurodegeneração, diminuição da proliferação celular e aumento da ativação neuronal. Além disso, este bloqueio recuperou os camundongos DBT dos déficits cognitivos não relacionados à memória do medo, ou seja, quando os animais foram avaliados na nova tarefa de reconhecimento de colocação de objetos. Mais uma vez, Zuo e colaboradores (2011) mostraram que o comprometimento cognitivo do DM - não relacionado à memória de medo - foi melhorado pelo bloqueio de GR, juntamente com uma reversão da regulação negativa da proteína glial fibrilar ácida, um indicador-chave da reatividade astrocítica, e do "*N-myc downstream-regulated gene 2*", envolvido na diferenciação e desenvolvimento celular. Assim, apesar de nossos achados indicarem que o bloqueio GR parece ter um papel em prejudicar a generalização da memória aversiva, importante ressaltar que após o bloqueio de ambos os receptores - MR e GR – o bloqueio de GR não foi capaz de induzir a uma mudança significativa na resposta de congelamento dos animais DBT, o que ressalta a importância de MR também em prejudicar essa resposta de generalização do medo condicionado. Importante mencionar que os MRs localizados nas proximidades da membrana plasmática parecem ser ativados quando os níveis plasmáticos de corticosterona aumentam, diferentemente do que acontece quando os níveis de corticosterona são baixos, nos quais os MRs localizados intracelularmente são preferencialmente ativados (Karst et al., 2005). Essa ativação do MR de membrana parece desempenhar uma importante função na avaliação de novas condições, atuando como um "detector" de situações estressantes, melhorando as estratégias comportamentais (ver Kanatsou et al., 2019).

A fim de avaliar se o efeito dos tratamentos na diminuição do comportamento de congelamento foi independente dos aspectos emocionais, como a resposta à ansiedade, nossos dados mostram um efeito ansiolítico da ativação de MR e bloqueio de GR em animais avaliados 4 semanas após a indução do diabetes. López-Rubalcava e colaboradores (2013) mostraram que o bloqueio de GR ou o bloqueio

de MR, e não a ativação de MR, induziram a um efeito ansiolítico em camundongos diabéticos. É importante ressaltar que os autores realizaram o teste de ansiedade em um curto período após a indução do diabetes, ou seja, 2 semanas após a indução do diabetes. Nesse aspecto, vários estudos mostraram que somente a partir da quarta semana de indução do diabetes podemos observar mudanças mais pronunciadas nas áreas cerebrais envolvidas na mediação de respostas relacionadas à memória aversiva e ansiedade, como o hipocampo e o córtex pré-frontal (da Silva Dias et al., 2016; Sadeghi et al. 2016; Moheet, et al., 2015; de Moraes et al., 2014; Muriach et al., 2014; Wrighten et al., Zhou et al., 2010; Bruehl et al., 2007). Em relação ao GR, estudos mostraram que a administração do antagonista de GR em animais NGL não induziu efeitos quando esses animais foram submetidos a outros aparelhos para avaliação da ansiedade, como a caixa claro/escuro, teste comportamentais de enterramento e labirinto em cruz elevado (Smythe et al., 1997; Bitran et al., 1998). Em conjunto, essas evidências indicam que o GR está mais envolvido na exibição de respostas semelhantes à ansiedade em animais DBT quando comparados aos NGL. Dado que o agonista MR também foi capaz de induzir um efeito ansiolítico, é importante mencionar que o efeito ansiolítico observado após a injeção do antagonista de GR poderia também ser mediado por uma ação da corticosterona endógena na MR, juntamente com o bloqueio GR. Esse redirecionamento das ações endógenas de corticosterona entre MR e GR já foi ressaltado também por nosso grupo (Reis et al., 2016) reforçando a importância do equilíbrio entre os efeitos mediados por MR:GR.

Embora haja necessidade de mais estudos para aprofundar o envolvimento desses receptores em diferentes processos relacionados à aversão e a importância da cronicidade do diabetes nesses processos, nossos resultados indicam que a ativação da MR em animais DBT parece ser primordial no restabelecimento da melhor escolha de repertório comportamental relacionado ao processamento de respostas aversivas, enquanto o bloqueio de GR junto com o de MR parece desempenhar um papel nas respostas relacionadas à ansiedade.

6 CONCLUSÃO

Animais DBT apresentam uma expressão de memória de medo e comportamento do tipo ansiedade mais pronunciados quando comparados com animais não DBT. Curiosamente, não existem diferenças na expressão dos receptores MR e GR citosólicos e nucleares no HIP e CPF desses animais.

A ativação de MR parece ser fundamental para a melhora nos processos de da aquisição da extinção da memória medo ao contexto, assim como para prejudicar a generalização dessa mesma memória aversiva.

Não podemos descartar que aspectos emocionais associados a ansiedade participem desses efeitos uma vez que tanto a ativação de MR como o bloqueio de GR induziram a efeitos do tipo ansiolíticos nos animais DBT.

REFERÊNCIAS

- American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 2010 Jan; 33: S62-269. doi: 10.2337/dc10-S062.
- American Psychiatric Association (APA). Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-5. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- Asok A, Kandel ER, Rayman JB. The Neurobiology of Fear Generalization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2019 Jan;12: 1–15. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00329.
- Berger S, Wolfer DP, Selbach O, Alter H, Erdmann G, Reichardt HM, Chepkova AN, Welzl H, Haas HL, Lipp HP, Schütz G. Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Jan;103(1): 195-200. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503878102>.
- Bitran D, Shiekh M, Dowd JA, Dugan MM, Renda P. Corticosterone is permissive to the anxiolytic effect that results from the blockade of hippocampal mineralocorticoid receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1998 Feb;60(4): 879–887. doi: 10.1016/S0091-3057(98)00071-9.
- Boden MT. Prevalence of mental disorders and related functioning and treatment engagement among people with diabetes. *Journal of Psychosomatic Research*. 2018 Jan;106: 62–69. doi: 10.1016/j.jpsychores.2018.01.001
- Brinks V, Berger S, Gass P, de Kloet ER, Oitzl MS. Mineralocorticoid receptors in control of emotional arousal and fear memory. *Hormones and Behavior*. 2009 Mai;56(2): 232–238. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.05.003.
- Bruehl H, Rueger M, Dziobek I, Sweat V, Tirsi A, Javier E, Arentoft A, Wolf OT, Convit A. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dysregulation and Memory Impairments in Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Abr;92(7): 2439–2445, 2007. doi: 10.1210/jc.2006-2540.
- Bystritsky A, Danial J, Kronemyer D. Interactions between diabetes and anxiety and depression: Implications for treatment. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2014 Mar;43(1):269-83. doi: 10.1016/j.ecl.2013.10.001.

Calhoun GG, Tye KM. Resolving the neural circuits of anxiety. *Nature Neuroscience*. 2015 Set;18(10): 1394–1404. doi: 10.1038/nn.4101.

Chan O, Chan S, Inouye K, Vranic M, Matthews SG. Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment. *Endocrinology*. 2001 Nov;142(11): 4872–4879. doi: 10.1210/endo.142.11.8474.

Chan O, Inouye K, Vranic M, Matthews SG. Hyperactivation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in streptozotocin-diabetes is associated with reduced stress responsiveness and decreased pituitary and adrenal sensitivity. *Endocrinology*. 2002 Mai;143(5):1761–1768. doi: 10.1210/en.143.5.1761.

Chien I, Lin C-H. Increased risk of diabetes in patients with anxiety disorders: A population-based study. *Journal of Psychosomatic Research*. 2016 Mai;86: 47–52. doi: 10.1016/j.jpsychores.2016.05.003.

Davies MJ, Gagliardino JJ, Gray LJ, Khunti K, Mohan V, Hughes R. Real-world factors affecting adherence to insulin therapy in patients with Type 1 or Type 2 diabetes mellitus: A systematic review. *Diabetic Medicine*. 2013 Jan;30(5): 512–524. doi: 10.1111/dme.12128.

Diz-Chaves Y, Gil-Lozano M, Toba L, Fandiño J, Ogando H, González-Matías LC, Mallo F. Stressing diabetes? The hidden links between insulinotropic peptides and the HPA axis. *The Journal of endocrinology*. 2016 Ago;230(2): R77-R94. doi: 10.1530/JOE-16-0118.

Donley MP, Schulkin J, Rosen JB. Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behavioural Brain Research*. 2005 Ago;164(2): 197–205. doi: 10.1016/j.bbr.2005.06.020.

Dunlop BW, Wong A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in PTSD: Pathophysiology and treatment interventions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018 Ago;89: 361–379, 2018. doi: 10.1016/J.PNPBP.2018.10.010.

Dymond S, Dunsmoor JE, Vervliet B, Roche B, Hermans D. Fear Generalization in Humans: Systematic Review and Implications for Anxiety Disorder Research. *Behavior Therapy*. 2015 Set;46(5): 561–582. doi: 10.1016/j.beth.2014.10.001.

Erickson RL, Browne CA, Lucki I. Hair corticosterone measurement in mouse models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Physiology & Behavior*. 2017 Set;178: 166–171. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.01.018.

Faravelli C, Io Sauro C, Godini L, Lelli L, Benni L, Pietrini F, Lazzeretti L, Talamba GA, Fioravanti G, Ricca V. Childhood stressful events, HPA axis and anxiety disorders. *World Journal of Psychiatry*. 2012 Feb;2(1): 13-25. doi: 10.5498/wjp.v2.i1.13.

Gale EAM. The Rise of Childhood Type 1 Diabetes in the 20th Century. *Diabetes*. 2002 Dec;51(12):c3353-3361. doi: 10.2337/diabetes.51.12.3353.

Gambeta, E.; De Souza, C. P.; De Moraes, H.; Zanoveli, J. M. Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin. *Metabolic Brain Disease*, 2016 Jun;31(3): 563-571. doi: 10.1007/s11011-015-9770-1.

Gray JD, Kogan JF, Marrocco J, Mcewen BS. Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Nov;13(11):661-673. doi: 10.1038/nrendo.2017.97.

Heim C, Nemeroff CB. Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *CNS spectrums*. 2009 Jan;14(1 Suppl 1): 13-24. doi: 10.1016/S0959-4388(00)00080-5.

Huffhines L, Noser A, Patton SR. The Link Between Adverse Childhood Experiences and Diabetes. *Current Diabetes Reports*. 2016 Abr;16(6): 1–9. doi: 10.1007/s11892-016-0740-8.

International Diabetes Federation (IDF). *IDF DIABETES ATLAS 8th Edition South And Central America*. , 2017a.

International Diabetes Federation (IDF). *IDF DIABETES ATLAS 8th Edition*. 2017b.

Joëls M, de Kloet ER. The brain mineralocorticoid receptor: A saga in three episodes. *Journal of Endocrinology*. 2017 Jul;234(1): T49-T66. doi: 10.1530/JOE-16-0660.

Kanatsou S, Joels M, Krugers H. Brain Mineralocorticoid Receptors and Resilience to Stress. *Vitamins and Hormones*. 2019 Dez;109: 341–359. doi: 10.1016/bs.vh.2018.11.001.

Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G. The synthesis of [¹⁴C]streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochemical Journal*. 1974 Set;142(3): 673–683. doi: 10.1042/bj1420673.

Kerner W, Brückel J. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2014 Jul;122(7): 384-386. doi: 10.1055/s-0034-1366278.

Kharroubi, A. T.; Darwish, H. M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal Of Diabetes*. 2015 Jun 25; 6(6): 850–867. doi: 10.4239/wjd.v6.i6.850.

De Kloet ER, Meijer OC, de Nicola AF, de Rijk, RH.; Joëls, M. Importance of the brain corticosteroid receptor balance in metaplasticity, cognitive performance and neuro-inflammation. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2018 Fev;49: 124–145. doi: 10.1016/j.yfrne.2018.02.003.

de Kloet ER, Otte C, Kumsta R, Kok L, Hillegers MHJ, Hasselmann H, Kliegel. Stress and Depression: a Crucial Role of the Mineralocorticoid Receptor. *Journal of Neuroendocrinology*. 2016 Ago;28(8): 1-12. doi: 10.1111/jne.12379.

Krass I, Schieback P, Dhipayom T. Adherence to diabetes medication: A systematic review. *Diabetic Medicine*. 2015 Jun;32(6): 725-37. doi: 10.1111/dme.12651

Kuznetsova NV, Pal'chikova NA, Kuzminova OI, Selyatitskaya, VG. Production of corticosteroid hormones in vitro by adrenals in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014 Mai;157(1): 28-31. doi: 10.1007/s10517-014-2484-2.

American Veterinary Medical Association (AVMA). AVMA Guidelines for euthanasia of animals: 2013 Edition. 2013.

López-Rubalcava C, Paez-Martinez N, Oikawa J. Blockade of corticosteroid receptors induces anxiolytic-like effects in streptozotocin-induced diabetic mice, and synergizes with diazepam. *Behavioural Pharmacology*, 2013 Ago;24(4): 320-327. doi: 10.1097/FBP.0b013e3283637de2.

López JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ. Regulation of serotonin(1A), glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: Implications for the neurobiology of depression. *Biological Psychiatry*. 1998 Abr;43(8): 547–573. doi: 10.1016/S0006-3223(97)00484-8

Lukaschek, K.; Baumert, J.; Kruse, J. Emeny RT, Lacruz M, Huth C, Thorand B, Holle R, Rathmann W, Meisinger C, Ladwig, KH. Relationship between posttraumatic stress disorder and Type 2 Diabetes in a population-based cross-sectional study with 2970 participants. *Journal of Psychosomatic Research*. 2013 Abr;74(4):340-5. doi: 10.1016/j.jpsychores.

Martin E, Ressler K, Binder E, Nemeroff C. The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Psychiatr Clin North Am*. 2013 Set;32(3): 549–575. doi: 10.1016/j.psc.2009.05.004.

Miller-Archie SA, Jordan, HT, Ruff RR, Chamany S, Cone JE, Brackbill RM, Kong J, Ortega F, Stellman SD. Posttraumatic stress disorder and new-onset diabetes among adult survivors of the World Trade Center disaster. *Preventive Medicine*. 2014 Set;66: 34-8. doi: 10.1016/j.ypped.2014.05.016

Moheet A, Mangia S, Seaquist ER. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Set;1353:60-71. doi: 10.1111/nyas.12807.

de Moraes H, de Souza, CP, da Silva, LM, Ferreira DM, Werner MF, Andreatini R, da Cunha JM, Zanoveli, JM. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behavioural Brain Research*. 2014 Jan; 258:52-64. doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.011.

de Moraes, H; de Souza, CP, da Silva, L.M, Ferreira DM, Baggio CH, Vanvossen AC, de Carvalho MC, da Silva-Santos JE, Bertoglio LJ, Cunha JM, Zanoveli, JM. Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: Role of CB1 receptors. *European Neuropsychopharmacology*. 2016 Out;26(10): 1590-1600. doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.08.007

Negrato CA, Lauris JRP, Saggiaro IB, Corradini MCM, Borges PR, Crês MC, Junior AL, Guedes MFS, Gomes MB. Increasing incidence of type 1 diabetes between 1986

and 2015 in Bauru, Brazil. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2017 Mar;127: 198–204. doi: 10.1016/j.diabres.2017.03.01

Ninomiya EM, Martynhak BJ, Zanoveli JM, Correia D, da Cunha C, Andreatini R. Spironolactone and low-dose dexamethasone enhance extinction of contextual fear conditioning. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2010 Jul;34(7): 1229–1235. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.06.025.

de Oliveira AR, Reimer AE, Brandão ML. Mineralocorticoid receptors in the ventral tegmental area regulate dopamine efflux in the basolateral amygdala during the expression of conditioned fear. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Mai;43: 114–125. doi: 10.1016/j.psyneuen.2014.02.010.

Otte C, Hinkelmann K, Moritz S, Yassouridis A, Jahn H, Wiedemann K, Kellner M. Modulation of the mineralocorticoid receptor as add-on treatment in depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled proof-of-concept study. *J Psychiatr*. 2010 Abril; 44(6): 339–46. doi: 10.1016/j.jpsychires.2009.10.006.

Pace TWW, Spencer RL. Disruption of mineralocorticoid receptor function increases corticosterone responding to a mild, but not moderate, psychological stressor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Jun;288(6): E1082–1088. doi: 10.1152/ajpendo.00521.2004.

Patel R, Spreng RN, Shin LM, Girard TA. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and beyond: A meta-analysis of functional neuroimaging studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2012 Out;36(9):2130–2142. doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.06.003.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1985 Ago;14(3):149–167. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7.

Rajput R, Gehlawat P, Gehlan D, Gupta R, Rajput M. Prevalence and predictors of depression and anxiety in patients of diabetes mellitus in a tertiary care center. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2016 Nov-Dec;20(6):746–751. doi: 10.4103/2230-8210.192924.

Revsin Y, Rekers NV, Louwe MC, Saravia FE, de Nicola AF, de Kloet ER, Oitzl MS. Glucocorticoid Receptor Blockade Normalizes Hippocampal Alterations and Cognitive Impairment in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mice. *Neuropsychopharmacology*. 2009 Feb;34(3):747-58. doi: 10.1038/npp.2008.136.

Revsin Y, Van Wijk D, Saravia FE, Oitzl MS, de Nicola AF, de Kloet ER. Adrenal hypersensitivity precedes chronic hypercorticism in streptozotocin-induced diabetes mice. *Endocrinology*. 2008 Jul;149(7): 3531-3539. doi: 10.1210/en.2007-1340.

Roberts AL, Agnew-Blais JC, Spiegelman D, Kubzansky LD, Mason SM, Galea S, Hu FB, Rich-Edwards JW, Koenen KC. Posttraumatic Stress Disorder and Incidence of Type 2 Diabetes Mellitus in a Sample of Women: A 22-Year Longitudinal Study. *JAMA Psychiatry*. 2015 Mar;72(3): 203-210. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.2632.

Ross DA, Arbuckle MR, Travis MJ, Dwyer JB, van Schalkwyk GI, Ressler KJ. An Integrated Neuroscience Perspective on Formulation and Treatment Planning for Posttraumatic Stress Disorder. *JAMA Psychiatry* 2017 Apr 1;74(4): 407-415. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2016.3325.

Sadeghi A, Hami J, Razavi S, Esfandiary E, Hejazi Z. The effect of diabetes mellitus on apoptosis in hippocampus: Cellular and molecular aspects. *International Journal of Preventive Medicine*. 2016 Mar 10;7:57. doi: 10.4103/2008-7802.178531.

Salinovich O, Montelaro RC. Reversible Staining and Peptide Mapping of Proteins Transferred Nitrocellulose after Separation by Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 1986 Ago 1;156(2): 341-347. doi: 10.1016/0003-2697(86)90263-0.

dos Santos MAB, Ceretta LB, Réus GZ, Abelaira HM, Jornada LK, Schwalm MT, Neotti MV, Tomazzi CD, Gulbis KG, Ceretta RA, Quevedo J. Anxiety disorders are associated with quality of life impairment in patients with insulin-dependent type 2 diabetes: A case-control study. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2014 Out;36(4): 298–304. doi: 10.1590/1516-4446-2013-1230.

Seuring T, Archangelidi O, Suhrcke M. The Economic Costs of Type 2 Diabetes: A Global Systematic Review. *Pharmacoeconomics*. 2015 Aug;33(8): 811-831. doi: 10.1007/s40273-015-0268-9.

Shin JH, Seong J K, Yi SS. Sequential alterations of glucocorticoid receptors in the hippocampus of STZ-treated type 1 diabetic rats. *Journal of Veterinary Science*. 2014;15(1):19-26. doi: 10.4142/jvs.2014.15.1.19.

da Silva Dias IC, Carabelli B, Ishii DK, de Moraes H, de Carvalho MC, de Souza LER, Zanata SM, Brandão ML, Cunha TM, Ferraz AC, Cunha JM, Zanoveli JM. Indoleamine-2, 3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes. *Molecular Neurobiology*. 2016 Dez;53(10): 6997-7009. doi: 10.1007/s12035-015-9617-0.

Smith-Spangler CM, Bhattacharya J, Goldhaber-Fiebert JD. Diabetes, its treatment, and catastrophic medical spending in 35 developing countries. *Diabetes Care*. 2012 Feb;35(2): 319-326. doi: 10.2337/dc11-1770.

Smith KJ, Béland M, Clyde M, Gariépy G, Pagé V, Badawi G, Rabasa-Lhoret R, Schmitz N. Association of diabetes with anxiety: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychosomatic Research*. 2013 Feb;74(2): 89-99. doi: 10.1016/j.jpsychores.2012.11.013.

Smith KJ, Deschênes SS, Schmitz N. Investigating the longitudinal association between diabetes and anxiety: a systematic review and meta-analysis. *Diabetic Medicine*. 2018 Jun;35(6): 677-693. doi: 10.1111/dme.13606.

Smythe JW, Murphy D, Timothy C, Costall B. Hippocampal mineralocorticoid, but not glucocorticoid, receptors modulate anxiety-like behavior in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1997 Mar;56(3):507-513.

Snouffer EB. An inexplicable upsurge: The rise in type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 Mar;137:242-244. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.022.

de Souza CP, Gambeta E, Stern CAJ, Zanoveli JM. Posttraumatic stress disorder-type behaviors in streptozotocin-induced diabetic rats can be prevented by prolonged treatment with vitamin E. *Behavioural Brain Research* 2019 Feb;359: 749-754. doi: 10.1016/j.bbr.2018.09.008.

Spencer RL, Deak T. *Physiology & Behavior A users guide to HPA axis research*. *Physiology & Behavior*. 2017 Set;178: 43-65. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.11.014.

Stranahan AM, Arumugam TV, Lee K, Mattson MP. Mineralocorticoid receptor activation restores medial perforant path LTP in diabetic rats. *Synapse*. 2010 Jul;64(7): 528-532. doi: 10.1002/syn.20758.

Strawn JR, Wehry AM, Delbello MP, Rynn MA, Strakowski S. Establishing the neurobiologic basis of treatment in children and adolescents with generalized anxiety disorder. *Depression and Anxiety*. 2012 Abr;29(4): 328-39. doi: 10.1002/da.21913.

Taubenfeld SM, Riceberg JS, New AS, Alberini CM. Preclinical Assessment for Selectively Disrupting a Traumatic Memory via Postretrieval Inhibition of Glucocorticoid Receptors. *Biological Psychiatry*. 2009 Feb;65(3):249-57. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.07.005

Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Dolgas CM, Elfers EE, Seeley RJ, Alessio DAD, Herman JP. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *AJP: Endocrinology and Metabolism*. 2005 Nov;289(5): E823-828. doi: 10.1152/ajpendo.00122.2005.

Vanelzakker MB, Dahlgren MK, Davis FC, Dubois S, Shin LM. Pavlov to PTSD: The extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2014 Sep;113: 3-18. doi: 10.1016/j.nlm.2013.11.014.

Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2): 322-328. doi: 10.1038/nprot.2007.44.

World Health Organization (WHO). *Global Report on Diabetes*. 2016.

World Health Organization (WHO). *Depression and Other Common Mental Disorders*. 2017.

World Health Organization (WHO), International Diabetes Federation (IDF). *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF consultation, 2006*.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). *Worldwide trends in diabetes since 1980: A pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants*. *The Lancet*. 2016 Abr 9;387(10027):1513-30. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00618-8.

Zhou H, Lu W, Shi Y, Bai F, Chang J, Yuan Y, Teng G, Zhang Z. Impairments in cognition and resting-state connectivity of the hippocampus in elderly subjects with type 2 diabetes. *Neuroscience Letters*. 2010 Mar 31;473(1):5-10. doi: 10.1016/j.neulet.2009.12.057.

Zuo ZF, Wang W, Niu L, Kou ZZ, Zhu C, Wang W, Zhao XH, Luo DS, Zhang T, Zhang FX, Liu XZ, Wu SX, Li YQ. RU486 (mifepristone) ameliorates cognitive dysfunction and reverses the down-regulation of astrocytic N-myc downstream-regulated gene 2 in streptozotocin-induced type-1 diabetic rats. *Neuroscience*. 2011 Set 8;190:156-65. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.025.