

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALVARO HENRIQUE BERNARDO DE LIMA SILVA

EFEITO A CURTO E LONGO PRAZO DA PREGABALINA SOBRE A
AQUISIÇÃO DA EXTINÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL E
SOBRE RESPOSTAS DE ANSIEDADE EM ANIMAIS DIABÉTICOS NÃO
CONTROLADOS

CURITIBA

2021

ALVARO HENRIQUE BERNARDO DE LIMA SILVA

EFEITO A CURTO E LONGO PRAZO DA PREGABALINA SOBRE A
AQUISIÇÃO DA EXTINÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL E
SOBRE RESPOSTAS DE ANSIEDADE EM ANIMAIS DIABÉTICOS NÃO
CONTROLADOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, no Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaina Menezes Zanoveli

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Silva, Álvaro Henrique Bernardo de Lima.

Efeito a curto e longo prazo da pregabalina sobre a aquisição da extinção de uma memória aversiva contextual e sobre respostas de ansiedade em animais diabéticos não controlados. / Álvaro Henrique Bernardo de Lima Silva. – Curitiba, 2021.

91 f. : il.

Orientador: Janaina Menezes Zanoveli.

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

1. Estreptozocina. 2. Transtornos de estresse pós-traumáticos. 3. Ansiedade. 4. Diabetes. 5. Estresse oxidativo. 6. Memória. 7. Medo. I. Título. II. Zanoveli, Janaina Menezes. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.784



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 **ALVARO HENRIQUE BERNARDO DE LIMA SILVA** intitulada: **EFEITO A CURTO E LONGO PRAZO DA PREGABALINA SOBRE A AQUISIÇÃO DA EXTINÇÃO DE UMA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL E SOBRE RESPOSTAS DE ANSIEDADE EM ANIMAIS DIABÉTICOS NÃO CONTROLADOS**, sob orientação da Profa. Dra. JANAÍNA MENEZES ZANOVELI, que após terem inquirido o aluno e realizada 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, 24 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

25/09/2021 13:41:57.0

JANAÍNA MENEZES ZANOVELI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/09/2021 13:43:54.0

LEANDRO JOSE BERTOGLIO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

25/09/2021 13:35:50.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 113956

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 113956

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Ana Cristiane e Juvenildo Bernardo, que proporcionaram a base e o apoio necessários para que eu pudesse persistir nos meus sonhos. Sem a força, o amor, e o exemplo de vocês, eu não teria conseguido.

A Aline Sarafin, uma mulher incrível e uma companheira extraordinária, que a cada dia me ensina mais. Seu amor me acalma, sua sensibilidade me cativa, sua força me incentiva e sua beleza me encanta. Desejo que continuemos aprendendo e nos transformando juntos, com muito amor durante toda a vida.

Agradeço a minha orientadora, Janaina Zanoveli, que sempre se mostrou disposta a ajudar a melhorar e aperfeiçoar minha formação. Muito mais que um exemplo de cientista e professora, sua generosidade e humanidade são inspiradoras. Seu apoio foi fundamental.

A todos(as) os(as) camaradas, Ana Paula, Yane, Felipe, Thiago e Manuella, que compartilharam muitas dificuldades, questionamentos e desafios diários de se fazer ciência em um momento tão difícil. Que essas parcerias do laboratório, sigam e perdurem pela vida, com muitas trocas de conhecimentos e reflexões.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a todos os professores, que contribuíram nessa grande jornada do conhecimento, compartilhando os ensinamentos da ciência.

Que tal se delirarmos por um tempinho
Que tal fixarmos nossos olhos mais além da infâmia
Para imaginar outro mundo possível?

Eduardo Galeano

RESUMO

Os anticonvulsivantes, como a pregabalina, têm-se mostrado uma excelente alternativa para o tratamento de formas graves de psicopatologias, como Transtornos de ansiedade e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), bem como da dor crônica, como a dor neuropática. Dado que o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) tem sido associado a essas doenças, nosso objetivo foi investigar os efeitos de curto e longo prazo da pregabalina na aquisição da memória de extinção do medo e sobre parâmetros de ansiedade em animais com DM1. Também estudamos alguns possíveis mecanismos relacionados à uma ação neuroprotetora, como o potencial antioxidante da pregabalina. Tendo em vista que a sinalização glutamatérgica está exacerbada em áreas cerebrais de animais com DM1, estudamos os efeitos de uma redução na sinalização glutamatérgica utilizando para isto o antagonista não competitivo do receptor glutamatérgico NMDA ketamina. Para isto, quatro semanas após a indução experimental do DM1, os animais foram expostos a uma sessão de condicionamento de medo contextual. No dia seguinte, antes da sessão de treinamento de extinção os animais receberam uma única injeção de pregabalina (0, 30, 100 ou 300 mg/kg; i.p.) ou de ketamina (0, 5, 15 ou 25 mg / kg; ip). Vinte e quatro horas depois, foi realizado o teste de extinção e, sete dias após, foi realizado o teste de recuperação de memória seguido do teste no labirinto em cruz elevado. Um grupo independente de animais foi sacrificado imediatamente após a sessão de treino de extinção e o hipocampo e córtex pré-frontal foram dissecados para analisar parâmetros indiretos do estresse oxidativo. Nossos achados confirmaram que animais com DM1 apresentam maior expressão de memória de medo e dificuldade em extinguir essa memória de medo, além de uma resposta do tipo ansiedade, mesmo que tardia, mais pronunciada quando comparados com animais normoglicêmicos. A pregabalina foi capaz de induzir um efeito de curta e longa duração, facilitando a aquisição da memória de extinção do medo e induzindo um efeito ansiolítico tardio. Mais ainda, exerceu uma ação antioxidante por melhorar parâmetros indiretos do estresse oxidativo avaliados nas áreas encefálicas. No entanto, a ketamina não induziu efeitos semelhantes à pregabalina, ou seja, não foi capaz de alterar todas as respostas comportamentais disfuncionais dos animais DM1. Apesar da necessidade de mais estudos para compreender o mecanismo de ação da pregabalina nessas condições específicas do presente estudo, nossos dados demonstram claramente que uma única injeção de pregabalina foi capaz de melhorar os parâmetros comportamentais, além de induzir efeito neuroprotetor. Assim, a pregabalina tem potencial que vale a pena explorar para o tratamento de TEPT e/ou ansiedade associada ao DM1.

Palavras-chave: Estreptozotocina. Transtorno de estresse pós-traumático. Labirinto em cruz elevado. Medo condicionado contextual. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Anticonvulsant drugs, like pregabalin, have been shown to be an excellent alternative to treat severe forms of psychopathologies, like anxiety disorders and posttraumatic stress disorder (PTSD), as well chronic pain, such as diabetic neuropathic pain. Given that type-1 diabetes *mellitus* (T1DM) has been associated with these diseases, we aimed to investigate the short- and long-term effects of the pregabalin on acquisition of fear extinction memory and parameters of anxiety in T1DM animals. We also studied some possible mechanisms underlying the putative neuroprotective effect of pregabalin, such as an antioxidant action and/or action in decreasing the toxic effects of exacerbated glutamatergic signaling, which occurs in brain areas of T1DM animals. For that, four weeks after experimental T1DM induction, animals were exposed to a contextual fear conditioning session. In the next day, before the extinction training (ExTr) session, animals received one single injection of pregabalin (30, 100 or 300 mg/kg; i.p.), a noncompetitive NMDA receptor antagonist Ketamine (5, 15 or 25 mg/kg; i.p.) or vehicle. Twenty-four hours later, the extinction test was performed and, seven days after we performed the retrieval test followed by the elevated plus maze test. An independent group of animals was euthanized immediately after ExTr session and had your hippocampus and prefrontal cortex dissected to analyze indirect parameters of oxidative stress. Our findings confirmed that T1DM animals present greater expression of fear memory and difficulty in extinguishing this fear memory, in addition to a more pronounced anxiety-like response when compared to normoglycemic animals. Pregabalin was able to induce a short and long-lasting effect in facilitating the acquisition of the fear extinction memory and inducing a later anxiolytic-like effect. Moreover, it exerted an antioxidant action on indirect parameters evaluated in the hippocampus and prefrontal cortex. However, ketamine did not induce effects similar to pregabalin, *i.e.*, was not able to change all dysfunctional behavioral responses of the T1DM animals. Despite the need for more studies to understand the mechanism of action of pregabalin in these parameters and under these specific conditions of the present study, our data clearly demonstrate that a single injection of pregabalin was able to improve behavioral parameters in addition to inducing neuroprotective effect. Thus, pregabalin has potential worth exploring for the treatment of PTSD and/or anxiety associated to T1DM.

Key-words: Streptozotocin. Post-traumatic stress disorder. Elevated plus maze. Contextual conditioned fear. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Representação esquemática da relação entre as principais estruturas que participam da resposta de medo aumentada (A) ou reduzida (B).....	25
Fig. 2 - Modelo conceitual de ação do ligante $\alpha 2\text{-}\delta$	32
Fig. 3 - Esquema da representação do protocolo de condicionamento de medo ao contexto.....	38
Fig. 4 - Efeito do condicionamento em animais NGL e DBT na memória de extinção do medo.....	46
Fig. 5 - Efeito do condicionamento ao contexto no comportamento tipo ansiedade de animais DBT e NGL.....	48
Fig. 6 - Efeito de uma única injeção de PGB em animais DBT na aquisição da memória de extinção do medo.....	50
Fig. 7 - Efeito de uma única injeção de PGB sobre parâmetros de ansiedade tardia em animais DBT.....	52
Fig. 8 - Efeito de uma única injeção de PGB em animais DBT, sobre a atividade locomotora.....	53
Fig. 9 - Avaliação da atividade antioxidante da PGB: Ensaio DPPH.....	55
Fig. 10 - Efeito antioxidante de injeção aguda de PGB.....	56
Fig. 11 - Efeito de uma única injeção de KET em animais diabéticos na aquisição de memória de extinção de medo.....	58
Fig. 12 - Efeito de uma única injeção de KET sobre parâmetros de ansiedade tardia em animais DBT	59
Fig. 13 - Efeitos de uma única injeção de PGB na consolidação da memória de extinção do medo em animais DBT.....	87
Fig. 14 - Efeito de uma única injeção de PGB sobre parâmetros de ansiedade em animais DBT.....	88

Fig. 15 - Efeito do treino prolongado de 40 min sobre a aquisição da memória de extinção do medo em animais DBT.....	91
Fig. 16 - Efeito do treino prolongado de 40 min sobre o comportamento do tipo ansiedade em animais DBT.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de glicemia e peso de animais sob diferentes condições expostos a diferentes procedimentos.	49
Tabela 2 - Efeito da PGB sobre os parâmetros de glicemia e peso dos animais diabéticos.....	53
Tabela 3 - Efeito da KET sobre os parâmetros de glicemia e peso dos animais diabéticos.....	60
Tabela 4 - Efeito da PGB após o TrExt sobre os parâmetros de glicemia e peso dos animais diabéticos.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

ABL - Amígdala Basolateral

AhR - Receptor de hidrocarboneto de anel

CCA – Córtex Cingulado Anterior

CPF – Córtex Pré-Frontal

CPFm – Córtex Pré-Frontal Medial

CPFvl - Córtex Pré-Frontal Ventrolateral

COX-2 - Ciclooxigenase-2

DM – Diabetes mellitus

DM1 – Diabetes *Mellitus* tipo 1

DM2 – Diabetes *Mellitus* tipo 2

DBT – animais diabéticos

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

EPM – Erro padrão da média

HIP – Hipocampo

i.p. - Intraperitoneal

IDF – International Diabetes Federation

IL – Infralímbico

ISRNs - Inibidores da recaptação de norepinefrina

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

NGL – Normoglicêmicos

N.Cond – animais que não passaram pelo condicionamento ao medo contextual

Cond - animais que passaram pelo condicionamento ao medo contextual

NF- κ B - fator nuclear kappa B

Nrf2 - Fator nuclear derivado de eritóide 2

STZ – Estreptozotocina

SSRI – Inibidor seletivo da recaptação da serotonina

PGB- Pregabalina

PL – Pré-límbico

TEPT – Transtorno de Estresse Pós-Traumático

TAG – Transtorno de Ansiedade Generalizada

TCAs - Tricíclicos

TP – Transtorno do Pânico

VEI – Veículo

KET – Ketamina

PTGES - Prostaglandina E sintase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	O DIABETES MELLITUS.....	17
1.2	TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO E TRANSTORNOS DE ANSIEDADE.....	20
1.3	RELAÇÃO ENTRE DIABETES MELLITUS E PSICOPATOLOGIAS.....	28
1.4	TRATAMENTO DE PSICOPATOLOGIAS ASSOCIADAS AO DIABETES	30
2	OBJETIVOS E HIPÓTESE	34
2.1	OBJETIVO GERAL	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
2.3	HIPÓTESE	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	ANIMAIS	35
3.2	PROTOCOLO DE TRATAMENTO.....	36
3.3	INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL	36
3.4	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	37
3.4.1	Protocolo de condicionamento ao medo contextual.....	37
3.4.2	Teste de campo aberto (TCA).....	37
3.4.3	Teste Labirinto em cruz elevado (LCE).....	37
3.5	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	38
3.5.1	Ensaio de difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).....	38
3.5.2	Amostras do cérebro.....	39
3.5.3	Determinação dos níveis reduzidos de glutathiona (GSH).....	39
3.5.4	Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO).....	39

3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
3.6.1	Experimento 1.....	40
3.6.2	Experimento 2.....	40
3.6.3	Experimento 3.....	41
3.6.4	Experimento 4.....	41
3.6.5	Experimento 5.....	43
3.6.6	Experimento 6.....	43
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4	RESULTADOS.....	44
4.1	EFEITO DO CONDICIONAMENTO AO MEDO CONTEXTUAL NO COMPORTAMENTO DE ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMOGLICÊMICOS....	44
4.2	EFEITO CONDICIONAMENTO NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMOGLICÊMICOS.....	47
4.3	EFEITO DA PREGABALINA NA AQUISIÇÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO E ANSIEDADE EM ANIMAIS DIABÉTICOS.....	49
4.4	EFEITO DA PREGABALINA NO COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE EM ANIMAIS DIABÉTICOS.....	50
4.5	EFEITO DA PREGABALINA SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM ANIMAIS DIABÉTICOS.....	51
4.6	EFEITO ANTIOXIDANTE DA PREGABALINA (DPPH).....	54
4.7	EFEITOS DE UMA ÚNICA INJEÇÃO DE PGB SOBRE PARÂMETROS RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO, AVALIADOS NO HIP E CPF DE ANIMAIS DBT.....	55
4.8	EFEITO DA KETAMINA SOBRE AQUISIÇÃO DE MEMÓRIA DE EXTINÇÃO EM ANIMAIS DIABÉTICOS.....	57
4.9	EFEITO DA KETAMINA SOBRE COMPORTAMENTOS DO TIPO ANSIEDADE EM ANIMAIS DIABÉTICOS.....	59

5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÃO.....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICE 1 - EFEITOS DE CURTO E LONGO PRAZO DE UMA ÚNICA INJEÇÃO DE PGB NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DO MEDO EM ANIMAIS DBT.....	86
APÊNDICE 2 - EFEITO DO TREINO PROLONGADO DE 40 MIN SOBRE A AQUISIÇÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DO MEDO EM ANIMAIS DBT.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 O DIABETES MELLITUS

O Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica e metabólica que tem se alastrado de forma progressiva e silenciosa nas últimas décadas. Segundo a Federação Internacional do Diabetes (*International Diabetes Federation* - IDF, 2019), no ano de 2019 havia cerca de 465 milhões de pessoas com a diabetes no mundo, sendo que em 1980 esse número era de 108 milhões. Seguindo nesse ritmo, as projeções sugerem que em 2045 haverá mais de 700 milhões de diabéticos ao redor do planeta (IDF, 2019). De acordo com dados epidemiológicos publicados em 2019 pelo Ministério da Saúde brasileiro, o DM é a quarta causa de morte em homens e a terceira em mulheres (MS, 2019). É importante ressaltar ainda que além dos impactos na saúde, o DM também tem consequências econômicas importantes. Estimativas mostram que o DM foi responsável mundialmente por aproximadamente US\$ 760 bilhões em gastos com saúde em 2019 (IDF, 2019).

O DM é caracterizado por níveis elevados de glicose no sangue devido à ausência de produção suficiente do hormônio insulina e/ou prejuízo na sua ação (GUO et al., 2010). A doença é classificada, principalmente, como tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) ou gestacional, sendo o tipo 1 responsável por cerca de 10% dos casos, em comparação ao tipo 2, que corresponde a 90% dos casos. O DM1 afeta comumente crianças e adolescentes, e é caracterizado pela destruição autoimune de células β pancreáticas, enquanto o DM2 ocorre devido a resistência e deficiência na secreção de insulina (PETERSMANN et al., 2018). O DM gestacional ocorre entre 3 a 25% das grávidas, sendo caracterizado pelo aumento dos níveis de glicose durante a gestação, e está ligado a maior prevalência no desenvolvimento de DM2. Em decorrência da grande falta de insulina, o tratamento dos pacientes com DM1 é completamente dependente do suporte externo do hormônio, enquanto os pacientes com DM2, de acordo com a gravidade, podem seguir um controle menos restrito, a partir de mudanças nos hábitos alimentares e comportamentais, além de medicações antidiabéticas como a metformina e glibenclamida. Os principais sintomas

relacionados ao DM são poliúria aguda, polidipsia, hiperglicemia crônica e cetoacidose. Esses sintomas estão presentes em ambos os tipos, mas são exacerbados no DM1 (PETERSMANN et al., 2018).

De principal interesse para o presente trabalho, o DM1 é comumente associado a fatores genéticos devido a característica de uma ação autoimune que leva a destruição das células β -pancreáticas. Essa característica poderia indicar uma consistência nos números de casos de DM1 na população, no entanto, tem-se observado um aumento na incidência do DM1 nas últimas décadas. De acordo com dados da IDF mais de 1 milhão de crianças e adolescentes até 20 anos de idade apresentaram DM1 em 2019. Nesse contexto, o Brasil é o terceiro país com maior número (90 mil) de crianças e adolescentes com DM1 (IDF, 2019). Esse aumento indica que o desenvolvimento da doença também pode ocorrer pela influência de outros fatores. Nesse sentido, vários estudos nos últimos anos tem demonstrado evidências de que infecções prolongadas por enterovírus durante a infância podem resultar em reações autoimunes associadas ao DM1 (COLLI et al., 2019; RICHARDSON et al., 2009; ROIVAINEN, 2009). Atualmente, com a pandemia de COVID-19, tem-se apontado a possibilidade da infecção pelo SARS-Cov-2 também estar ligada ao desenvolvimento do DM1 (SATHISH et al., 2021). Outras alterações ambientais, como eventos estressores em fases da infância, também têm sido apontadas como tendo potencial de aumentar os riscos de desenvolvimento do DM1 (EDWIN & GALE, 2002; SNOUFFER, 2018). Além disso, a pesquisa relacionada ao DM1 é importante pois este não é evitável, diferentemente do DM2 para o qual existem recomendações de políticas públicas e mudanças de hábitos de vida visando a diminuição da sua prevalência. Ou seja, mais do que avanços políticos e transformações de comportamentos, no atual cenário, o DM1 necessita de avanços na área médica para que se diminua seu impacto na vida do paciente e no mundo.

Importante mencionar que de acordo com a Associação Americana do Diabetes e a Organização Mundial da Saúde (OMS), o DM1 é subdividido em 1A (do tipo autoimune) e 1B (idiopático). O DM1A é resultado da destruição das células β por auto-anticorpos, enquanto a causa exata do DM1B não é totalmente conhecida e pode estar relacionada com os já discutidos acima, como os fatores ambientais (CHIANG et al., 2014). Atualmente, existe uma nova categoria de DM1 chamada

diabetes fulminante tipo 1, definido por um início súbito de cetose ou cetoacidose, secreção de peptídeo C ausente ou diminuída e alto nível de glicose plasmática acompanhado de nível normal de hemoglobina glicosilada. A denominação de fulminante é devido a sua rápida progressão, que acontece em alguns dias e deixa uma característica única quando o exame de sangue é realizado (IMAGAWA et al., 2003; SUE et al., 2008). Existe a possibilidade de que o sistema ou complexo de antígeno leucocitário humano (HLA) possa interagir com vírus e causar DM1 fulminante. Entre a vasta gama de vírus, os enterovírus e os vírus do herpes parecem estar frequentemente associados ao diabetes fulminante, particularmente o herpesvírus humano 6 (HHV-6), que pode causar síndrome de hipersensibilidade e reativação do HHV-6 (CHIANG et al., 2014; MALDONADO et al., 2003). Também é importante notar que os anticorpos IgA estão significativamente mais elevados em pacientes com DM fulminante tipo 1A do que em DM 1A. Embora se diga que os vírus precedem esse tipo de diabetes, as reações imunológicas também podem ter um papel no desenvolvimento da doença, principalmente pela resposta dos linfócitos T. A insulite é observada no pâncreas de pacientes falecidos, mas esse achado não garante a autoimunidade mediada pela destruição das células β (MALDONADO et al., 2003).

Na pesquisa pré-clínica, o DM1 pode ser estudado a partir do modelo de indução por estreptozotocina (STZ). A STZ é um antibiótico produzido pela bactéria *Streptomyces achromogens*, e seu potencial diabetogênico foi descrito pela primeira vez por Junod e colaboradores (1969). Devido a sua capacidade em se ligar de forma seletiva a transportadores de glicose do tipo GLUT2 presente nos hepatócitos, células β pancreáticas, mucosa intestinal e rins (ELEAZU et al., 2013; WU & YAN, 2015), a STZ provoca a desregulação das células β pancreáticas, através do aumento de espécies reativas de oxigênio, causando estresse oxidativo e citotoxicidade. É importante ressaltar que a STZ não atravessa a barreira hematoencefálica e possui meia-vida de aproximadamente 15 minutos. Assim, a toxicidade aguda da STZ é seletiva e não está associada às lesões crônicas observadas em outros órgãos, como o encéfalo (KARUNANAYAKE et al., 1974). Sabe-se que as variações da glicemia são detectadas de forma sensível pelas células β pancreáticas que modulam a secreção de insulina ou captação da glicose hepática (ROWN, 2000).

No caso da destruição da maioria das células β pancreáticas, como provocada pela ação da STZ, ocorre a insuficiência de insulina e consequentemente leva ao quadro de hiperglicemia (WU & YAN, 2015). Trabalhos anteriores do nosso grupo, já demonstraram que após um período de 3 a 4 semanas, os animais com DM1 experimental apresentam alterações semelhantes às que ocorrem nos pacientes com DM1, como hiperglicemia, redução do ganho de peso, polifagia, poliúria e polidipsia (CHAVES et al., 2020; DE MORAIS et al., 2014a; DE SOUZA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020; ZANOVELI et al., 2016). Sendo assim, as alterações fisiológicas e comportamentais representadas pelo modelo podem ser atribuídas às consequências da condição diabética, como a hiperglicemia (HIRANO et al., 2006; KARUNANAYAKE et al., 1974; WU & YAN, 2015).

1.2 TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO E TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

As memórias são a base estrutural da personalidade humana e fundamentais para a construção das experiências subjetivas. A formação de uma memória é influenciada por diversos processos, incluindo fatores emocionais como o medo e ansiedade, que também são parte central dos transtornos psiquiátricos (ALBERINI & LEDOUX, 2013). O medo é uma emoção de alta prevalência, ocasionada pela exposição a uma ameaça real e proximal (DAVIS, 2000). Apesar de ser uma experiência desagradável, sentir medo é importante do ponto de vista evolutivo e fundamental para a sobrevivência, pois eleva os cuidados referentes a situações de perigo a partir de uma resposta imediata e aprendizado gerado (IZQUIERDO et al., 2016). No senso comum, as concepções de medo e ansiedade são recorrentemente utilizadas como sinônimos. Apesar dessas emoções serem adaptativas e importantes para a sobrevivência das espécies e de também poderem estar relacionadas, não é possível reduzi-las a uma mesma definição (IZQUIERDO et al., 2013). A ansiedade é uma emoção que está vinculada à apreensão e inquietação de eventos esperados, ou seja, uma projeção de um risco eventual ou em potencial, enquanto o medo é uma emoção que está associada fortemente à uma reação a uma ameaça iminente, real (DAVIS, 2000; MCNAUGHTON, 2011; STEIMER, 2002). Quando os processos que regulam a homeostase dinâmica dos fatores emocionais apresentam uma falha de

detecção, produzindo respostas exacerbadas e mal adaptativas, ocorrem as caracterizações dos eventos patológicos (JOVANOVIC et al., 2009; PITMAN et al., 2012). As definições dos transtornos psiquiátricos com seus respectivos sinais e sintomas têm sido alvo de constantes discussões e atualizações. Por exemplo, os critérios de classificação do transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), no Manual de diagnóstico e estatística dos transtornos mentais (DSM) foram modificados nesta última edição (quinta edição) do DSM feita pela Associação Psiquiátrica Americana (APA, 2013). Antes, o TEPT estava incluído dentro dos chamados transtornos de ansiedade, que agrupa Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), o Transtorno do Pânico (TP) Fobia Específica (FE), Agorafobia, entre outros. Nesta última edição, o TEPT está classificado como um transtorno relacionado ao estresse ou trauma. No entanto, apesar desta nova classificação no DSM-V, a OMS ainda mantém classificação sob a mesma nomenclatura de transtornos de ansiedade, para fins de dados epidemiológicos, por ter esse transtorno diversas características semelhantes com os demais citados (OMS, 2017).

O TEPT é um transtorno psiquiátrico grave e debilitante que se desenvolve após exposição a eventos traumáticos, como guerras, violência sexual, acidentes diversos (DSM, 2002). Estima-se que cerca 70% da população irá vivenciar algum evento traumático ao longo da vida, e cerca de 7% desses indivíduos desenvolverão o transtorno (KOENEN et al., 2017). Assim como para o DM, existe também uma grande variação de incidência entre países e subgrupos em relação aos fatores de risco envolvidos no TEPT (SAREEN et al., 2013). Por exemplo, a prevalência de casos de TEPT em militares americanos combatentes nas guerras do Iraque e Afeganistão é de 13,8%, enquanto na população americana em geral a taxa é de 6,1%. (GOLDSTEIN et al., 2016; TANELIAN & JAYCOX, 2020). Os pacientes que sofrem com a doença apresentam comumente sintomas de re-experiência do evento traumático, por meio de pesadelos, *flashbacks* e memórias intrusivas, além de comportamentos de esquiva, evitação a locais e pessoas que relembrem o evento aversivo (HOLMES, 2013). Outra característica importante do TEPT, que é o foco do nosso estudo, é a deficiência na extinção da memória de medo (MARKOWITZ, 2020). A extinção é um processo de aprendizado importante e geralmente estudado experimentalmente por meio do paradigma do condicionamento clássico ou Pavloviano. Neste processo ocorre a aprendizagem através de uma associação entre

um estímulo neutro, tais como luz, som, ou contexto denominado de estímulo condicionado (EC), com um estímulo aversivo por exemplo - o choque nas patas, denominado de estímulo incondicionado (EI) (MAREN et al., 2013). A partir dessa associação, o EC adquire propriedades aversivas provocando no animal, quando em contato com o EC (na ausência do EI), a expressão de comportamentos de defesa, tais como fuga, congelamento, esquiva, sobressalto potencializado (HITCHCOCK & DAVIS, 1986), e/ou vocalização ultrassônica (BLANCHARD et al., 1993), além de respostas fisiológicas ligadas ao sistema nervoso autônomo, como hipertensão e taquicardia (LEDOUX, 2000). É importante ressaltar que o processo de extinção é entendido como um processo relacionado com a redução da resposta condicionada em decorrência da exposição repetida ao EC na ausência do EI (LUCHKINA, 2019). Nesse sentido, a extinção é um novo aprendizado que concorre e neutraliza a memória aversiva, mas não apaga e nem provoca o esquecimento da memória de medo original (BOUTON, 2004; FURINI et al., 2014; IZQUIERDO et al., 2016). Outra característica do aprendizado da extinção é a de não ser permanente, pois em casos estudados (reinstalação, renovação e recuperação espontânea), observa-se o reaparecimento da memória de medo (MYERS & DAVIS, 2007).

Estudos sobre a memória de medo utilizando o modelo de condicionamento contextual têm sido amplamente conduzidos proporcionando maior entendimento da neurobiologia de doenças associadas à memória aversiva como o TEPT, bem como uma melhor compreensão dos processos envolvidos no aprendizado e na memória emocional (FURINI et al., 2014; IZQUIERDO et al., 2016). No aspecto translacional, a psicoterapia de exposição tem sido utilizada com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de uma memória de extinção de medo/trauma (DAVIS et al., 2011; MILAD & QUIRK, 2012). Essa abordagem clínica busca desencadear o processamento emocional no paciente através de estímulos graduais e sistemáticos relacionados ao trauma (lembrar e recontar o evento), seguido pela discussão da experiência de revisitação para desconstruir as percepções errôneas que fundamentam o TEPT (MARKOWITZ, 2020). No entanto, apesar de ter sua efetividade reconhecida, muitos pacientes não respondem de forma eficiente à esta terapia de exposição (FOA & MCLEAN, 2016). Como dito anteriormente, o processo de extinção da memória aversiva não é permanente, sendo importante o aperfeiçoamento da

abordagem e a busca por métodos alternativos (FOA & KOZAK, 1986; FOA & MCLEAN, 2016; STERN et al., 2012).

Em relação aos processos neurobiológicos, o aprendizado da extinção, assim como a aquisição da memória de medo, requer mudanças de plasticidade sinápticas em regiões específicas e circuitos neuronais responsáveis pela expressão do comportamento (HAN; XU, 2018). Sabe-se que a extinção da memória de medo é dependente de ações da atividade de potenciação de longo prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD), mediadas, por exemplo, através de receptores glutamatérgicos, colinérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos, além de uma cascata de síntese de proteínas e ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (VGCCs), no hipocampo (HIP), na amígdala e/ou córtex pré-frontal (CPF) (CAIN et al., 2002; FURINI et al., 2014; IZQUIERDO et al., 2013; LUCHKINA, 2019). Nesse sentido, projeções excitatórias e inibitórias nessas regiões encefálicas são fundamentais para a regulação da resposta de medo e extinção (CAREAGA et al., 2016). No processo de aquisição da memória de medo (condicionamento de medo contextual) ocorre um aumento da atividade de sinapses glutamatérgicas (NONAKA et al., 2014) e noradrenérgicas nas regiões corticais da amígdala (GIUSTINO, 2018). A atividade causada por um estímulo sensorial na amígdala também modula a plasticidade do HIP e o crescimento dendrítico (GIACHERO et al., 2013). Ainda mais, estudos tem demonstrado que o prejuízo das projeções decorrentes do HIP e CPF para a amígdala, podem estar ligadas à hiperatividade amigdalar registrada nos casos de TEPT (CAREAGA et al., 2016; RICHTER-LEVIN, 2004). Aqui, é importante destacar que o HIP é a região responsável pela codificação do contexto, um dos elementos fundamentais para o processamento da memória de medo e aprendizado da extinção, além de estar ligado à expressão de respostas cognitivas e emocionais (FURINI et al., 2014; LUCHKINA, 2019; YEHUDA et al., 2015). Evidências também indicam que desregulações causadas pelas psicopatologias estão relacionadas a diminuição do volume do HIP e CPF (NEWPORT, 2000).

Outras regiões importantes dos circuitos neurais implicados na formação da memória de medo e extinção, são as subdivisões da amígdala e do CPF. Na amígdala, a amígdala basolateral (ABL), incluindo a região central e as células intercaladas (CIT) - desempenham papéis importantes na aquisição e retenção da memória de extinção

(AMANO et al, 2010; PARÉ et al., 2004; POPA et al., 2008). A região central da amígdala é a principal saída da amígdala, controlando as respostas fisiológicas de medo através de projeções divergentes para o hipotálamo e áreas do tronco cerebral (MAREN & QUIRK, 2004). No CPF, a porção infralímbica (IL) está envolvida na inibição e extinção do medo, enquanto a divisão pré-límbica (PL) tem maior participação na aquisição e consolidação da memória de medo (LUCHKINA, 2019). Estudos em animais tem demonstrado que a lesão ou inativação da parte IL durante o treinamento de extinção prejudica a recuperação da memória, enquanto que a estimulação dessa região facilita a recuperação da extinção (MONTE et al., 2015; SANTINI et al., 2008; SANTINI et al., 2012). Ainda mais, Bayer e Bertoglio (2020) apontaram que a inativação do IL logo após a aquisição da memória de medo contextual, pode resultar em uma maior generalização dessa memória. A extinção do medo envolve um circuito inibitório, onde novas associações aprendidas conduzem entradas do IL para a ABL e CIT, que inibem o núcleo central da amígdala, resultando na supressão da resposta de medo (LUCHKINA, 2019). Juntamente com os processos inibitórios, podem ocorrer mecanismos de reversão da LTP envolvidos na memória de medo. A reversão da LTP, leva ao enfraquecimento de algumas associações relacionadas a memória de medo, e já tem-se registrado que durante a extinção da memória pode ocorrer uma diminuição na atividade do CPF medial (CPFm), córtex órbito-frontal e do córtex cingulado anterior (CCA) (CAREAGA et al., 2016). Por outro lado, é verificada uma maior ativação da amígdala, ínsula anterior, porção dorsal do CCA e uma atividade do HIP basal mais pronunciada (PATEL et al., 2012).

Assim, é importante destacar a integração das ações e estruturas envolvidas no processamento da formação da memória de medo e do aprendizado da extinção. A ativação disfuncional da amígdala, HIP e CPF, relatadas por estudos em humanos e roedores, demonstram a contribuição dessas áreas do cérebro para o TEPT (CAREAGA et al., 2016) (ver figura 1).

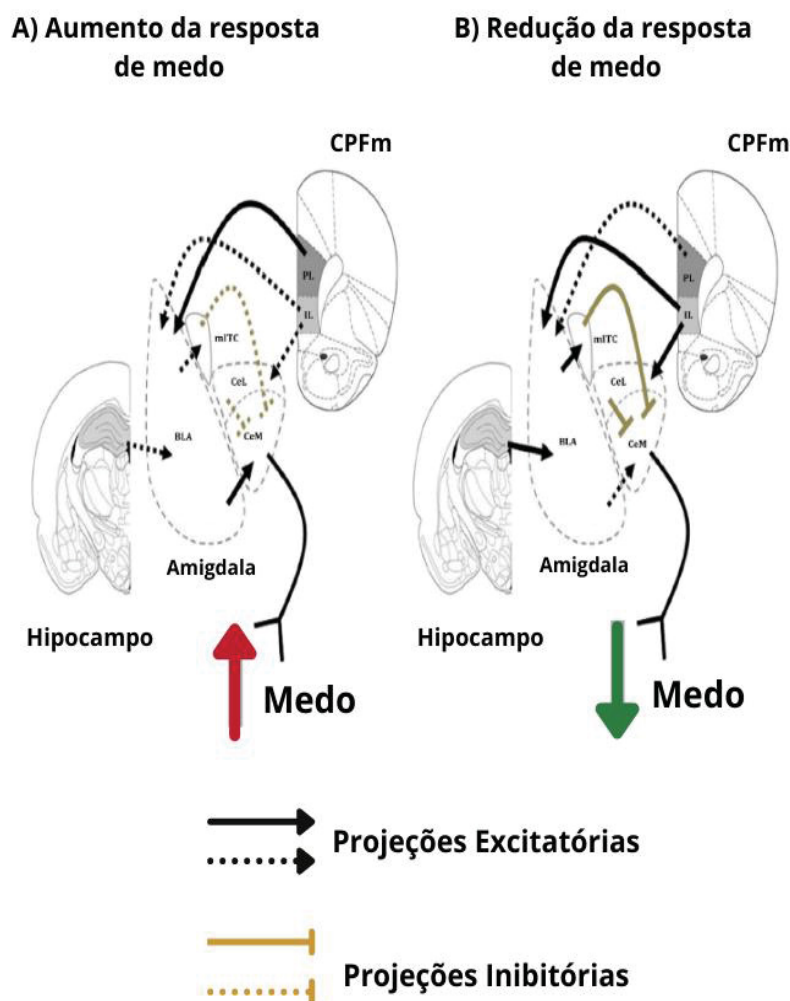


Fig. 1 - Representação esquemática da relação entre as principais estruturas que participam da resposta de medo aumentada (A) ou reduzida (B). As setas pretas representam entradas excitatórias e linhas marrons, entradas inibitórias. Setas e linhas preenchidas representam fortes, enquanto setas e linhas tracejadas representam influências fracas de uma estrutura na outra. Resposta de medo aprimorada é esperada quando a parte infralímbica (IL) do CPFm e o HIP inibem fracamente a amígdala, que se torna mais ativada (A). O contrário é proposto para acontecer na resposta de medo reduzida, onde o aumento da atividade do IL e do HIP reduz a ativação da amígdala (B). Fonte: **adaptado de Careaga et al. (2016).**

Em relação aos Transtornos de Ansiedade, dados da OMS de 2019 apontavam que no mundo os números de pessoas com Transtornos de Ansiedade já ultrapassavam os 260 milhões, o que representa uma alta de 15% em comparação com dados de 2005 (OMS, 2019). No Brasil, a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) aponta que o país tem o maior índice de ansiedade (9,3%), o que corresponde a quase

19 milhões de pessoas com Transtornos de ansiedade (PNS, 2019). Nos Estados Unidos, dados do *National Comorbidity Survey Replication* (NCS-R), demonstram a prevalência de 32% de Transtornos de ansiedade ao longo da vida. Entre as principais escalas de ansiedade classificadas pelo DSM-5, o Transtorno de ansiedade social (TAS) e a fobia específica são os de maior prevalência na população norte americana (TALBOTT, 2006). Ainda mais, evidências apontam que pacientes com TAG e TAS, apresentam elevadas taxas de recorrência e/ou experimentam sintomas de ansiedade persistentes (RODRIGUEZ et al., 2006). Nesse sentido, as abordagens psicoterapêuticas e os tratamentos farmacológicos são comumente usados de forma associada para melhorar a resposta dos pacientes ao tratamento (STRÖHLE et al., 2018). No entanto, estudos apontam que cerca de 50% dos adultos (STEIN et al., 1999; VAN AMERINGEN et al., 2001) e 40% das crianças e adolescentes não respondem satisfatoriamente a tratamentos farmacológicos ou psicoterapêuticos (COYLE, 2001; WALKUP et al., 2008; WELGE et al., 2015). Atualmente, os principais medicamentos aprovados pela Agência americana de Administração de alimentos e medicamentos (*Food and Drug Administration* - FDA) para o tratamento de TAG, TAS e TP, são os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs) e inibidores seletivos de recaptação da norepinefrina (ISRNs) (GARAKANI et al., 2021). Vale mencionar que erros de diagnóstico, baixa adesão ao tratamento, interação com outras substâncias e presença de comorbidades, são alguns dos motivos que levam os pacientes a uma condição refratária aos tratamentos (GARAKANI et al., 2021; STRÖHLE et al., 2018).

As investigações para melhor compreensão dos Transtornos de ansiedade têm avançado, em boa parte, devido às pesquisas pré-clínicas. Neste aspecto, um modelo animal muito usado para testar a ação ansiolítica de drogas, é o teste do labirinto em cruz elevado (LCE) (CRUZ & FREI, 1994). O teste foi validado para ratos por Pellow e colaboradores (1985) e se baseia na aversão natural dos animais a espaços abertos e elevados. As medidas etológicas avaliadas pelo LCE, como o tempo de permanência e exploração das extremidades dos braços abertos, afundamentos da cabeça e autolimpeza, proporcionam a análise de diferentes parâmetros de ansiedade e ajudam a avaliar a ação ansiolítica de drogas (ANSELONI & BRANDÃO, 1997; CRUZ & FREI, 1994). Mesmo que, em muitos casos, a

transposição direta entre a pesquisa básica e a clínica seja difícil (GRILLON et al., 2019), é importante ressaltar que os estudos pré-clínicos são fundamentais para o processo de descoberta de novas metodologias e alvos terapêuticos, assim como o aperfeiçoamento dos métodos terapêuticos para a melhor qualidade de vida dos pacientes com Transtornos de ansiedade.

Na neurobiologia dos Transtornos de ansiedade, assim como ocorre no TEPT, são observadas desregulações do CPFm, CCA ventral e dorsal (PATEL et al., 2012). Além disso, evidências apontam para um aumento de atividade e volume da amígdala, juntamente com um aumento da atividade do CPF ventrolateral e da insula (MARTIN et al., 2010; STRAWN et al., 2012). O HIP é outra estrutura importante, pois faz parte do controle inibitório sobre o sistema de resposta ao estresse hipotalâmico e desempenha um papel no *feedback* negativo para o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (MARTIN et al., 2010). Foi demonstrado que as regiões ventral e dorsal do HIP, tem papéis distintos no processamento da ansiedade e da memória, enquanto lesões na região ventral do HIP podem atenuar a expressão de comportamentos defensivos ligados a ansiedade, a inativação do HIP dorsal está mais relacionado a aprendizagem espacial e memória (BERTOGLIO et al., 2006; SWANSON et al., 1977). Nesse sentido, Santos e colaboradores (2008) sugerem que o bloqueio de canais TRPV1, localizados no HIP ventral reduzem o comportamento do tipo ansiedade em animais expostos ao teste LCE. Respostas inadequadas do eixo HPA, tem sido relacionadas ao volume do HIP, de forma a aumentar a sensibilidade ao estresse em relação aos transtornos de humor e ansiedade (STRAWN, 2020). Alguns estudos apontam para a hiperativação do eixo HPA como um dos fatores do TAG, principalmente relacionado a desregulação da liberação de cortisol (HEK et al., 2013). É importante ressaltar ainda que diversos aspectos neurobiológicos, como a desregulação neurotransmissores e do eixo HPA, são compartilhados entre o TEPT e os transtornos de ansiedade (MARTIN et al., 2010).

1.3 RELAÇÃO ENTRE DIABETES *MELLITUS* E O TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO OU TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

Uma relação bidirecional tem sido descrita entre o DM e as psicopatologias, ou seja, estudos indicam que as alterações metabólicas causadas pelo DM podem facilitar o desenvolvimento das psicopatologias como Transtornos ansiedade e TEPT, bem como essas psicopatologias podem levar ao desenvolvimento do DM (MANSUR et al., 2014; RENN et al., 2011; ROY & LLOYD, 2012; ZANOVELI et al., 2016). Nesse sentido, Buchberger e colaboradores (2016) observaram que pacientes diabéticos apresentam um risco 32% maior em comparação à população não diabética, de desenvolver Transtornos de ansiedade. Esses dados reforçam os achados de Northam e colaboradores (2005), que demonstraram um risco de 2 a 3 vezes maior de jovens com DM1 desenvolverem psicopatologias. Essas prevalências também se aplicam ao DM2. Assim, em um estudo brasileiro que avaliou 996 pacientes com DM2, observou-se um aumento na prevalência de TAG em pessoas com DM2 (34,1%) em comparação a indivíduos não diabéticos (21,8%), além de uma maior prevalência de TP, 25,7% contra 12,3% (DOS SANTOS et al., 2014). Em outra pesquisa, realizada com 820 pacientes na Índia, foi descrita uma prevalência de ansiedade de 27,6% na população diabética, enquanto para pacientes não diabéticos a taxa foi de 12,7% (RAJPUT et al., 2016). Ainda mais, sabe-se que sintomas de ansiedade e depressão presentes em jovens com DM1 levam a uma piora do controle glicêmico, além de se observar taxas elevadas de hemoglobina glicosilada (HbA1c). Associado a estes prejuízos, os pacientes apresentam também dificuldade de autocuidado e gerenciamento, redução de comportamentos de enfrentamento da doenças, além de medo de hipoglicemia (RECHENBERG et al., 2017), agravando ainda mais quadros de ansiedade.

Em relação ao TEPT, essa dinâmica se repete podendo o transtorno ser tanto um fator de risco para o desenvolvimento do DM, quanto uma causa facilitadora do desenvolvimento do DM (VACCARINO et al., 2014; WEISBERG et al., 2002). Um estudo clínico encontrou uma prevalência de 6,1% de TEPT em pacientes diabéticos, enquanto a taxa em pacientes não diabéticos foi de 4,5% (BODEN, 2018). Em outro estudo conduzido com crianças (8-18 anos) diagnosticadas com DM1, foi relatado a presença de sintomas graves de TEPT em 18,5%, e sintomas moderados em 51,9%

(AUXÉMÉRY, 2012). Mais recentemente, Hoerster e colaboradores (2019) observaram uma relação entre o aumento de sintomas de TEPT e maior risco de desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares em militares veteranos dos Estados Unidos. Reforçando essa relação, um estudo de longo prazo (22 anos) demonstrou que mulheres com maiores escores em sintomas de TEPT apresentaram risco 2 vezes maior de desenvolver DM2 (ROBERTS et al., 2015). Assim, é importante destacar que os pacientes diabéticos são mais propensos do que os não diabéticos a sentir ansiedade e disfunção cognitiva (CHIEN; LIN, 2016; DOS SANTOS et al., 2014; JACOBSON et al., 2011; MOHEET et al., 2015; RAJPUT et al., 2016; WRIGHTEN et al., 2009).

O acúmulo de evidências em estudos pré-clínicos também indica que a encefalopatia diabética e as psicopatologias compartilham mecanismos neurobiológicos comuns (ASWAR et al., 2017; CHAVES et al., 2020; DA SILVA DIAS et al., 2016; DE MORAIS et al., 2014b; GUPTA et al., 2014; HAN et al., 2018; PRABHAKAR et al., 2015; REDIVO et al., 2016; WELLEN, 2005). Nesse sentido, animais diabéticos ou não diabéticos mostram que o aumento dos processos inflamatórios e relacionados ao estresse oxidativo, juntamente com uma desregulação dos sistemas de neurotransmissão em áreas cerebrais relacionadas às emoções, como o HIP e o CPF, estão presentes em animais com ansiedade aumentada e/ou comportamentos semelhantes aos depressivos (BUCHBERGER et al., 2016; CHAVES et al., 2020; DA SILVA DIAS et al., 2016; DE MORAIS et al., 2014b; MOULTON; PICKUP; ISMAIL, 2015; MURIACH et al., 2014; REDIVO et al., 2016; ZANOVELI et al., 2016).

Como essas áreas do cérebro estão altamente envolvidas no processamento da aprendizagem e da memória, não é surpreendente que os estudos clínicos demonstrem disfunções cognitivas em pacientes diabéticos, juntamente com atrofia cortical e HIP, e lesões da substância branca (BREMNER et al., 1995; SIMS-ROBINSON et al., 2010). Vários estudos pré-clínicos reforçam esses achados clínicos, demonstrando que animais com DM1 induzida experimentalmente apresentam dificuldades de aprendizagem e memória (CAI et al., 2011; CHATURVEDI et al., 2019; DAVARI et al., 2013; MARSHAD et al., 2018; MATSUNAGA et al., 2016; MIAO et al., 2015; TAKIZAWA et al., 2013). Recentemente, alguns trabalhos

mostraram em animais diabéticos um prejuízo também no processamento da memória do medo (DE SOUZA et al., 2019; GAMBETA et al., 2016; IKEDA et al., 2015; IKEDA, 2021; RIBEIRO et al., 2020; WU et al., 2019). Assim, nosso grupo mostrou que os animais diabéticos apresentam uma hiperconsolidação da memória do medo associada a uma generalização dessa resposta de medo quando são expostos em um ambiente neutro (não aversivo) (GAMBETA et al., 2016; DE SOUZA et al., 2019), além de apresentarem dificuldade em extinguir uma memória de medo (RIBEIRO et al., 2020). De particular interesse, foi demonstrado que a função glutamatérgica na amígdala e HIP está aumentada em animais diabéticos induzidos por STZ e este aumento pode estar relacionado à uma expressão mais pronunciada da memória de medo nos animais diabéticos (IKEDA et al., 2015, 2021).

1.4 O TRATAMENTO DO DIABETES *MELLITUS* ASSOCIADO COM PSICOPATOLOGIAS

A associação dessas doenças prejudica consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes, além de facilitar o surgimento de outras comorbidades. Nesse sentido, o tratamento do TEPT e Ansiedade associado ao DM1 é um grande desafio. Os medicamentos de primeira linha são os antidepressivos - como ISRSs e os tricíclicos (TCAs), que embora seguros e bem estabelecidos, apresentam também uma série de problemas para os pacientes com essas comorbidades. Uma das dificuldades é em relação ao tempo de latência de cerca de 3 a 4 semanas para que ocorra o efeito terapêutico. Além disso, esse tratamento apresenta um alto índice de pacientes resistentes e/ou refratários. Um outro fator que impacta também negativamente o uso dos antidepressivos, especialmente nos pacientes com DM, é que alguns desses medicamentos prejudicam o controle glicêmico, podendo levar a quadros de hiper ou hipoglicemia, o que é extremamente indesejado (KHOZA, 2011; LUSTMAN; CLOUSE, 2005; MANSUR et al., 2014; MARSHAD et al., 2018; MURIACH et al., 2014; ZANOVELI et al., 2016). Dessa forma, há a necessidade de estudos que busquem alternativas terapêuticas com menores riscos adversos e melhor eficácia para essas comorbidades.

A esse respeito, sabe-se que o anticonvulsivante pregabalina (PGB), um gabapentanóide estruturalmente análogo ao ácido gama-aminobutírico, usado como fármaco de primeira escolha para o tratamento da dor neuropática diabética, também tem sido empregado no tratamento de formas graves de TAG (BANIASADI et al., 2014; GREENBLATT, 2018; PANDE et al., 2003), mostrando resultados promissores para um reposicionamento farmacológico. Aqui, é importante ressaltar que a dor neuropática diabética afeta mais de 25% dos pacientes diabéticos (FINNERUP et al., 2015; TESFAYE et al., 2013) e que a PGB tem eficácia de amplo espectro no tratamento da dor neuropática diabética. Em relação ao TEPT, são limitados e inconclusivos os trabalhos clínicos e pré-clínicos que investigaram os efeitos da PGB (BANIASADI et al., 2014; ZOHAR et al., 2008). Ainda mais, encontramos apenas um único estudo que investigou as ações da PGB em um modelo de TEPT associado ao DM experimental (SALAT et al., 2016). A partir desta perspectiva, o tratamento de TEPT/ansiedade associado ao DM1 com PGB merece ser melhor investigado. Os mecanismos exatos de ação da PGB ainda não estão completamente elucidados; no entanto, estudos in vitro demonstram que a droga se liga à subunidade ($\alpha 2\text{-}\delta$) dos canais de cálcio dependentes de voltagem no sistema nervoso central (RICKELS et al., 2005), suprimindo assim a liberação de neurotransmissores excitatórios, incluindo o glutamato, substância P e noradrenalina (FIELD et al., 2001; PATEL et al., 2016; TAYLOR et al., 2007). Estudos mostram que a PGB atua como um modulador alostérico no caso de hiperexcitabilidade (ver Figura 2).

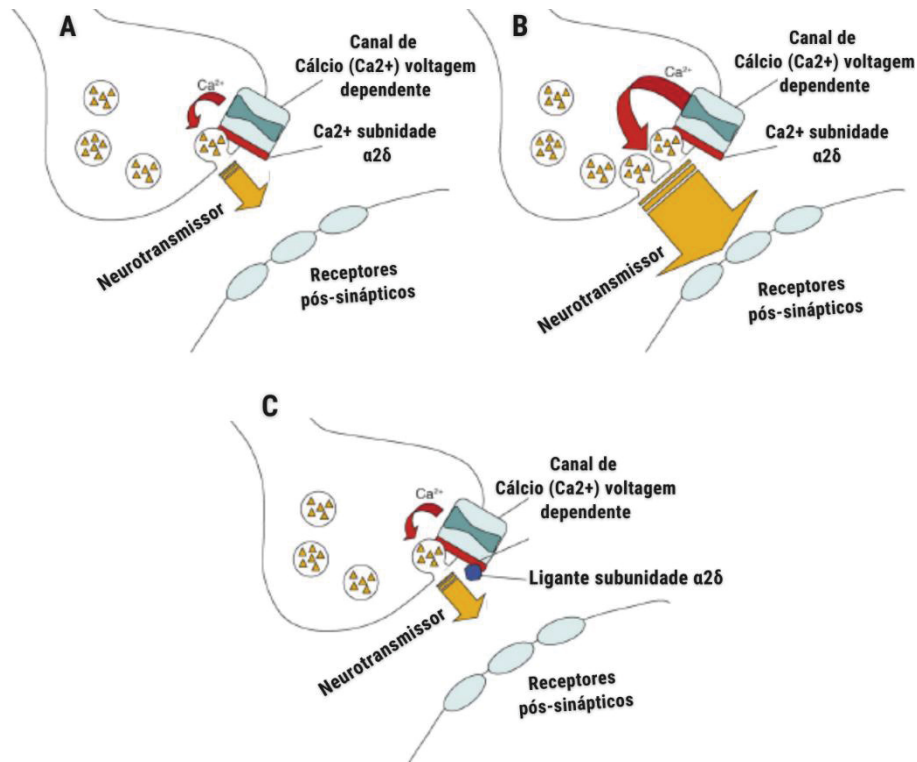


Fig. 2 - Modelo conceitual de ação do ligante $\alpha 2\delta$. (A) Durante a função neuronal normal, os canais pré-sinápticos de Ca^{2+} se abrem em resposta aos potenciais de ação, fornecendo Ca^{2+} influxo que dispara rapidamente a liberação do neurotransmissor sináptico (observe que os ligantes $\alpha 2\delta$ têm efeitos mínimos na função sináptica fisiológica). (B) Sob hiperexcitável ou em condições patológicas, o influxo excessivo de Ca^{2+} de aberturas sustentadas e rapidamente repetidas dos canais de Ca^{2+} aumenta significativamente a liberação de neurotransmissores. (C) Ligação de ligantes $\alpha 2\delta$ para a subunidade $\alpha 2\delta$ modula alostericamente os canais de Ca^{2+} para reduzir o influxo excessivo de Ca^{2+} , diminuindo efetivamente o número de vesículas sinápticas que se fundem com a membrana pré-sináptica. Isso restaura a liberação de neurotransmissores para níveis mais fisiológicos. Alternativamente e independente dos canais de Ca^{2+} (ou seja, subunidade $\alpha 1$) ou Ca^{2+} influxo, a subunidade $\alpha 2\delta$ ligada ao ligante pode interagir diretamente com proteínas sinápticas ou modular o tráfego de vesículas sinápticas para reduzir a exocitose do transmissor. Fonte: adaptado de Dooley et al. (2007).

Importante ressaltar que a subunidade $\alpha 2\delta$ é comum no sistema nervoso central, incluindo o CPF e o HIP. Ahmed e colaboradores (2019), mostraram em um modelo experimental de DM1, que o aumento na expressão das subunidades NMDAR e AMPAR no HIP pode estar relacionado a prejuízos na memória e no aprendizado. Assim, como esses neurotransmissores e regiões estão implicados na fisiopatologia do TEPT e da ansiedade (GERACIOTI, 2006; NAIR; AJIT, 2008; SOUTHWICK SM et al., 1993), a investigação do uso da PGB como farmacoterapia para o TEPT e a

ansiedade é de grande interesse e trabalhos atuais tem reforçado essa possibilidade. Em um estudo clínico, Baniasadi e colaboradores (2014) realizaram um tratamento com 300 mg/dia de PGB por um período de 6 semanas, juntamente aos tratamentos tradicionais com ISRSs, a pesquisa avaliou 37 homens adultos combatentes de guerra com TEPT, através do *Checklist–Military Version* (PCL-M). Os pesquisadores observaram que o tratamento com PGB reduziu a gravidade dos sintomas de re-experiência, evitação e excitação, relacionados ao TEPT. Em um relato de caso, Paslakis e colaboradores (2011) demonstraram que a PGB foi capaz de melhorar a condição de um paciente com TEPT resistente ao tratamento padrão. Zohar e colaboradores (2008), demonstraram em um modelo animal, a eficácia da PGB na redução dos sinais de ansiedade aguda, mas não sobre os comportamentos ligados ao TEPT. Ainda mais, estudos demonstraram que a PGB induz efeitos neuro protetores reduzindo o estresse oxidativo e interrompendo processos inflamatórios em diferentes situações patológicas, como sepse, neuropatia e retinopatia associada ao diabetes (ALI et al., 2019; ASLANKOC et al., 2018; CRUZ-ÁLVAREZ et al., 2018; DEMIR et al., 2021; SALAT et al., 2016). Aqui, cabe mencionar que animais com DM1 apresentam um aumento do estresse oxidativo e de fatores inflamatórios em regiões encefálicas como HIP e CPF (CHAVES et al., 2020; DE SOUZA et al., 2019; PEREIRA et al., 2018; PITOCCHO et al., 2010; RÉUS et al., 2019), reforçando que o tratamento com PGB possa ser interessante nessas condições.

Tendo em vista a gravidade da associação dessas doenças – DM1 e TEPT/Ansiedade, além de mecanismos neurobiológicos comuns, e o provável perfil neuroprotetor da PGB, nosso objetivo foi investigar o potencial terapêutico da PGB em facilitar a extinção de uma memória do medo e reduzir as respostas do tipo ansiedade. Primeiramente, avaliamos os efeitos (a curto e a longo prazo) do condicionamento aversivo contextual entre animais normoglicêmicos e com DM1 induzido experimentalmente sobre a extinção da memória de medo e sobre a ansiedade utilizando para isto os testes de condicionamento contextual do medo e labirinto em cruz elevado, respectivamente. Em seguida, avaliamos os efeitos de curto e longo prazo de uma única injeção de PGB (0, 30, 100 e 300 mg/kg, i.p.) sobre a aquisição da memória de extinção do medo e parâmetros de ansiedade em animais diabéticos. No próximo conjunto de experimentos, dois experimentos foram projetados

para investigar alguns possíveis mecanismos subjacentes ao suposto efeito neuroprotetor. No primeiro experimento, investigamos o perfil antioxidante da PGB além dos marcadores indiretos de estresse oxidativo: lipoperoxidação (LPO) e níveis de glutathiona reduzida (GSH) no CPF e HIP. No segundo experimento, considerando que a PGB também pode atuar diminuindo a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato, investigamos se o antagonista não competitivo de receptor NMDA ketamina (0, 5, 15, 25 mg/kg, i.p) seria capaz de induzir alterações comportamentais semelhantes àsquelas induzidas por PGB.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESE

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em animais com DM1 experimental os efeitos agudos e persistente do fármaco anticonvulsivante pregabalina sobre a aquisição da extinção da memória de medo e comportamentos de ansiedade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar comparativamente o impacto do condicionamento com choque sobre a aquisição da extinção e comportamento de ansiedade, em animais diabéticos e normoglicêmicos.
- Avaliar o efeito de curto e longo prazo de uma injeção de pregabalina sobre a aquisição da extinção do medo em animais com DM1 induzido;
- Avaliar o efeito de longo prazo de uma injeção de pregabalina sobre o comportamento de ansiedade em animais com DM1 induzido;
- Avaliar o efeito de uma injeção de pregabalina sobre parâmetros de estresse oxidativo nas regiões do córtex pré-frontal e hipocampo;
- Avaliar o efeito de curto e longo prazo de uma injeção de Ketamina sobre a aquisição da extinção do medo em animais com DM1 induzido;

- Avaliar o efeito de longo prazo de uma injeção de Ketamina sobre o comportamento de ansiedade em animais com DM1 induzido;

2.3 HIPÓTESE

Uma única injeção de pregabalina facilitaria a aquisição da memória de extinção do medo e reduziria o comportamento do tipo ansiedade em animais diabéticos. Mais ainda, esta injeção induziria efeitos neuroprotetores, tais como uma melhora de alguns parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em áreas encefálicas como o hipocampo e córtex pré-frontal. Por fim, a pregabalina atuaria inibindo a liberação de glutamato e, como consequência, uma menor ativação de receptor NMDA ocorreria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados para os experimentos ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, com peso entre 180g e 220g do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Esses animais foram mantidos em condições controladas, com temperatura de 22 ± 2 ° C, ciclo claro/escuro 12:12, com água e ração (Nuvilab CR1 - Nuvital Nutrientes S/A) *ad libitum*. Quatro ratos foram mantidos por caixa (60x25x15 cm), com maravalha trocada diariamente devido à poliúria induzida pela condição diabética. Todos os experimentos foram realizados de acordo com a Lei Brasileira de Ética e Cuidado Experimental com Animais (11.794/8 de outubro de 2008) e todos os procedimentos experimentais neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais no Setor de Ciências Biológicas da União Federal Universidade do Paraná (CEUA/ BIO-UFPR, nº 1311).

3.2 DROGAS

Foram utilizados os seguintes medicamentos: Estreptozotocina (STZ, Cayman Chemicals, EUA), Pregabalina (PGB, Pfizer, Brasil), Ketamina racêmica (KET, Syntec, Brasil). STZ (60 mg / kg) foi dissolvido de fresco em tampão de citrato de sódio (10 mM; pH 4,5) e administrado intraperitonealmente (i.p.) para induzir DM1. O tampão citrato foi administrado como controle para grupos normoglicêmicos (NGL). A PGB (0, 30, 100 e 300 mg / kg, i.p.) e a KET (0, 5, 15 e 25 mg / kg, i.p.) foram suspensas em solução salina estéril a 0,9% e preparadas imediatamente antes da administração, em um volume de 2 mL/kg de peso corporal. A dose de STZ foi escolhida com base em estudos anteriores do nosso grupo (de Moraes et al., 2014; Gambeta et al., 2016; Pereira et al., 2018; de Souza et al., 2019; Chaves et al., 2020). Em relação a PGB, a via de administração e as doses foram retiradas de estudos anteriores (Field et al., 2001; Zohar et al., 2008). O tempo de tratamento (1 h antes de ser exposto ao teste) foi definido com base nas características farmacocinéticas, ou seja, a PGB atinge seu pico de concentração plasmática após 1 hora de administração, a biodisponibilidade é de aproximadamente 90%, independentemente da dose e frequência de administração, e a meia-vida da molécula é de cerca de 6 h (BUOLI; CALDIROLI; SERATI, 2017).

3.3 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL DO TIPO 1 (DM1)

O DM1 foi induzido por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de STZ (60 mg/Kg) em ratos previamente em jejum por 12 h. Após o procedimento de indução, os animais foram mantidos em jejum por mais 3 horas para evitar competição entre STZ e glicose através do transportador GLUT2 na célula beta pancreática. A condição diabética foi confirmada 3 dias após a injeção de STZ pela aplicação de 5 µL de sangue da veia caudal em tiras de teste impregnadas com glicose oxidase (Accu-CheckActive™, Roche). Os animais normoglicêmicos receberam apenas tampão citrato (10mM, pH 4,5, volume equivalente). Apenas ratos com glicemia ≥ 250 mg/dL foram considerados diabéticos e mantidos no estudo (Cerca de 80% dos animais que passaram pelo processo de indução ao diabetes, atenderam ao critério da glicemia).

Os procedimentos foram feitos de acordo com dados prévios (de Moraes et al., 2014; Gambeta et al., 2016; Pereira et al., 2018; de Souza et al., 2019; Chaves et al., 2020).

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os testes comportamentais foram gravados em vídeo usando a câmera de ação Sony 4K para posterior análise. Os testes foram realizados durante a fase de luz (entre 7h00 e 12h00) em uma sala experimental com atenuação acústica mantida a 22 ± 2 °C. Os ratos foram aclimatados à sala experimental por pelo menos 30min antes de cada teste. Após cada sessão experimental, o aparato foi limpo com solução de etanol a 20%.

3.4.1 Protocolo de condicionamento ao medo contextual

Para a investigação de comportamentos relacionados à memória de medo, foi utilizado o modelo de condicionamento contextual do medo, que tem sido uma ferramenta importante para a compreensão do TEPT e do TAG (RIBEIRO et al., 2020; VANELZAKKER et al., 2014). A câmara utilizada para o condicionamento consiste em uma caixa (26 x 31,5 x 21 cm; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Três lados da caixa são feitos de aço e o quarto é feito de acrílico. O piso da caixa possui finas barras de metal conectadas a um estimulador elétrico que pode liberar choques elétricos nas patas dos animais com intensidade e tempo previamente estabelecidos.

O comportamento de congelamento foi utilizado como índice de comportamento aversivo e foi medido em segundos (s) e expresso como porcentagem do tempo total da sessão. Foi considerado comportamento de congelamento quando o animal apresentava postura de completa imobilidade, exceto para movimentos respiratórios (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969). As seguintes etapas foram realizadas:

- Sessão de condicionamento de medo contextual (CMC): Esta sessão foi conduzida expondo o animal à um contexto denominado de estímulo condicionado (EC) por 3 min. Após 60 s eles receberam 3 choques elétricos nas patas (1,0 mA, com duração de 3s), que foi o estímulo incondicionado (EI). Os choques tiveram um

intervalo de 30s entre eles. Após, os animais foram mantidos por mais 60s na caixa antes de serem devolvidos à sua gaiola.

- Sessão de treino de extinção (TrExt): os animais permaneceram no mesmo contexto (EC) por 20 min, sem qualquer apresentação de EI. O tempo de congelamento dos animais foi avaliado em segundos, dividido em 4 blocos de 5min cada.

- Teste de extinção 1 (Ext 1): O teste foi realizado 24 h após a sessão TrExt. Os animais permaneceram no contexto (EC) por 3min sem a apresentação do EI e foi quantificado o tempo(s) que o animal permaneceu em congelamento.

- Teste de extinção 2 (Ext 2): O teste foi realizado 7 dias após o teste Ext 1. Os animais permaneceram no contexto (EC) por 3min sem a apresentação do EI. Foi quantificado o tempo(s) que o animal permaneceu no congelamento.

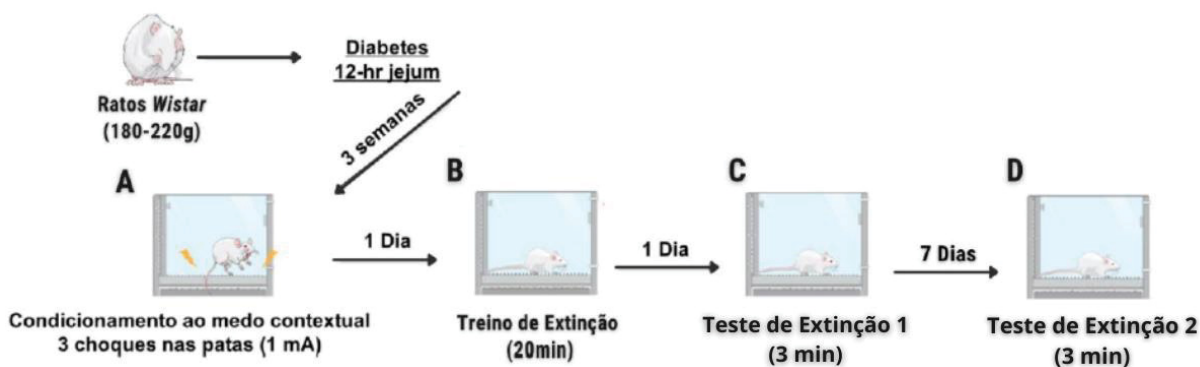


Fig. 3 - Representação do protocolo de condicionamento de medo ao contexto. Momento “A” representa o condicionamento (CMC), momento “B” representa o treino de extinção (TrExt), momento “C” representa o teste de extinção 1 (Ext 1) e “D” representa o teste de extinção 2 (Ext 2).

3.4.2 Teste de campo aberto (TCA)

O TCA foi realizado para avaliar a atividade locomotora/exploratória dos animais de acordo com Chaves e colaboradores (2020). Assim, os animais foram colocados no centro do aparelho de campo aberto que consistia em uma arena retangular de madeira (40 × 50 × 63 cm) com o piso dividido em 9 retângulos situados

em uma sala isolada e iluminada por uma lâmpada incandescente (60 lx no nível do chão da arena). O número de retângulos cruzados com as quatro patas foi avaliado em um intervalo de 5min. A sessão TCA foi gravada em vídeo usando uma Sony Action Cam 4K para análise posterior. Após cada sessão, o campo aberto foi limpo com solução de água e etanol a 10%.

3.4.3 Teste labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE é um teste para a avaliação do comportamento do tipo ansiedade em modelo animal de ratos, validado por Pelow e colaboradores (1985). Os animais foram expostos ao LCE imediatamente após o teste Ext 2. O aparelho consistia em uma plataforma de madeira com 4 braços (2 abertos e 2 fechados), elevados a 50 cm do chão. Havia uma área central de 10 cm² fazendo o cruzamento entre todos os braços. O teste foi iniciado colocando um rato na plataforma central do labirinto, de frente para um braço fechado e a sessão teve duração de 5min. A porcentagem de entradas de braços abertos (quantidade total de entradas/número de entradas de braços abertos × 100) e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos serviram como medida de ansiedade. A frequência de entradas nos braços fechados foi usada como índice de atividade locomotora (Cruz et al., 1994). Além disso, foi adicionada uma medida etológica, o afundamento da cabeça, que consiste no movimento exploratório da cabeça/ombros sobre os lados dos braços abertos e para baixo em direção ao chão (Silva e Brandão, 2000).

3.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.5.1 Ensaio de difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Este ensaio foi realizado de acordo com estudo anterior (Pereira et al., 2018) para avaliar o potencial antioxidante da PGB. É usado para avaliar a atividade de eliminação de radicais livres dos antioxidantes. Baseia-se no princípio de que o DPPH,

ao aceitar um átomo de hidrogênio de uma molécula necrófaga (como antioxidante), é reduzido, e a cor roxa da solução torna-se amarela, concomitante à diminuição da absorvância (Mishra et al., 2012). A técnica consistiu em medir a reatividade da PGB em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30, 100 µg/mL) misturado à solução metanólica de DPPH (10 µg/mL). Solução de ácido ascórbico (50 µg/mL) foi usada como controle positivo e água destilada como controle negativo. A absorvância foi medida a 517 nm usando um leitor de microplaca multimodal (Bio Tek Synergy HT, Bio Tek Instruments, Highland Park, VT, EUA).

3.5.2 Amostras do cérebro

Os animais foram sacrificados por decapitação e o CPF e HIP foram dissecados. Após a dissecação, as áreas cerebrais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até análise posterior. As amostras de cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato pH6,5 (1:10). O homogenato foi usado para determinação dos níveis reduzidos de glutathiona (GSH). Para quantificar a taxa de peroxidação lipídica (LPO), uma parte do homogenato foi centrifugado a 9000g em uma micro centrífuga refrigerada de alta velocidade (VS-15000 CFNII, *Vision Scientific*, Daejeon, Coreia do Sul) por 20 min e o sobrenadante foi usado para medir o LPO.

3.5.3 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram medidos pelo método descrito por Sedlak & Lindsay, (1968) e de acordo com Pereira et al. (2018). Assim, 100µL do homogenato foram misturados com ácido tricloroacético (80µL de 12,5% de pureza) e centrifugados a 6.000 rotações por minuto (VS-15000 CFNII, *Vision Scientific*, Daejeon, Coreia do Sul) por 15 min a 4°C. Em seguida, 20 µL do sobrenadante límpido foram misturados com 280 µL de tampão Tris (0,4M, pH 8,9) e 5µL de 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico) em metanol. A absorvância da solução de reação foi medida a 415nm em um leitor de microplacas (BioTek Synergy HT, *BioTek Instruments*, Highland Park, VT, EUA). Os

valores individuais foram interpolados em uma curva padrão de GSH para verificar a linearidade da reação. Os resultados são expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido.

3.5.4 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO)

Os níveis de LPO foram medidos pelo método FOX-2 descrito por Jiang e colaboradores (1991), e de acordo com Pereira e colaboradores (2018). Para isso, 100 μL de sobrenadante de CPF e HIP foram homogeneizados em 100 μL de metanol, agitados em vórtex e centrifugados a 5000rpm (VS-15000 CFNII, Vision Scientific, Daejeon, Coreia do Sul) por 5min a 4°C. Em seguida, 100 μL do sobrenadante foram adicionados a 900 μL de reagente FOX2 (reagente de Wolff; BHT 4 mM, FeSO_4 250 mM, H_2SO_4 250 mM e laranja xilenol 100 mM). A absorbância foi medida a 560nm em um leitor de microplacas (BioTek Synergy HT, BioTek Instruments, Highland Park, VT, EUA). Os resultados são expressos como [hidroperóxidos].

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.6.1 Experimento 1

Este experimento foi realizado para avaliar o impacto do CMC na memória de extinção do medo (curto e longo prazo) e nas respostas tardias do tipo ansiedade em animais diabéticos (DBT) e normoglicêmicos (NGL). Para isso, os animais foram divididos em grupos expostos ou não expostos ao CMC, condicionados (Cond) e não condicionados (N.Cond), respectivamente. Assim, foram formados quatro grupos: DBT/Cond ($n = 10$), DBT/N.Cond ($n = 9$), NGL/Cond ($n = 10$) e NGL/N.Cond ($n = 11$).

No 24º dia após a indução do diabetes, parte dos animais foi submetida ao protocolo do CMC e parte deles, o grupo N.Cond, foi exposto ao mesmo contexto, mas não recebeu choques nas patas (EI). No dia 25, todos os animais foram submetidos à sessão de TrExt. Vinte e quatro horas após, foram avaliados no mesmo contexto (Ext). Sete dias após, foi realizado o teste Ext 2, seguido do LCE, no dia 33. Em seguida, o peso corporal e a glicemia foram verificados mais uma vez.

3.6.2 Experimento 2

Neste experimento, objetivamos avaliar se uma única injeção de PGB 1h antes do TrExt de memória do medo facilitaria essa aquisição, e se está injeção induziria um efeito de longo prazo na memória de extinção e interromperia as respostas tipo ansiedade tardias dos animais DBT. Assim, cinco grupos - todos submetidos a CMC - tratados com veículo (VEI) ou pregabalina (PGB) foram formados: NGL/VEI (n=7), DBT/VEI (n=7), DBT/PGB 30 mg/kg (n=10), DBT/PGB 100 mg/kg (n=10) e DBT/PGB 300 mg/Kg (n=10).

No 24º dia após a indução do diabetes, os animais foram submetidos ao protocolo do CMC. No dia 25, 1 hora antes da sessão TrExt, todos os animais receberam injeção de PGB (doses diferentes) ou VEI. Vinte e quatro horas depois, foram avaliados no mesmo contexto (Ext 1) e sete dias após foi realizado o teste Ext 2 seguido do LCE (dia 33). Em seguida, foram verificados o peso corporal e a glicemia.

3.6.3 Experimento 3

Tendo em vista que doses maiores de PGB podem causar efeito sedativo, este experimento foi realizado para investigar se durante a sessão TrExt (ocorrida no Experimento 2) os animais tratados com PGB estavam sob efeito sedativo. Assim, cinco grupos - todos sujeitos ao CMC- tratados com veículo (VEI) ou pregabalina (PGB) foram formados: NGL/VEI (n=6), DBT/VEI (n=6), DBT/PGB 30 mg/kg (n=6), DBT/PGB 100 mg/kg (n=6) e DBT/PGB 300 mg/kg (n=7).

No 24º dia após a indução do diabetes, os animais foram submetidos ao protocolo do CMC. No dia seguinte, todos os animais receberam injeção de PGB (doses diferentes) ou VEI e 1 hora antes de serem submetidos ao TCA.

3.6.4 Experimento 4

Este experimento in vitro foi realizado para avaliar o potencial antioxidante da PGB, de acordo com o método de Chen et al. (2018) com modificações. O ensaio foi conduzido conforme descrito na seção 3.5.1 dos Material e Métodos.

3.6.5 Experimento 5

Este experimento foi realizado para avaliar se a PGB em sua menor dose (30 mg/kg) e maior dose (300 mg/kg) apresentaria perfil neuroprotetor em animais com DM1, e se poderia induzir uma melhora nos parâmetros indiretos relacionados ao aumento do estresse oxidativo no HIP e CPF. Primeiramente, no 24º dia após a indução do diabetes, os animais foram condicionados ao contexto com 3 choques nas patas (EI), e no dia seguinte (25º dia) receberam uma única injeção de VEI ou PGB 1 hora antes da sessão TrEx. Os animais foram sacrificados imediatamente após esta sessão de extinção e tiveram seus HIP e CPF dissecados para análise dos níveis de GSH e LPO nessas áreas cerebrais. Para fins comparativos, essas análises também foram realizadas no HIP e no CPF de animais NGL. A amostra n para cada 4 grupos formados para análise no HIP e CPF foram: Para HIP - NGL/VEI (n = 6), DBT/VEI (n = 5), DBT/PGB 30 mg/kg (n=7) e DBT/PGB 300 mg/kg (n=7). Para CPF - NGL/VEI (n=6), DBT/VEI (n=5), DBT/PGB 30 mg/kg (n=7) e DBT/PGB 300 mg/kg (n=7).

3.6.6 Experimento 6

Considerando que a PGB pode estabilizar o disparo de neurotransmissores excitatórios como o glutamato, o objetivo foi avaliar se a administração aguda do antagonista não competitivo do receptor NMDA ketamina (KET) 1 hora antes da sessão TrExt, induziria efeitos como os provocados pela PGB na extinção da memória do medo (curto e longo prazo), bem como nas respostas tardias relacionadas ao comportamento tipo ansiedade. Assim, cinco grupos - todos submetidos ao CMC - foram formados: NGL/VEI (n=8), DBT/VEI (n=8), DBT/KET 5 mg/kg (n = 9), DBT/KET 15 mg/kg (n = 9) e DBT/KET 25 mg/kg (n=9).

No 24º dia após a indução do diabetes, os animais foram submetidos ao protocolo do CMC. No dia 25, uma hora antes da sessão de treinamento de extinção, todos os animais receberam injeção de KET (doses diferentes) ou VEI. Vinte e quatro horas depois, foram avaliados no mesmo contexto (Ex) e sete dias após foi realizado

o teste Ext 2 seguido do LCE (dia 33). Em seguida, foram verificados o peso corporal e a glicemia.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi inicialmente utilizado para garantir que os dados atendiam aos critérios para realização dos 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 realizada análise de variância (ANOVA) de duas vias, considerando como variáveis independentes a condição (DBT/NGL) e o procedimento experimental (Condicionado/Não-Condicionado), e o tempo de congelamento como variável dependente. Para os experimentos 2 e 5, os testes de treinamento de extinção (TrExt) foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (tratamento e repetição-tempo), enquanto os outros testes foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, considerando apenas os tratamentos. Quando apropriado, foi utilizado o teste de *post-hoc* de Bonferroni para realização de múltiplas comparações. Para todos os experimentos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados no programa *GraphPad Prism* (versão 8, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DE CURTO E LONGO PRAZO DO CMC NA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DO MEDO EM ANIMAIS NGL E DBT

A ANOVA de duas vias mostrou uma diferença significativa quando os dados da sessão TrExt foram analisados (Fig.4A) [diferença no fator tempo: $F(1, 72) = 158,2$, $p < 0,05$; fator grupos: $F(3, 72) = 176,8$, $p < 0,05$], e interação entre essas variáveis [$F(3, 72) = 47,33$, $p < 0,05$]. O procedimento de CMC aumentou o tempo de congelamento dos animais NGL e DBT quando comparados com seus respectivos grupos N.Cond ($p < 0,05$). O tempo de congelamento foi reduzido em ambos os grupos Cond - DBT e

NGL - ao comparar o 4º bloco com o 1º bloco ($p < 0,05$). No entanto, o tempo de congelamento foi ainda mais pronunciado nos animais DBT (grupo Cond), quando comparado com NGL (grupo Cond) no 4º bloco ($p < 0,05$).

Na análise do tempo de congelamento durante o teste Ext (Fig.4B), a ANOVA de duas vias mostrou diferença estatisticamente significativa para a condição dos animais (NGL e DBT) [$F(1, 36) = 100,1$, $p < 0,05$] bem como para o procedimento [$F(1, 36) = 205,8$, $p < 0,05$], e interação entre essas variáveis [$F(1, 36) = 94,27$, $p > 0,05$]. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou um aumento no tempo de congelamento entre NGL e DBT (grupo Cond) quando comparado ao seu respectivo grupo N.Cond ($p < 0,05$), sendo este tempo de congelamento maior no DBT (grupo Cond) em relação ao NGL (Cond grupo) ($p < 0,05$).

Na Fig.4C, quanto os dados do teste de Ext 2 foram analisados, a ANOVA de duas vias mostrou diferença estatisticamente significativa para a condição dos animais (NGL e DBT) [$F(1, 36) = 43,79$, $p < 0,05$], para o procedimento [$F(1, 36) = 41,47$, $p < 0,05$], bem como uma interação entre essas variáveis [$F(1, 36) = 41,23$, $p > 0,05$]. O teste de *post-hoc* Bonferroni mostrou um aumento no tempo de congelamento entre NGL e DBT (grupo Cond) quando comparado ao seu respectivo grupo N.Cond ($p < 0,05$), sendo este tempo de congelamento maior no DBT (grupo Cond) em relação ao NGL (grupo Cond) ($p < 0,05$).

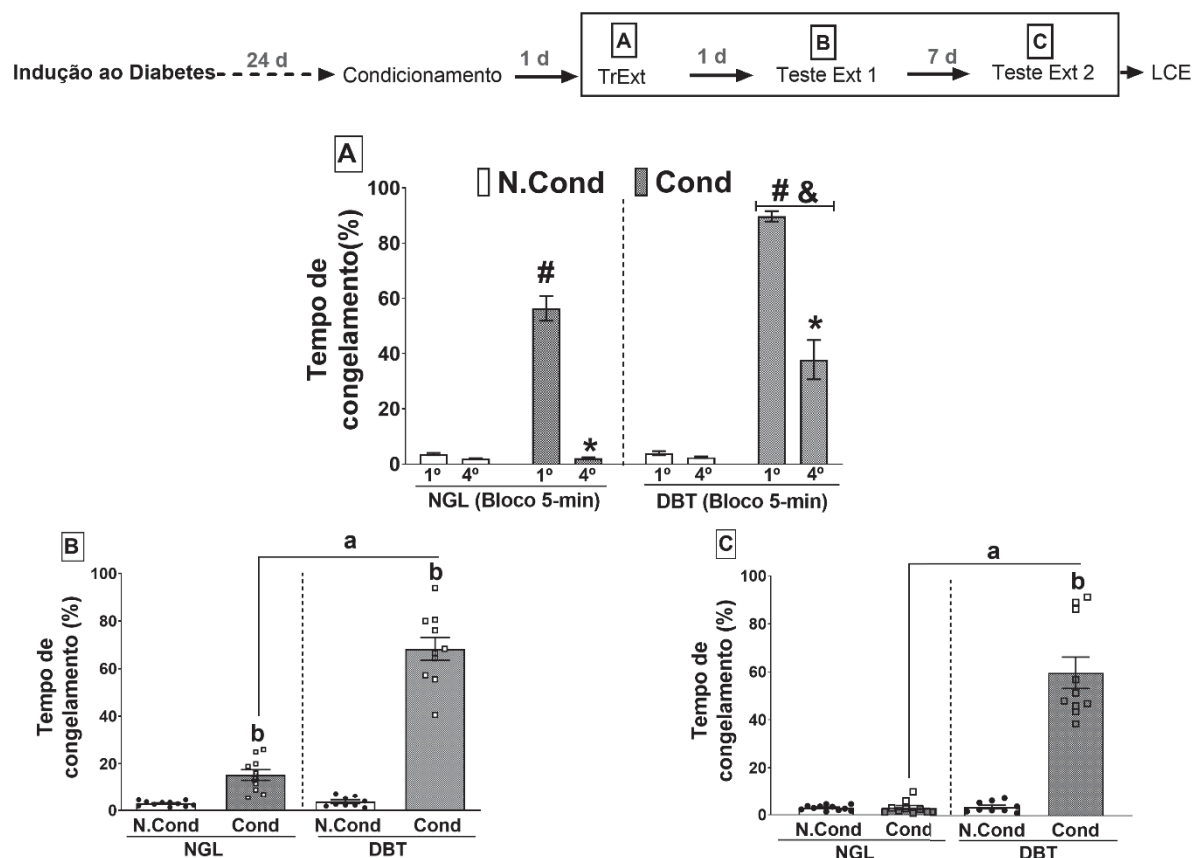


Fig. 4 - Efeitos do condicionamento em animais NGL e DBT na memória de extinção do medo. O esquema acima dos gráficos representa o desenho experimental usado neste experimento. (A) Animais com DBT condicionado apresentaram comportamento de congelamento mais pronunciado no treinamento Extinção; (B) Animais com DBT condicionados apresentaram dificuldade em extinguir a memória do medo; (C) Animais DBT/Cond apresentam alto percentual de congelamento por tempo prolongado. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 9-11$ / grupo). * $p < 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo do 1º bloco; # $p < 0,05$ em relação aos seus respectivos blocos (grupo N.Cond); & $p < 0,05$ em relação aos seus respectivos blocos (NGL - Cond); ap $< 0,05$ quando comparado ao grupo NGL (Cond); bp $< 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo N.Cond.

4.2 EFEITO CONDICIONAMENTO AO CONTEXTO NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE EM ANIMAIS DBT E NGL

Na análise do comportamento do tipo ansiedade (Fig.5 A-D), a ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa para a condição dos animais (NGL e DBT) quando o fator tempo [$F(1, 36) = 43,06$, $p < 0,05$; Fig.5A] e número de entradas [$F(1, 36) = 38,96$, $p < 0,05$; Fig.5B] nos braços abertos foram avaliados, bem como o afundamento da cabeça [$F(1, 36) = 11,97$, $p < 0,05$; Fig.5C] e entradas nos braços fechados [$F(1, 36) = 69,54$, $p < 0,05$; Fig.5D]. Para a variável de procedimento, ANOVA mostrou diferença apenas quando as entradas nos braços abertos [$F(1, 36) = 29,95$, $p < 0,05$; Fig.5B] foi analisada e a interação entre os dois fatores (condição e procedimento) quando o tempo nos braços abertos foi avaliado [$F(1, 36) = 5,09$, $p < 0,05$; Fig.5D].

O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que entre os animais NGL, em comparação ao grupo N.Cond, o grupo Cond apresentou uma diminuição no tempo de permanência nos braços abertos e no número de entradas nestes mesmos braços ($p < 0,05$), indicativo de comportamento tipo ansiedade. Comparando NGL e DBT (grupos Cond), os animais DBT exibiram uma diminuição mais pronunciada no tempo gasto nos braços abertos e no número de entradas nesses braços ($p < 0,05$), sugerindo um efeito tipo ansiedade mais expressivo. Quando avaliado o afundamento da cabeça, o teste de Bonferroni mostrou diminuição desse comportamento nos animais DBT (grupos Cond e N.Cond) em relação ao NGL (N.Cond) ($p < 0,05$). Uma diferença significativa ($p < 0,05$) nas entradas nos braços fechados foi observada nos animais DBT, em comparação aos animais NGL, independente dos procedimentos ($p < 0,05$).

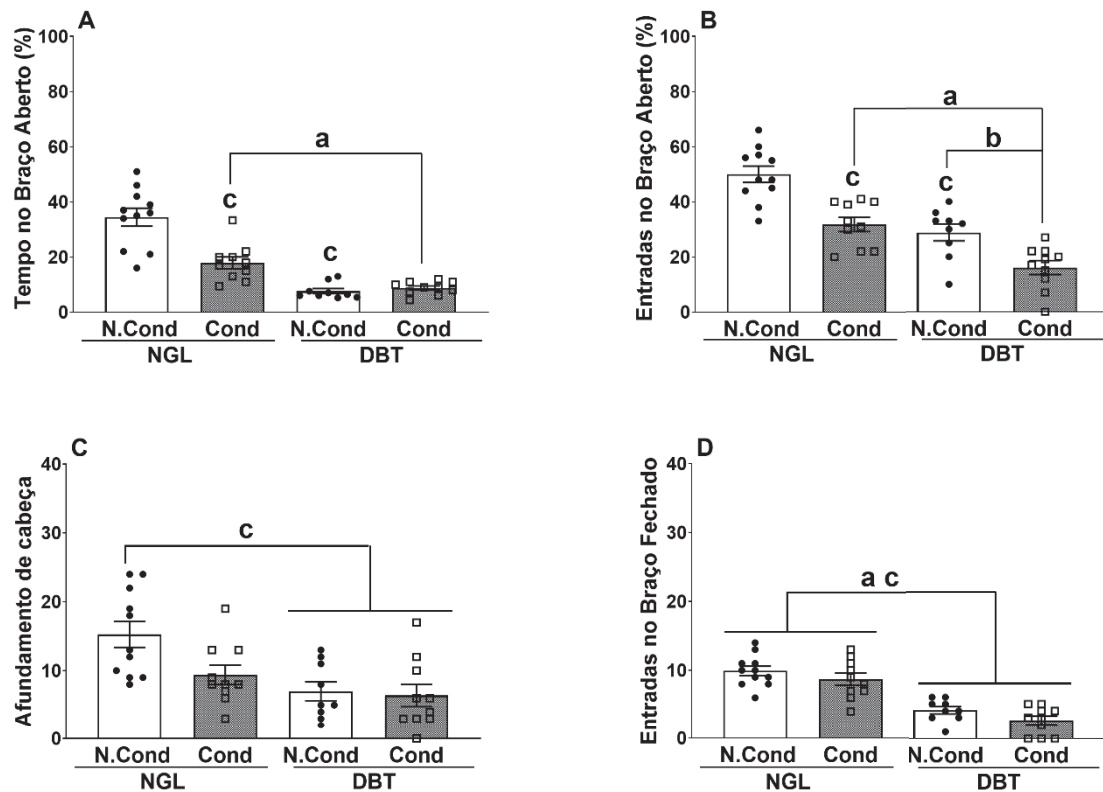
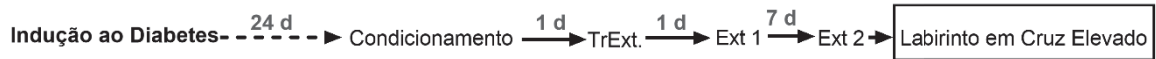


Fig. 5 - Efeito do condicionamento ao contexto no comportamento tipo ansiedade em animais DBT e NGL. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE) – Fig. A (% do tempo nos braços abertos), B (% das entradas nos braços abertos), C (frequência de queda da cabeça) e D (número de entradas nos braços fechados). Os valores são expressos com média $\pm$ EPM ($n = 9-11$ / grupo). $a_{p<0,05}$ quando comparado ao grupo NGL (Cond); $b_{p<0,05}$ quando comparado ao seu respectivo grupo N.Cond e $c_{p<0,05}$ quando comparado ao NGL (grupo N.Cond).

Quando o ganho de peso e a glicemia foram analisados, a ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre os grupos (NGL N.Cond, NGL Cond, DBT N.Cond e DBT Cond) [ganho de peso: $F(3, 36) = 149,8$, $p < 0,05$; glicemia: $F(3, 36) = 203,1$, $p < 0,05$]. O teste de Bonferroni mostrou que os animais DBT (Cond e N.Cond) apresentaram diminuição no ganho de peso em relação ao NGL (Cond e N.Cond) ($p < 0,05$). O mesmo foi observado em relação à glicemia, ou seja, os animais DBT (Cond e N.Cond) apresentaram aumento da glicemia em relação ao NGL (Cond e N.Cond) ($p < 0,05$) (tabela 1).

Tabela 1. Efeito da condição e do procedimento experimental sobre os parâmetros de glicemia e peso dos animais.

Grupo	Glicemia (mg/dL)	Ganho de peso (g)
NGL/Cond	117,30 ± 2,92	182,10 ± 6,63
NGL/N.Cond	110,50 ± 2,71	162,00 ± 11,39
DBT/Cond	466,80 ± 19,76*	7,60 ± 3,55*
DBT/N.Cond	498,10 ± 24,08*	8,33 ± 5,53*

Grupo normoglicêmico condicionado (NGL/Cond); grupo normoglicêmico não condicionado (NGL/N.Cond); grupo diabético condicionado (DBT/Cond); grupo diabético não condicionado (DBT/N.Cond). Resultados foram expressos como a média ± EPM; $n = 7-10$; * $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo controle.

4.3 EFEITOS DE CURTO E LONGO PRAZO DE UMA ÚNICA INJEÇÃO DE PGB NA AQUISIÇÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DO MEDO EM ANIMAIS DBT

Como pode ser visto na Fig. 6 quando analisados os dados de treinamento de extinção (Fig. 6A), a ANOVA de duas vias mostrou diferença estatística entre o tempo [$F(1, 72) = 96,36$, $p < 0,05$] e interação entre essas variáveis [$F(4, 72) = 8,949$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* de Bonferroni mostrou uma redução significativa no congelamento entre todos os 1º blocos de PGB em comparação com DBT/VEI 1º bloco ($p < 0,05$). Os

grupos NGL, DBT e PGB 300 apresentaram diferença significativa em relação aos respectivos grupos do 1º bloco ($p < 0,05$).

No Ext (Fig. 6B) e no teste de Ext 2 (Fig. 6C), a ANOVA de uma via mostrou, respectivamente, efeito significativo do tratamento entre os grupos DBT [$F(4, 36) = 24,36$; $p < 0,05$] e [$F(4, 36) = 59,83$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* de Bonferroni mostrou no Ext (Fig. 6B) que todos os grupos tratados com PGB apresentaram redução significativa no congelamento ($p < 0,05$), assim como no teste Ext 2 (Fig. 6C), mostrando que o efeito da PGB foi de longa duração. Além disso, a injeção de PGB 300 normalizou o comportamento de congelamento, não diferindo estatisticamente do grupo NGL/VEI ($p < 0,05$).

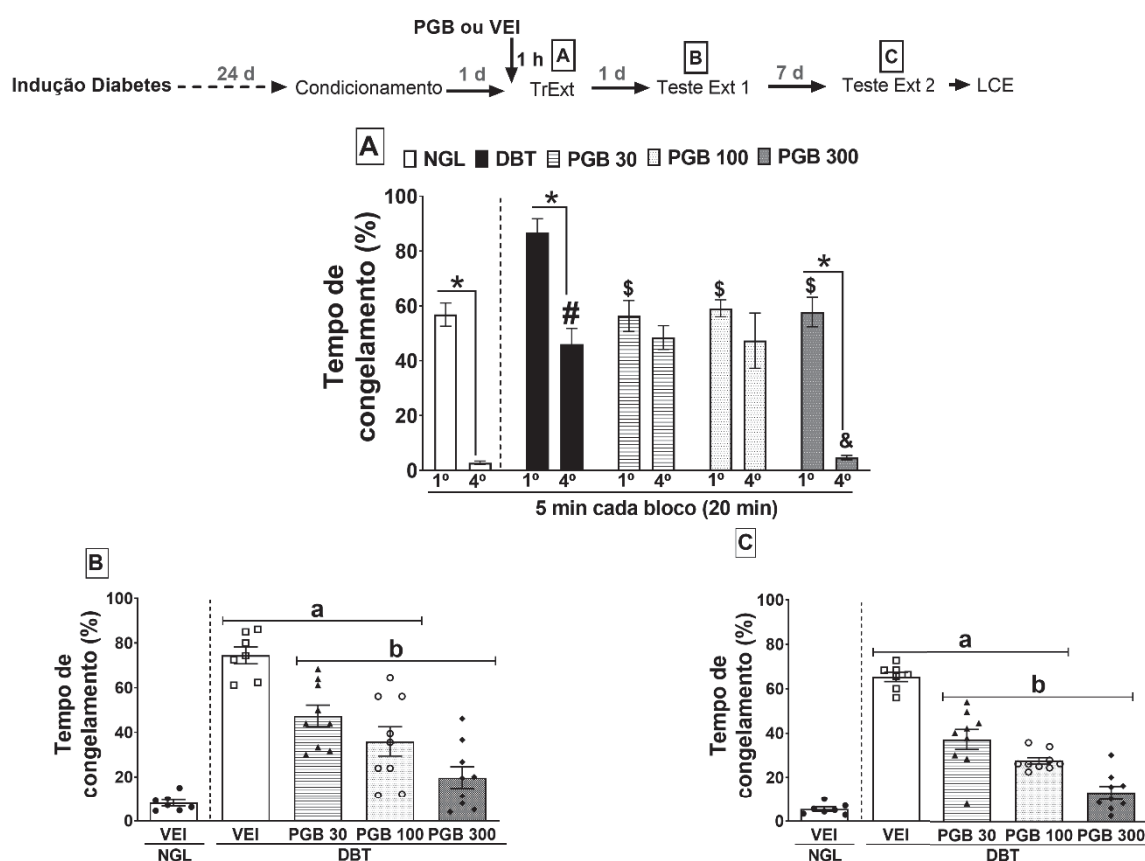


Fig. 6 - Efeitos de uma única injeção de PGB em animais DBT na aquisição da memória de extinção do medo. O esquema acima dos gráficos representa o desenho experimental usado neste experimento. (A) PGB diminuiu o comportamento de congelamento aumentado de animais DBT durante o treinamento de extinção; (B) PGB facilitou a extinção da memória do medo em animais DBT; (C) PGB teve um efeito prolongado na redução da memória do medo em animais DBT. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7-9$ /grupo). * $p < 0,05$

quando comparado ao seu respectivo grupo do 1º bloco; # $p<0,05$ em comparação com o grupo do 4º bloco (NGL); \$ $p<0,05$ comparado ao grupo do 1º bloco (DBT); & $p<0,05$ em comparação com o grupo do 4º bloco (DBT); ap $<0,05$ em comparação com NGL/VEI; bp $<0,05$ em relação ao DBT/VEI.

4.4 EFEITO DE UMA ÚNICA INJEÇÃO DE PGB NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE EM ANIMAIS DBT

No labirinto em cruz elevado, a ANOVA de uma via mostrou que o tratamento foi capaz de alterar a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [$F(4, 36) = 5,322$, $p<0,05$; Fig. 7A], a porcentagem de entradas nos braços abertos [$F(4, 36) = 11,89$, $p<0,05$; Fig. 7B], frequência de afundamento da cabeça [$F(4, 36) = 5,661$, $p<0,05$; Fig. 7D], mas não alterou o número total de entradas nos braços fechados [$F(4, 36) = 3,283$, $p>0,05$; Fig. 7C]. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que os animais DBT tratados com PGB 300 apresentaram redução significativa do comportamento do tipo ansiedade quando comparados ao DBT/VEI durante o tempo e entradas nos braços abertos e frequência de afundamento da cabeça ($p<0,05$). Além disso, em relação à ansiedade, os grupos tratados com PGB 30 e/ou PGB 100 apresentaram aumento no percentual de tempo de permanência e entradas nos braços abertos ($p<0,05$).

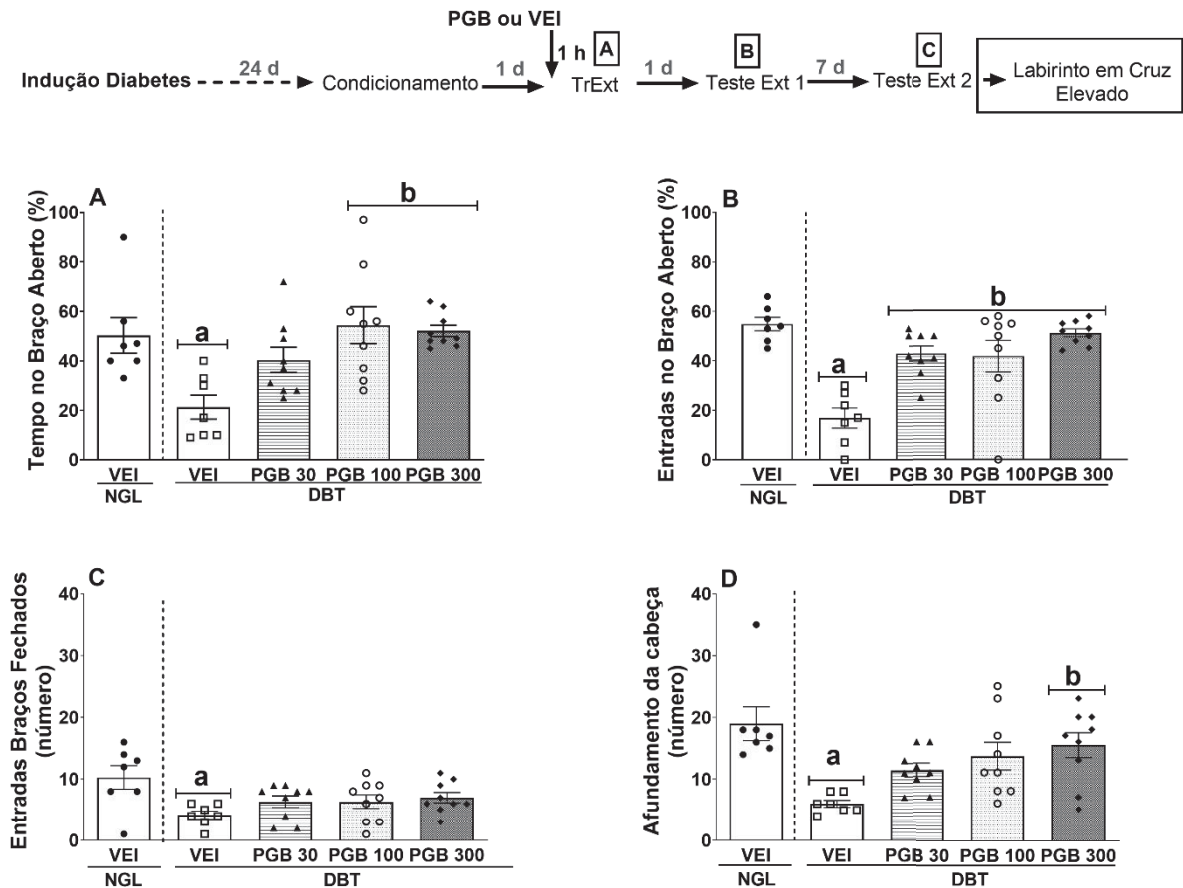


Fig. 7 - Efeito de uma única injeção de PGB sobre parâmetros de ansiedade tardia em animais DBT. Teste de labirinto em cruz elevado (LCE) - Painéis A (% do tempo nos braços abertos), B (% das entradas nos braços abertos), C (número de entradas nos braços fechados) e D (frequência de afundamento da cabeça). Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7-9/\text{grupo}$). $a_{p < 0,05}$ em comparação com NGL/VEI; $b_{p < 0,05}$ em relação ao DBT/VEI.

Em relação aos parâmetros de glicemia e peso dos animais diabéticos tratados com PGB, a ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre os tratamentos quando o ganho de peso [$F(4, 36) = 119,5$, $p < 0,05$] e glicose no sangue [$F(4, 36) = 56,92$, $p < 0,05$] foi analisado. Quando comparado ao grupo NGL. Esses parâmetros não foram alterados por nenhum tratamento empregado neste estudo. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que todos os animais DBT independente do tratamento apresentaram redução significativa no ganho de peso ($p < 0,05$) e aumento da glicemia em relação aos animais NGL ($p < 0,05$) (ver Tabela 2 abaixo).

Tabela 2: Efeito da pregabalina sobre os parâmetros de glicemia e peso dos animais diabéticos.

Grupo	Glicemia (mg/dL)	Ganho de peso (g)
NGL/VEI	113,51 $\pm$ 2,93	181,00 $\pm$ 8,11
DBT/VEI	451,10 $\pm$ 13,78*	23,62 $\pm$ 5,03*
DBT/PGB 30	503,33 $\pm$ 16,62*	13,80 $\pm$ 4,49*
DBT/PGB 100	474,90 $\pm$ 27,29*	16,63 $\pm$ 5,08*
DBT/PGB 300	432,62 $\pm$ 21,36*	8,81 $\pm$ 5,71*

Grupo normoglicêmico veículo (NGL/VEI); grupo diabético veículo (DBT/VEI); grupos tratados com pregabalina na dose de 30 mg/kg (PGB 30), na dose de 100 mg/kg (PGB 100) e na dose de 300 mg/kg (PGB 300). Resultados foram expressos como a média $\pm$ EPM; $n = 7-10$, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NGL/VEI.

4.5 EFEITO DE UMA ÚNICA INJEÇÃO DE PGB SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA DE ANIMAIS DBT SUBMETIDOS AO TCA

Conforme mostrado na Fig. 8, o teste ANOVA de uma via mostrou diferença entre os grupos NGL e DBT no número de cruzamentos em campo aberto [$F(4, 26) = 30,67$; $p < 0,05$]. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que os animais DBT tratados com PGB 300 apresentaram diminuição significativa no número de cruzamentos em relação aos grupos DBT/VEI ($p < 0,05$) e NGL/VEI ($p < 0,05$).

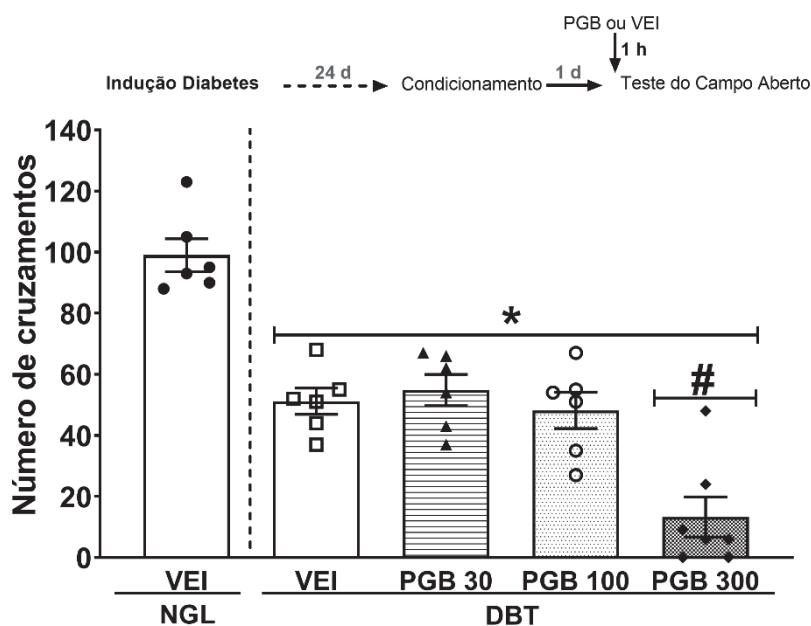


Fig. 8 - Efeito de uma única injeção de PGB em animais DBT, sobre a atividade locomotora (número de cruzamentos no TCA). O esquema acima dos gráficos representa o desenho experimental usado neste experimento. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7-10/\text{grupo}$) * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NGL/VEI; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo DBT/VEI.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PGB: ENSAIO DPPH.

Conforme mostrado na Fig. 9, o teste ANOVA de uma via mostrou diferença entre os grupos no DPPH [$F(6, 12) = 206,8$, $p < 0,05$]. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que o ácido ascórbico e a PGB (menores concentrações) foram capazes de induzir uma atividade antioxidante ($p < 0,05$).

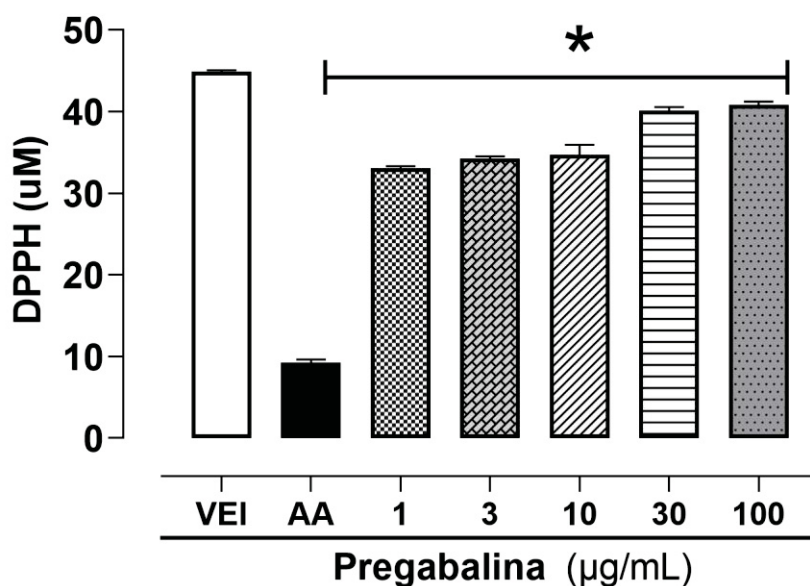


Fig. 9 - Avaliação da atividade antioxidante da PGB: Ensaio DPPH – pregabalina, ácido ascórbico (AA; controle positivo) e água (controle negativo) na atividade de eliminação de radicais livres. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM; * $p < 0,05$ em comparação com VEI.

4.7 EFEITOS DE UMA ÚNICA INJEÇÃO DE PGB SOBRE PARÂMETROS RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO, AVALIADOS NO HIP E CPF DE ANIMAIS DBT

Conforme mostrado na Figura 10, o teste ANOVA de uma via mostrou diferença entre os tratamentos na expressão de LPO no CPF [$F(3, 23) = 8,631$, $p < 0,05$] e no HIP [$F(3, 23) = 8,544$, $p < 0,05$], além da diferença entre os grupos GSH no CPF [$F(3, 23) = 6,811$, $p < 0,05$] e HIP [$F(3, 23) = 4,062$, $p < 0,05$]. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que os animais DBT/VEI apresentaram aumento significativo de LPO (CPF e HIP) e diminuição de GSH (CPF e HIP), quando comparados com NGL/VEI ($p < 0,05$). Enquanto os animais tratados com PGB 300 mostraram uma redução significativa em

LPO no CPF e HIP em comparação com o grupo DBT/VEI ($p < 0,05$), um aumento significativo de GSH no CPF também foi observado quando PGB 30 e 300 foram administradas.

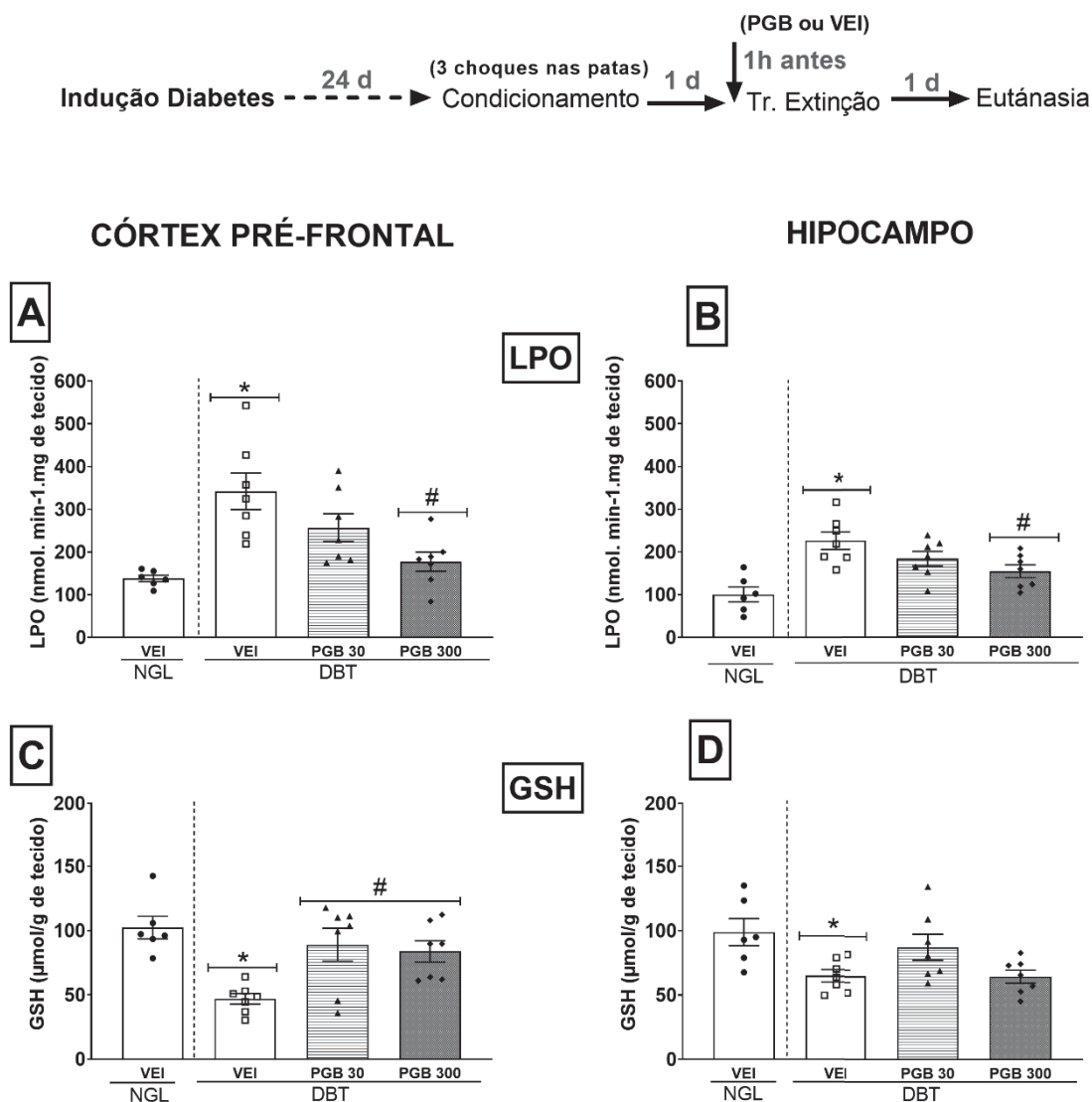


Fig. 10 - Efeito antioxidante de injeção aguda de PGB. efeito da PGB (30 e 300 mg/kg) ou veículo (VEI) em animais normoglicêmicos (NGL) ou diabéticos (DBT) nos níveis de peroxidação lipídica (LPO, painel A - córtex pré-frontal e painel B - hipocampo) e níveis reduzidos de glutathiona (GSH, painel C - córtex pré-frontal e painel D - hipocampo). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM; ($n = 6-7$). * $p < 0,05$ em comparação com NGL/VEI; # $p < 0,05$ em comparação com DBT/VEI.

4.8 EFEITOS DE CURTO E LONGO PRAZO DE UMA ÚNICA INJEÇÃO DE KET NA AQUISIÇÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DO MEDO EM ANIMAIS DBT

Conforme mostrado na Fig. 11A ao analisar os dados de TrExt, a ANOVA de duas vias mostrou diferença estatística entre os grupos [$F(4, 74) = 18,77, p < 0,05$]. A análise *post-hoc* de Bonferroni mostrou uma diferença significativa entre o grupo do 1º bloco KET (15 e 25) em comparação com o grupo de 1º bloco DBT/VEI ($p < 0,05$). Os grupos DBT e NGL/VEI apresentaram diferença significativa em relação aos respectivos grupos do 1º bloco ($p < 0,05$), e DBT/VEI é significativamente diferente de NGL/VEI em relação ao 1º e 4º blocos ($p < 0,05$).

No entanto, no teste Ext 1 (Fig. 11B) e Ext 2 (Fig. 11C) a ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo do tratamento entre os grupos DBT [$F(3, 31) = 0,7980, p > 0,05$; Fig. 11B] e [$F(3, 31) = 0,4593, p > 0,05$; Fig. 11C]. A análise *post-hoc* de Bonferroni não mostrou diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo DBT/VEI ($p > 0,05$), tanto no teste Ext 1 (Fig. 11B) quanto no teste Ext 2 (Fig. 11C).

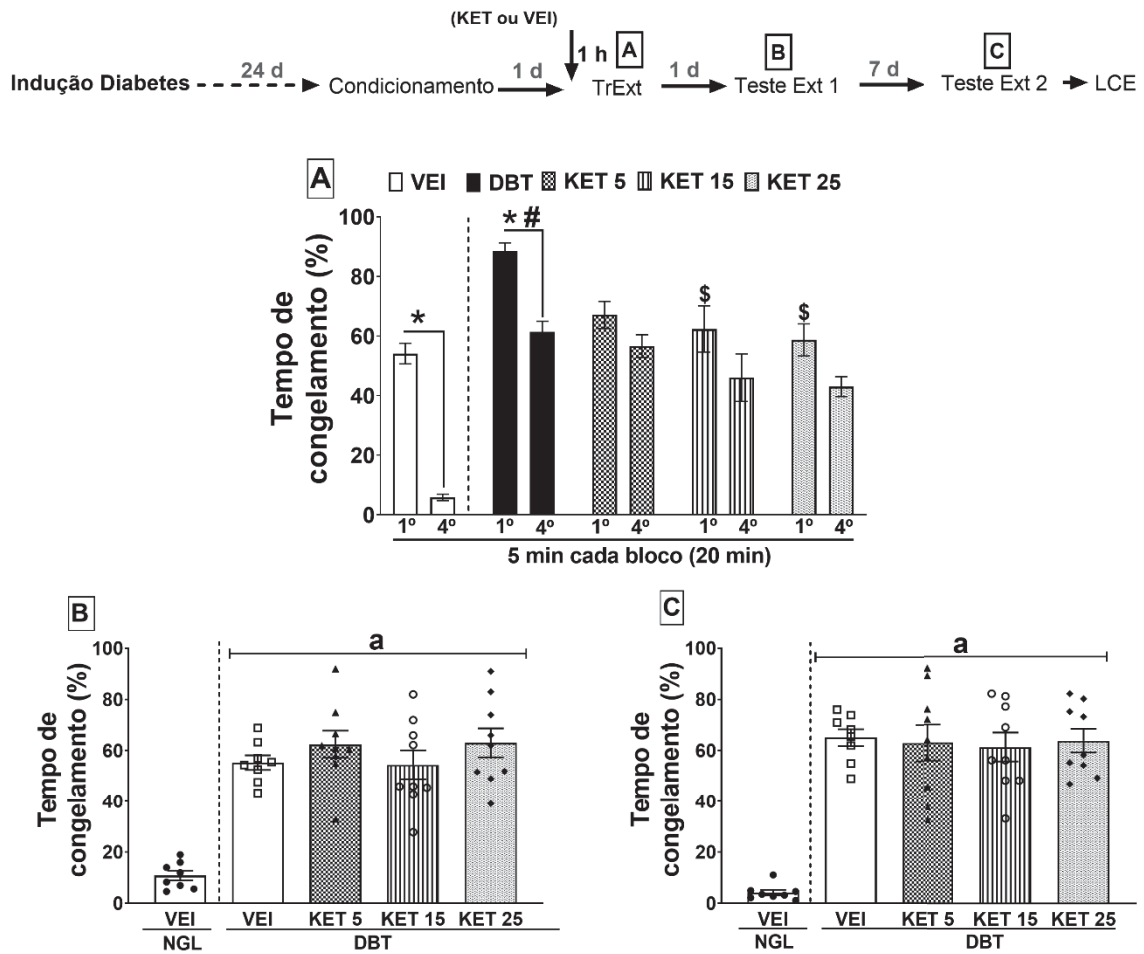


Fig. 11 - Efeito de uma única injeção de KET em animais diabéticos na aquisição de memória de extinção de medo. O esquema acima dos gráficos representa o desenho experimental usado neste experimento. (A) KET não alterou o comportamento de congelamento aumentado de animais DBT durante o treinamento de extinção; (B) KET não alterou a extinção prejudicada da memória do medo em animais DBT; (C) KET não alterou a memória do medo em animais DBT. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 8-9$ /grupo). * $p < 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo do 1º bloco; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo 1º e 4º bloco (NGL); \$ $p < 0,05$ comparado ao grupo do 1º bloco (DBT); a $p < 0,05$ em comparação com NGL (VEI).

4.9 EFEITO DA KETAMINA SOBRE COMPORTAMENTOS DO TIPO ANSIEDADE EM ANIMAIS DBT

Ao avaliar o comportamento tipo ansiedade (Fig. 12), a ANOVA de uma via mostrou que em relação ao grupo DBT, o tratamento com KET foi incapaz de alterar a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [$F(3, 31) = 0,8871$; $p > 0,05$; Fig. 12A], a porcentagem de entradas nos braços abertos [$F(3, 31) = 1,751$, $p > 0,05$; Fig. 12B], número total de entradas nos braços fechados [$F(4, 38) = 11,69$, $p > 0,05$; Fig. 12C] e a frequência de afundamento da cabeça [$F(3, 31) = 1,179$, $p > 0,05$; Fig. 12D]. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que os animais dos grupos DBT apresentaram diminuição em todos os parâmetros avaliados, em relação ao NGL/VEI ($p < 0,05$)

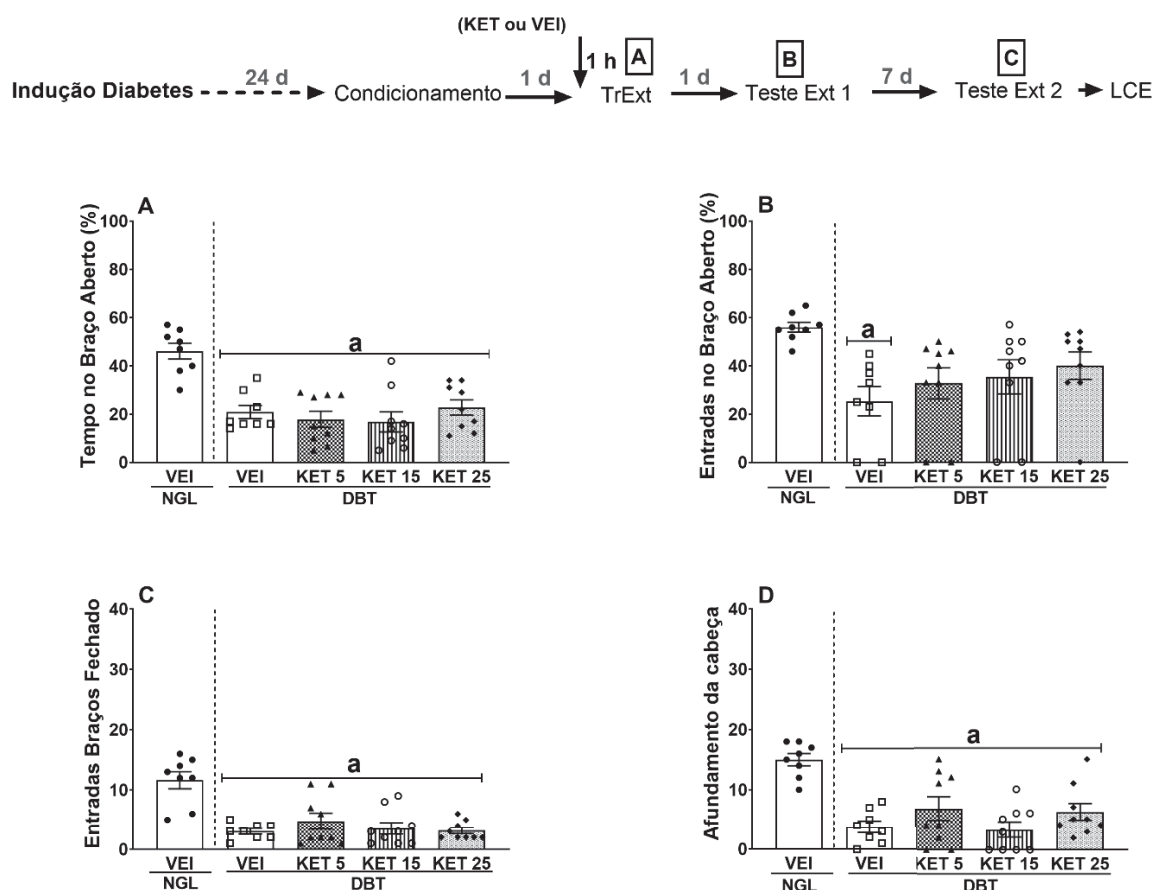


Fig. 12 - Efeito de uma única injeção de KET sobre parâmetros de ansiedade tardia em animais DBT. Teste de labirinto em cruz elevado (LCE) - Painéis A (% do tempo nos braços abertos), B (% das entradas nos braços abertos), C (número de entradas nos braços fechados) e D (frequência de afundamento da cabeça). Os valores são expressos como média ± EPM (n = 8-9/grupo). $a_{p < 0,05}$ quando comparado ao grupo NGL/VEI.

Em relação a glicemia e o ganho de peso, o teste de ANOVA de uma via mostrou, respectivamente, diferenças significativas entre os grupos [$F(3, 36) = 203,1$; $p < 0,05$] e [$F(4, 38) = 65,15$; $p < 0,05$]. Segundo a análise *post-hoc* de Bonferroni não houve diferença significativa entre os animais diabéticos tratados com KET, em relação a glicemia e ganho de peso, comparados ao grupo DBT/VEI ($p > 0,05$). No entanto, todos os grupos DBT apresentaram aumento na glicemia e redução no ganho de peso, em comparação ao grupo NGL/VEI ($p < 0,05$) (tabela 3).

Tabela 3: Efeito da ketamina sobre os parâmetros de glicemia e peso dos animais diabéticos

Grupo	Glicemia (mg/dL)	Ganho de peso (g)
NGL/VEI	111,40 ± 2,77	163,32 ± 9,40
DBT/VEI	486,53 ± 19,11*	23,00 ± 5,31*
DBT/KET 5	504,60 ± 22,98*	26,11 ± 5,37*
DBT/KET 15	500,74 ± 23,54*	17,44 ± 4,17*
DBT/KET 25	444,81 ± 22,31*	19,33 ± 4,95*

Grupo normoglicêmico veículo (NGL/VEI); grupo diabético veículo (DBT/VEI); grupos tratados com ketamina na dose de 5 mg/kg (KET 5), na dose de 15 mg/kg (KET 15) e na dose de 25 mg/kg (KET 25). Resultados foram expressos como a média ± EPM; n = 8-10, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NGL/VEI.

5 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo são que os animais com DM1 apresentam um comprometimento persistente na extinção de uma memória de medo associada a uma sensibilização tardia ao medo, demonstrada por um aumento na resposta tipo ansiedade. Curiosamente, uma única injeção de PGB nesses animais diabéticos 1h antes do TrExt, foi capaz de facilitar a memória de extinção do medo e aliviar o comportamento tipo ansiedade. Esses efeitos foram observados em períodos de curta e longa duração (9 dias depois). Além disso, nossos dados indicam que os efeitos benéficos induzidos pela PGB podem estar acompanhados, pelo menos parcialmente, à sua atividade antioxidante demonstrada no HIP e no CPF.

Conforme já observado (AMO-SHIINOKI et al., 2021; DE SOUZA et al., 2019; IKEDA et al., 2015; RIBEIRO et al., 2020), nossos dados confirmaram que os animais DM1 apresentam maior resposta ao medo e dificuldade em extinguir a memória do medo quando comparados aos animais NGL (Fig. 4), indicando uma hiperconsolidação dessa memória de medo. No entanto, este é o primeiro estudo a mostrar a persistência dessa memória de medo em animais com DM1 quando reexpostos no mesmo contexto após 1 semana (Fig. 4C), indicando quão fortes ou disfuncionais são os mecanismos associados a este tipo de aprendizagem/memória. Pensando em termos clínicos, nossos resultados vão no mesmo sentido das evidências clínicas que apontam para uma maior prevalência de TEPT em adultos com DM1 (RENNA et al., 2016) e também uma associação positiva entre o trauma de guerra e um aumento na incidência de DM1 em crianças e adolescentes (ZUNG et al., 2012).

Em relação à ansiedade, os animais DM1 (não expostos ao CMC) apresentaram uma resposta ansiosa mais exacerbada (diminuição do tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos e diminuição da frequência de afundamento da cabeça) quando comparados ao NGL animais - condicionados ou não. Ainda mais, demonstramos aqui que a condição diabética *per se* parece produzir um elevado efeito no comportamento do tipo ansiedade, independente do condicionamento (Fig. 5A-D). Esses achados reforçam trabalhos anteriores que mostram que esses animais DBT apresentam um comportamento tipo ansiedade mais

pronunciado quando comparados aos animais NGL (DE MORAIS et al., 2014a; DE SOUZA et al., 2019; GAMBETA et al., 2016; REBOLLEDO et al., 2016), além de estar de acordo com dados clínicos que mostram que indivíduos com DM1 apresentam maior prevalência de desenvolvimento de transtornos de ansiedade (SMITH et al., 2013).

Com relação aos animais NGL, mesmo depois de adquirirem memória de extinção, eles exibiram um comportamento de tipo ansiedade tardia mais pronunciado do que os animais NGL não condicionados (Fig. 5A-D). Este resultado corrobora outras evidências que mostram que o estresse prévio pode induzir uma resposta relacionada a uma sensibilização ao medo ou mesmo a uma generalização da memória do medo, que depende de vários aspectos, como fatores externos, incluindo o tipo de estímulo aversivo e a intensidade deste estímulo, se o estresse ocorreu no início da vida, bem como a relação de elementos particulares do ambiente externo (ASOK et al., 2019; KORTE & BOER, 2003).

O próximo bloco de experimentos foi desenhado com base em duas premissas principais:

1. Ratos DM1 têm uma hiperconsolidação da memória de medo, além de demonstrar persistência dessa memória e comportamento de ansiedade e
2. o uso de PGB é aprovado para dor neuropática diabética, e seu uso tem sido empregado com sucesso para o tratamento de estados mais graves de transtornos de ansiedade e TEPT (GARAKANI et al., 2020; PANDE et al., 2003; POHL et al., 2005).

Os resultados revelaram que todas as doses de PGB foram capazes de diminuir o tempo de congelamento, quando submetidos aos testes Ext e REM (Fig. 6B-C), indicando que o fármaco facilitou a aquisição da memória extinção, sendo este efeito duradouro. Curiosamente, a maior dose de PGB (300 mg/kg) foi capaz de restaurar o comportamento do animal diabético, equiparando-o aos animais NGL (Fig. 6B-C). Em relação ao efeito tardio na resposta do tipo ansiedade, a PGB (duas doses mais altas) restaurou o comportamento do tipo ansiedade mais expressivo dos animais com DM1, enquanto apenas a dose mais alta (300 mg/kg) foi capaz de induzir uma melhora significativa no comportamento de afundamento da cabeça (Fig. 7D). Ou

seja, o efeito benéfico da PGB sobre a memória do medo parece não estar dissociado de seu efeito do tipo ansiolítico. Embora tenhamos encontrado um efeito sedativo causado pela dose de 300 mg/kg durante o TrExt, conforme demonstrado no TCA (Fig. 8), os animais mostraram efeitos significativos e consistentes na memória de extinção de medo (Fig. 6B-C) e respostas de ansiedade semelhantes (Fig. 7A-D) em testes subsequentes nos quais não estavam sob o efeito agudo de PGB, uma vez que a meia-vida da PGB é de cerca de 6h (BUOLI et al., 2017). Assim, esse efeito sedativo durante a sessão de TrExt não prejudicou a aquisição da memória de extinção do medo e o efeito tipo ansiolítico. Além disso, doses menores de PGB (30 mg/kg e 100 mg/kg) também mostraram efeitos na redução do congelamento e na melhora do comportamento tipo ansiedade, sem induzir efeito sedativo (Fig. 8).

Nesse ponto, poderíamos citar como limitação do presente estudo o fato de que os melhores efeitos foram alcançados após a administração da maior dose de PGB. Nesse sentido, sabe-se que a dosagem de eficácia clínica da PGB no TAG, por exemplo, é de 150-600 mg/dia, e os efeitos colaterais frequentemente relatados (sonolência e tontura) são dose-dependentes (BALDWIN et al., 2015). Em um ensaio duplo-cego controlado por placebo, os eventos adversos durante o tratamento com PGB foram considerados leves e moderados (MANN et al., 2014). No entanto, em um recente estudo de meta-análise, Onakpoya e colaboradores (2019), demonstraram que apesar de ser eficaz no tratamento de doenças como a neuropatia periférica diabética e a neuralgia pós-herpética, muitos pacientes interrompem o tratamento devido aos efeitos adversos. Alguns estudos relataram casos de aumento de insuficiência cardíaca, edema periférico e abuso da substância (Dependência). Todos esses efeitos parecem estar relacionados ao uso crônico de PGB (ALDEMIR et al., 2015; DOBREA et al., 2012; GAHR et al., 2013; GROSSHANS et al., 2010; ROBERT et al., 2008).

De acordo com Buoli e colaboradores (2017), em doses mais elevadas de PGB, ocorre um aumento da enzima responsável pela síntese de GABA (L-Glutâmico ácido descarboxilase), mesmo que a PGB não se ligue diretamente aos receptores GABA-A ou GABA-B (BUOLI et al., 2017). Embora se ligue preferencialmente à subunidade $\alpha 2\delta$ -1, a PGB também tem afinidade para $\alpha 2\delta$ -2, que no cérebro se concentra no cerebelo e se correlaciona parcialmente com os neurônios GABAérgicos

(BARCLAY et al., 2001; LI et al., 2011). Assim, os efeitos adversos observados nas doses mais altas de PGB podem estar relacionados preferencialmente aos efeitos inespecíficos da droga em outros locais de ação. Aqui, se pensarmos em termos translacionais, é importante ter em mente qual seria o risco e benefício do tratamento para o paciente, e essa resposta deve estar ligada ao tipo de tratamento e à posologia utilizada. Por exemplo, no presente estudo, apesar de a dose mais eficaz ser a maior, que poderia causar uma série de efeitos indesejáveis em um tratamento contínuo, a aplicação de PGB foi única e possivelmente não associada às consequências de efeitos adversos.

As diretrizes internacionais consideram a PGB juntamente com os ISRSs (paroxetina, sertralina, escitalopram) e ISRNs, como opções de primeira linha para o tratamento de TAG (BUOLI et al., 2017; GREENBLATT, 2018; PANDE et al., 2003). Além disso, em estudos abertos e randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo demonstraram a eficácia da PGB, apresentando em muitos desses estudos um efeito superior aos antidepressivos e benzodiazepínicos, dependendo do parâmetro avaliado (para uma revisão, ver (BALDWIN et al., 2015; BUOLI et al., 2017; FRAMPTON, 2014). Em relação ao tratamento de TEPT com PGB, embora os trabalhos ainda sejam limitados, em um estudo clínico retrospectivo de 290 membros do serviço de queimados foi revelado que PGB ou gabapentina não afetou o desenvolvimento de TEPT (FOWLER et al., 2012). No entanto, em um ensaio clínico randomizado, Baniasadi e colaboradores (2014) demonstraram que a PGB foi capaz de reduzir os sintomas de re-experiência, evitação e excitação, relacionados ao TEPT em um grupo de 18 pacientes do sexo masculino (não diabéticos) que receberam 300 mg/dia de PGB por um período de 6 semanas.

Em estudos pré-clínicos, fica evidente que dependendo do protocolo experimental, como a condição do animal, o tipo de estresse, as doses utilizadas e o tempo de tratamento, os resultados são bastante diferentes. Zohar e colaboradores (2008) mostraram, em animais não diabéticos, que a PGB (nas mesmas doses usadas no presente estudo) induziu efeitos benéficos de curto prazo sobre a ansiedade e comportamentos relacionados ao TEPT; mas não a longo prazo (30 dias após o tratamento). Valdivieso e colaboradores (2018), também não encontraram efeitos significativos após o tratamento com PGB no comportamento do tipo ansiedade de

animais não diabéticos previamente estressados (contenção e choque de cauda); no entanto, eles usaram uma dose menor (10 mg/kg), e a PGB foi administrada 24h antes da exposição anterior do animal ao evento estressor ou por 10 dias após o último evento de estresse de TEPT.

De particular interesse para o presente estudo, as respostas comportamentais exacerbadas observadas em animais com DM1 tem sido relacionada com a encefalopatia diabética (AHMED et al., 2019; ASWAR et al., 2017; CHAVES et al., 2020; DA SILVA DIAS et al., 2016; DE MORAIS et al., 2014a; GAMBETA et al., 2016; GUPTA; RADHAKRISHNAN; KURHE, 2014; PRABHAKAR et al., 2015). Assim, nos experimentos seguintes (Experimentos 4, 5 e 6) foi investigado se os efeitos benéficos sobre as respostas comportamentais, em um curto e longo prazo, induzida por uma única injeção de PGB estariam relacionados com o seu perfil neuroprotetor. No experimento 4, nossos dados demonstram que a PGB apresentou uma atividade antioxidante, mostrando um nível de absorbância inferior em comparação com um controle negativo (água), principalmente nas concentrações mais baixas (1, 3 e 10 μ L; Fig. 9). Ainda mais, a PGB foi capaz de reduzir os níveis aumentados de LPO de animais com DM1 (HIP e CPF - dose mais alta) e aumentar os níveis reduzidos de GSH (CPF) (Fig. 10). Essas mudanças nos níveis reduzidos de GSH e LPO nessas regiões do cérebro de animais DM1 foram demonstradas anteriormente (PITOCCO et al., 2010; PEREIRA et al., 2018; DE SOUZA et al., 2019; RÉUS et al., 2019; CHAVES et al., 2020). Em relação à LPO, sabe-se que níveis elevados de LPO são atribuídos ao aumento de ROS (SIBA et al., 2017); além disso, afeta a integridade celular apenas quando os mecanismos antioxidantes não são mais capazes de lidar com a geração de radicais livres (ANWER et al., 2012). O GSH é o principal antioxidante do cérebro (KANAZAWA et al., 2016) e protege o sistema celular contra os efeitos tóxicos do LPO. Desse modo, segundo Sharma e colaboradores (2016), esse declínio no nível de GSH em animais com DM1 pode ser devido à geração excessiva de radicais livres, exposição a altos níveis de glicose. Além disso, foi proposto que antioxidantes compostos podem desempenhar um papel importante na melhoria das desregulações aqui relatadas, especialmente em regiões do cérebro como CPF e HIP, ligadas ao processamento de aprendizagem e memória (BANAGOZAR MOHAMMADI et al., 2019; DE SOUZA et al., 2019; VENTURINI et al., 2010).

Reforçando nossos dados após o tratamento com PGB, já observamos neste modelo animal de DM que um tratamento prolongado com outro composto antioxidante, a vitamina E ou ácido gálico, melhorou o processamento disfuncional da memória de medo e respostas do tipo ansiedade, juntamente com uma melhora nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo nessas mesmas áreas do cérebro (DE MORAIS et al., 2014; DE SOUZA et al., 2019). Essa ação antioxidante da PGB já foi demonstrada (SAŁAT et al., 2016; DEMIR et al., 2021). Por exemplo, Demir e colaboradores (2021), demonstraram em ratos com DM1 que um tratamento prolongado com PGB (50 mg/kg/dia por 8 semanas) foi capaz de reduzir a LPO, melhorar a capacidade antioxidante com aumento significativo da superóxido dismutase e proteger as células contra apoptose. Em outro estudo, Sałat e colaboradores (2016), avaliaram os efeitos do tratamento com PGB (10 mg/kg) em camundongos DBT e relataram um aumento em importantes reguladores do estresse oxidativo, como o fator nuclear (derivado de eritroide 2) relacionado ao fator 2. É importante ressaltar que, no presente estudo, a menor dose de PGB, que foi a pior dose capaz de alterar os parâmetros comportamentais avaliados no presente estudo, foi capaz de aumentar o nível reduzido de GSH no CPF. Assim, podemos especular que a ação antioxidante pode não ser o único mecanismo responsável pela ação benéfica da PGB sobre a memória de medo e resposta tipo ansiedade nesses animais DM1. Nesse sentido, não é surpreendente que a PGB induza efeitos neuroprotetores por meio de outros mecanismos, incluindo uma ação anti-inflamatória ao interromper a expressão de vários marcadores inflamatórios, além da diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios, como glutamato (SAŁAT et al., 2016; ASLANKOC et al., 2018; CRUZ-ÁLVAREZ et al., 2018; ALI et al., 2019). É importante ressaltar, que no presente estudo buscamos avaliar o efeito de uma administração periférica (i.p) da PGB. No entanto, tendo em vista a complexidade do DM1 associado à ansiedade e ao TEPT, e do pouco entendimento da neurobiologia dessas doenças associadas ao DM1, estudos futuros são necessários a fim de investigarmos a participação de áreas cerebrais e vias moleculares fundamentais para o comportamento de ansiedade, bem como do processamento de memória como o CPF IL, a ABL e algumas regiões específicas do HIP, para melhor compreender os possíveis efeitos de uma ação neuroprotetora da PGB.

Finalmente, no último experimento, consideramos que a PGB pode estabilizar o disparo de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, e que em animais diabéticos a neurotransmissão glutamatérgica está aumentada (IKEDA et al., 2015; WANG et al., 2019; WIŚNIEWSKI, 2003). Nesse sentido, estudos demonstraram que um aumento da função glutamatérgica no HIP e amígdala de animais com DM1 está relacionado com uma memória de medo mais pronunciada em animais diabéticos (IKEDA et al., 2015; 2021). Dessa forma, hipotetizamos que o bloqueio do receptor NMDA glutamatérgico poderia mimetizar os efeitos da PGB. Reforçando essa possibilidade, Chen e colaboradores (2018) demonstraram que a subunidade $\alpha 2\delta$ -1 e o receptor NMDA podem formar um complexo heteromérico na medula espinhal atuando na modulação da dor neuropática. Assim, é possível que essa heteromerização também ocorra em algumas áreas do cérebro e poderia desempenhar um papel na modulação da liberação de neurotransmissores excitatórios, por exemplo, inibindo sua liberação, minimizando assim os danos resultantes da hiperexcitação em áreas cerebrais específicas associadas à morte neuronal.

Nossos dados demonstraram que a aplicação de KET 1h antes do TrExt não alterou significativamente o tempo de congelamento dos animais no teste Ext (Fig.11B) e na REM (Fig.11C). Curiosamente, encontramos uma redução significativa no congelamento nas doses de 15 e 25 mg/kg durante o TrExt (Fig. 11A). Acreditamos que esse resultado foi devido ao efeito hiperlocomotor da KET já descrito (USUN et al., 2013), e não por facilitar a aquisição de memória de extinção, pois o efeito não foi observado em testes subsequentes. Em relação à avaliação da ansiedade tardia, não encontramos efeitos significativos da KET em nenhuma das doses utilizadas, quando comparada ao grupo controle DM1 (Fig.12A-D).

Na literatura, resultados diferentes têm sido obtidos após o tratamento com KET. Por exemplo, Zhang e colaboradores (2015), demonstraram em animais não diabéticos uma diminuição no tempo de congelamento dos animais submetidos ao teste CMC e também um efeito do tipo ansiolítico após o LCE. No entanto, os animais foram tratados cronicamente (mais de 2 semanas) com KET e em diferentes doses (0,625, 1,25 e 2,5 mg/kg; i.p). Além disso, foi relatado um efeito do tipo ansiolítico em fêmeas não diabéticas submetidas ao LCE após uma única injeção de KET (10 mg/Kg)

(KILIC et al., 2013). No entanto, um efeito oposto (tipo ansiogênico) também foi observada após uma única injeção de KET (7 mg/kg) quando os animais são submetidos a diferentes testes de ansiedade (LCE, *holeboard*, e ensaios de interação social) (SILVESTRE et al., 1997). O mesmo efeito (tipo ansiogênico) foi observado em estudo mais recente realizado com animais não diabéticos que foram submetidos ao LCE (HORSLEY et al., 2018). Porém, o tratamento realizado foi subcrônico (6 dias) e com dosagens menores de KET (0,5 ou 3 mg/kg); e os animais foram testados 48 após a última injeção.

Esses aparentes efeitos contraditórios parecem estar relacionados aos diferentes protocolos empregados nos estudos. Por exemplo, no que diz respeito ao processamento da memória, foi proposto que os efeitos da KET, neste ponto semelhante ao que acontece com a PGB, parecem ser dependentes de fatores como o tempo (aquisição, extinção e recuperação de memórias de medo), doses e vias de administração (CHOI et al., 2020). Dessa forma, Clifton e colaboradores (2018), mostraram que quando aplicada imediatamente após a sessão de CMC, a KET não induziu efeito no tempo de congelamento avaliado 24h depois, enquanto que quando injetada antes da sessão de treinamento de extinção, na dose de 25 mg/kg (i.p.) o tratamento prejudicou a extinção do medo e, após a sessão de treinamento de extinção, a KET não induziu efeito na consolidação da extinção do medo condicionado. Por outro lado, no trabalho de Girgenti e colaboradores (2017), ratos não diabéticos receberam KET (10 mg/kg; ip) 24h após a sessão de CMC e foram então submetidos a uma sessão de treinamento de extinção em cada um dos três dias seguintes. A administração de KET aumentou a extinção no segundo dia de treinamento (ou seja, reduziu o comportamento de congelamento). Curiosamente, em investigações clínicas, observou-se que a administração intravenosa de KET (0,5 mg/kg) reduziu significativamente a gravidade dos sintomas de TEPT em comparação com midazolam (ROMITELLI, 2014). No entanto, a administração de KET logo após um acidente agravou o estresse agudo e os sintomas de estresse pós-traumático (SCHÖNENBERG et al., 2008).

Com base na discussão acima, embora em nossas condições experimentais a injeção única de KET antes da sessão TrExt não tenha sido capaz de alterar os parâmetros comportamentais relacionados ao TEPT e ansiedade, não é possível

descartar um possível papel terapêutico do bloqueio do receptor NMDA para o TEPT e ansiedade relacionada ao DM1, nem o envolvimento da hiperexcitação glutamatérgica nesses processos patológicos e/ou outros tipos de receptores glutamatérgicos. A este respeito, mais investigações precisam ser realizadas para melhor compreender o momento de intervenção, além da provável participação de outros neurotransmissores e tipos de receptores glutamatérgicos, junto com outros possíveis mecanismos de ação envolvidos nestes processos específicos.

6 CONCLUSÃO

Uma única injeção de PGB em ratos DM1 antes de uma sessão de extinção da memória do medo facilita a aquisição da memória de extinção do medo em curto e longo prazo, sendo esse efeito também associado à melhora tardia no comportamento do tipo ansiedade. Todas essas ações benéficas de curto e longo prazo da PGB podem estar associadas ao mecanismo neuroprotetor da PGB, incluindo sua ação antioxidante em áreas do cérebro como CPF e HIP. Como o bloqueio do receptor NMDA imediatamente antes da sessão de treinamento de extinção foi incapaz de interferir nas respostas comportamentais em animais com DM1, o sistema glutamatérgico, por meio do receptor NMDA, parece não participar desses processos, pelo menos sob essas condições experimentais específicas. Apesar da necessidade de novas investigações, do ponto de vista clínico, a administração de PGB em indivíduos com DM1 durante uma sessão psicoterapêutica de extinção pode vir a ser uma estratégia facilitadora do processo de extinção de memórias traumáticas e de indução de efeitos ansiolíticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A. et al. Time-dependent impairments in learning and memory in Streptozotocin-induced hyperglycemic rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 5, p. 1431–1446, 2019.
- ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, v. 23, n. 17, 2013.
- ALDEMIR, E.; ALTINTOPRAK, A. E.; COŞKUNOL, H. Pregabalin dependence: A case report. **Türk Psikiyatri Dergisi**, v. 26, n. 3, p. 217–220, 2015.
- ALI, S. A. et al. Pregabalin affords retinal neuroprotection in diabetic rats: Suppression of retinal glutamate, microglia cell expression and apoptotic cell death. **Experimental Eye Research**, v. 184, p. 78–90, 2019.
- AMANO, T.; UNAL, C. T.; PARÉ, D. Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 489–494, 2010.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico de transtornos mentais: DSM-V-TR**. 1. ed. Porto Alegre: [s.n.]. v. 5
- AMO-SHIINOKI, K. et al. Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of long-standing progression of type 2 diabetes. **JCI Insight**, v. 6, n. 1, 2021.
- ANSELONI, V. Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behavioural Pharmacology**, v. 8, n. 6–7, p. 533–540, 1997.
- ANWER, T. et al. Protective effect of *Withania somnifera* against oxidative stress and pancreatic β -cell damage in type 2 diabetic rats. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 6, p. 1095–1101, 2012.
- ASLANKOC, R. et al. Hippocampus and cerebellum damage in sepsis induced by lipopolysaccharide in aged rats - Pregabalin can prevent damage. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1384–1392, 2018.
- ASOK, A.; KANDEL, E. R.; RAYMAN, J. B. The neurobiology of fear generalization. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 2019.
- ASWAR, U. et al. Telmisartan attenuates diabetes induced depression in rats. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 2, p. 358–364, 2017.
- ATLAS, I. D. F. D. International Diabetes Federation, 9th edition 2019. **The Lancet**, v. 266, n. 6881, 2019.
- AUXÉMÉRY. [Posttraumatic stress disorder (PTSD) as a consequence of the interaction between an individual genetic susceptibility, a traumatogenic event and a

social context]. **L'Encephale**, v. 38, n. 5, p. 373–380, 2012.

BALDWIN, D. S. et al. Efficacy and safety of pregabalin in generalised anxiety disorder: A critical review of the literature. **Journal of Psychopharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1047–1060, 2015.

BANAGOZAR MOHAMMADI, A. et al. Sericin alleviates restraint stress induced depressive- and anxiety-like behaviors via modulation of oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in the prefrontal cortex and hippocampus. **Brain Research**, v. 1715, p. 47–56, 2019.

BANIASADI, M. et al. Effect of pregabalin augmentation in treatment of patients with combat-related chronic posttraumatic stress disorder: A randomized controlled trial. **Journal of Psychiatric Practice**, v. 20, n. 6, p. 419–427, 2014.

BARCLAY, J. et al. Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the Cacna2d2 gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 6095–6104, 2001.

BAYER, H.; BERTOGLIO, L. J. Infralimbic cortex controls fear memory generalization and susceptibility to extinction during consolidation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

BERTOGLIO, L. J.; JOCA, S. R. L.; GUIMARÃES, F. S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 183–188, 2006.

BLANCHARD, D. C.; AGULLANA, R.; SQUIRRELS, G. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. **Physiology and Behavior**, v. 50, p. 967–972, 1993.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 68, n. 1 PART 1, p. 129–135, 1969.

BODEN, M. T. Prevalence of mental disorders and related functioning and treatment engagement among people with diabetes. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 106, p. 62–69, 2018.

BOUTON, M. E. Context and behavioral processes in extinction. **Learning and Memory**, v. 11, n. 5, p. 485–494, 2004.

BREMNER, J. D. et al. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 7, p. 973–981, 1995.

BUCHBERGER, B. et al. Symptoms of depression and anxiety in youth with type 1

diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 70, p. 70–84, 2016.

BUOLI, M.; CALDIROLI, A.; SERATI, M. Pharmacokinetic evaluation of pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 351–359, 2017.

CAI, Z. et al. Increases in β -amyloid protein in the hippocampus caused by diabetic metabolic disorder are blocked by minocycline through inhibition of NF- κ B pathway activation. **Pharmacological Reports**, v. 63, n. 2, p. 381–391, 2011.

CAIN, C. K.; BLOUIN, A. M.; BARAD, M. L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 20, p. 9113–9121, 2002.

CAREAGA, M. B. L.; GIRARDI, C. E. N.; SUCHECKI, D. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 71, p. 48–57, 2016.

CHATURVEDI, S. K. et al. More anxious than depressed: Prevalence and correlates in a 15-nation study of anxiety disorders in people with type 2 diabetes mellitus. **General Psychiatry**, v. 32, n. 4, 2019.

CHAVES, Y. C. et al. Two-weeks treatment with cannabidiol improves biophysical and behavioral deficits associated with experimental type-1 diabetes. **Neuroscience Letters**, v. 729, n. April, p. 135020, 2020.

CHEN, J. et al. The $\alpha 2\delta$ -1-NMDA Receptor Complex Is Critically Involved in Neuropathic Pain Development and Gabapentin Therapeutic Actions. **Cell Reports**, v. 22, n. 9, p. 2307–2321, 2018.

CHIANG, J. L. et al. Type 1 diabetes through the life span: A position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 37, n. 7, p. 2034–2054, 2014.

CHIEN, I. C.; LIN, C. H. Increased risk of diabetes in patients with anxiety disorders: A population-based study. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 86, p. 47–52, 2016.

CHOI, K. H. et al. Effects of ketamine on rodent fear memory. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–15, 2020.

CLIFTON, N. E.; THOMAS, K. L.; HALL, J. The effect of ketamine on the consolidation and extinction of contextual fear memory. **Journal of Psychopharmacology**, v. 32, n. 2, p. 156–162, 2018.

COLLI, M. L. et al. Coxsackievirus B tailors the unfolded protein response to favour viral amplification in pancreatic β cells. **Journal of Innate Immunity**, v. 11, n. 4, p. 375–389, 2019.

COYLE, J. T. Drug Treatment of Anxiety Disorders in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 17, p. 1326–1327, 2001.

CRUZ-ÁLVAREZ, L. E. DE LA et al. Antiallodynic interaction and motor performance of the pregabalin/thioctic acid and pregabalin/ α -tocopherol combinations in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats. **Drug Development Research**, v. 79, n. 7, p. 362–369, 2018.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171–176, 1994.

DA SILVA DIAS, I. C. et al. Indoleamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 10, p. 6997–7009, 2016.

DAVARI, S. et al. Probiotics treatment improves diabetes-induced impairment of synaptic activity and cognitive function: Behavioral and electrophysiological proofs for microbiome-gut-brain axis. **Neuroscience**, v. 240, p. 287–296, 2013.

DAVIS, J. L. et al. Physiological predictors of response to exposure, relaxation, and rescripting therapy for chronic nightmares in a randomized clinical trial. **Journal of Clinical Sleep Medicine**, v. 7, n. 6, p. 622–631, 2011.

DAVIS, M. The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. *The Amygdala: A Functional Analysis* Aggleton JP, ed. 2000.

DE MORAIS, H. et al. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. **Behavioural Brain Research**, v. 258, p. 52–64, 2014a.

DE MORAIS, H. et al. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. **Behavioural Brain Research**, v. 258, p. 52–64, 2014b.

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

DEMIR, C. F. et al. Protective effect of pregabalin on the brain tissue of diabetic rats. **Diabetology International**, v. 12, n. 2, p. 207–216, 2021.

DOBREA, C. et al. Tolerability and use in co-administration of pregabalin in affective patients: A 6-month prospective naturalistic study. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 11, n. 6, p. 893–899, 2012.

DOS SANTOS, M. A. B. et al. 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, v. 36, n. 4, p. 298–304, 2014.

DSM. **Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. [s.l: s.n.].

EDWIN A.M. GALE. The Rise of Childhood Type 1 Diabetes in the 20th Century. **Diabetes**, v. 51, p. 3353–3361, 2002.

ELEAZU, C. O. et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, 2013.

FIELD, M. J.; OLES, R. J.; SINGH, L. Pregabalin may represent a novel class of anxiolytic agents with a broad spectrum of activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, n. 1, p. 1–4, 2001.

FINNERUP, N. B. et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 2, p. 162–173, 2015.

FOA, E. B.; KOZAK, M. J. Emotional Processing of Fear. Exposure to Corrective Information. **Psychological Bulletin**, v. 99, n. 1, p. 20–35, 1986.

FOA, E. B.; MCLEAN, C. P. The Efficacy of Exposure Therapy for Anxiety-Related Disorders and Its Underlying Mechanisms: The Case of OCD and PTSD. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 12, p. 1–28, 2016.

FOWLER, M. et al. The relationship between gabapentin and pregabalin and posttraumatic stress disorder in burned servicemembers. **Journal of Burn Care and Research**, v. 33, n. 5, p. 612–618, 2012.

FRAMPTON, J. E. Pregabalin: A review of its use in adults with generalized anxiety disorder. **CNS Drugs**, v. 28, n. 9, p. 835–854, 2014.

FURINI, C.; MYSKIW, J.; IZQUIERDO, I. The learning of fear extinction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 670–683, 2014.

GAHR, M. et al. Concerns about pregabalin: Further experience with its potential of causing addictive behaviors. **Journal of Addiction Medicine**, v. 7, n. 2, p. 147–149, 2013.

GAMBETA, E. et al. Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin. **Metabolic Brain Disease**, v. 31, n. 3, p. 563–571, 2016.

GARAKANI, A. et al. Pharmacotherapy of Anxiety Disorders: Current and Emerging Treatment Options. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, 2020.

GARAKANI, A. et al. Pharmacotherapy of Anxiety Disorders: Current and Emerging

Treatment Options. **Focus**, v. 19, n. 2, p. 222–242, 2021.

GERACIOTI, T. Elevated Cerebrospinal Fluid Substance P Concentrations in Posttraumatic Stress Disorder and Major Depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 4, p. 637, 2006.

GIACHERO, M.; CALFA, G. D.; MOLINA, V. A. Hippocampal structural plasticity accompanies the resulting contextual fear memory following stress and fear conditioning. **Learning and Memory**, v. 20, n. 11, p. 611–616, 2013.

GIRGENTI, M. J. et al. Ketamine accelerates fear extinction via mTORC1 signaling. **Neurobiology of Disease**, v. 100, p. 1–8, 2017.

GIUSTINO, T. F.; MAREN, S. Noradrenergic modulation of fear conditioning and extinction. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 2018.

GOLDSTEIN, R. B. et al. The epidemiology of DSM-5 posttraumatic stress disorder in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions-III. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 51, n. 8, p. 1137–1148, 2016.

GREENBLATT, H. K.; GREENBLATT, D. J. Gabapentin and Pregabalin for the Treatment of Anxiety Disorders. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 7, n. 3, p. 228–232, 2018.

GRILLON, C. et al. Modeling anxiety in healthy humans: a key intermediate bridge between basic and clinical sciences. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 12, p. 1999–2010, 2019.

GROSSHANS, M. et al. Pregabalin abuse, dependence, and withdrawal: A case report. **American Journal of Psychiatry**, v. 167, n. 7, p. 869, 2010.

GUO, D. et al. Diabetes identification and classification by means of a breath analysis system. **Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)**, v. 6165 LNCS, p. 52–63, 2010.

GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y. Insulin reverses anxiety-like behavior evoked by streptozotocin-induced diabetes in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 29, n. 3, p. 737–746, 2014.

HAN, S. L.; XU, T. LE. Unraveling the Mechanisms of Memory Extinction. **Neuroscience Bulletin**, v. 34, n. 2, p. 385–388, 2018.

HAN, X. et al. Quantitative profiling of neurotransmitter abnormalities in brain, cerebrospinal fluid, and serum of experimental diabetic encephalopathy male rat. **Journal of Neuroscience Research**, v. 96, n. 1, p. 138–150, 2018.

HEK, K. et al. Anxiety disorders and salivary cortisol levels in older adults: A population-based study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 2, p. 300–305, 2013.

HIRANO, S. et al. Effects of histamine H1 receptor antagonists on depressive-like behavior in diabetic mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 2, p. 214–220, 2006.

HITCHCOCK, J.; DAVIS, M. Lesions of the Amygdala, but Not of the Cerebellum or Red Nucleus, Block Conditioned Fear as Measured With the Potentiated Startle Paradigm. **Behavioral Neuroscience**, v. 100, n. 1, p. 11–22, 1986.

HOERSTER, K. D. et al. PTSD is associated with poor health behavior and greater Body Mass Index through depression, increasing cardiovascular disease and diabetes risk among U.S. veterans. **Preventive Medicine Reports**, v. 15, 2019.

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

HORSLEY, R. R. et al. Psilocin and ketamine microdosing: Effects of subchronic intermittent microdoses in the elevated plus-maze in male Wistar rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 29, n. 6, p. 530–536, 2018.

IDF. IDF DIABETES ATLAS 8th Edition South And Central America. **Idf**, v. 8° edition, p. 1–2, 2017.

IKEDA, H. et al. Cannabinoid functions in the amygdala contribute to conditioned fear memory in streptozotocin-induced diabetic mice: Interaction with glutamatergic functions. **Experimental Neurology**, v. 269, p. 233–241, 2015.

IKEDA, H.; YAMAMOTO, S.; KAMEI, J. Increase in brain l-lactate enhances fear memory in diabetic mice: Involvement of glutamate neurons. **Brain Research**, v. 1767, p. 147560, 2021.

IMAGAWA, A. et al. Fulminant type 1 diabetes: A nationwide survey in Japan. **Diabetes Care**, v. 26, n. 8, p. 2345–2352, 2003.

IZQUIERDO, I. A. et al. Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. **Revista USP**, v. 0, n. 98, p. 9, 2013.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear memory. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 2, p. 695–750, 2016.

JACOBSON, A. M. et al. Biomedical risk factors for decreased cognitive functioning in type 1 diabetes: An 18 year follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) cohort. **Diabetologia**, v. 54, n. 2, p. 245–255, 2011.

JOVANOVIC, T. et al. Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: Relation to symptom severity. **Psychiatry Research**, v. 167, n. 1–2, p.

151–160, 2009.

JUNOD, A. et al. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **The Journal of clinical investigation**, v. 48, n. 11, p. 2129–2139, 1969.

KANAZAWA, L. K. S. et al. Quercetin reduces manic-like behavior and brain oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 99, p. 79–86, 2016.

KARUNANAYAKE, E. H.; HEARSE, D. J.; MELLOWS, G. The synthesis of [14C]streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. **Biochemical Journal**, v. 142, n. 3, p. 673–683, 1974.

KHOZA, S.; BARNER, J. C. Glucose dysregulation associated with antidepressant agents: An analysis of 17 published case reports. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 33, n. 3, p. 484–492, 2011.

KILIC, F. S. et al. Effects of single and combined gabapentin use in elevated plus maze and forced swimming tests. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 26, n. 5, p. 307–314, 2013.

KOENEN, K. C. et al. Posttraumatic stress disorder in the World Mental Health Surveys. **Psychological Medicine**, v. 47, n. 13, p. 2260–2274, 2017.

KORTE, S. M.; DE BOER, S. F. A robust animal model of state anxiety: Fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 163–175, 2003.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 155–184, 2000.

LI, Z. et al. Pregabalin is a potent and selective ligand for $\alpha 2\delta-1$ and $\alpha 2\delta-2$ calcium channel subunits. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, n. 1–3, p. 80–90, 2011.

LUCHKINA, N. V.; BOLSHAKOV, V. Y. Mechanisms of fear learning and extinction: synaptic plasticity–fear memory connection. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 1, p. 163–182, 2019.

LUSTMAN, P. J.; CLOUSE, R. E. Depression in diabetic patients: The relationship between mood and glycemic control. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 19, n. 2, p. 113–122, 2005.

MALDONADO, M. et al. Ketosis-Prone Diabetes: Dissection of a Heterogeneous Syndrome Using an Immunogenetic and β -Cell Functional Classification, Prospective Analysis, and Clinical Outcomes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 11, p. 5090–5098, 2003.

MANN, D. et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of pregabalin in children with refractory partial seizures: A phase 1, randomized controlled study. **Epilepsia**, v. 55, n. 12, p. 1934–1943, 2014.

MANSUR, R. B. et al. Diabetes Mellitus and Disturbances in Brain Connectivity: A Bidirectional Relationship? **NeuroMolecular Medicine**, v. 16, n. 4, p. 658–668, 2014.

MAREN, S.; PHAN, K. L.; LIBERZON, I. The contextual brain: Implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 417–428, 2013.

MAREN, S.; QUIRK, G. J. Neuronal signalling of fear memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 844–852, 2004.

MARKOWITZ, S.; FANSELOW, M. Exposure therapy for post-traumatic stress disorder: Factors of limited success and possible alternative treatment. **Brain Sciences**, v. 10, n. 3, 2020.

MARSHAD, R. AL et al. Streptozotocin-induced diabetes mellitus affects the NMDA receptors: Role of caffeine administration in enhancing learning, memory and locomotor deficits. **International journal of health sciences**, v. 12, n. 3, p. 10–17, 2018.

MARTIN, E. I. et al. The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 4, p. 865–891, 2010.

MATSUNAGA, Y. et al. Impairment of synaptic development in the hippocampus of diabetic Goto-Kakizaki rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 53, p. 58–67, 2016.

MCNAUGHTON, N. Fear, anxiety and their disorders: Past, present and future neural theories. **Psychology and Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 173–181, 2011.

MIAO, Y. et al. Activation of Hippocampal CREB by Rolipram Partially Recovers Balance Between TNF- α and IL-10 Levels and Improves Cognitive Deficits in Diabetic Rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 35, n. 8, p. 1157–1164, 2015.

MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: Ten years of progress. **Annual Review of Psychology**, v. 63, p. 129–151, 2012.

MOHEET, A.; MANGIA, S.; SEAQUIST, E. R. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1353, n. 1, p. 60–71, 2015.

MONTE, F. H. et al. Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with

- optogenetics. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 8, p. 3607–3615, 2015.
- MOULTON, C. D.; PICKUP, J. C.; ISMAIL, K. The link between depression and diabetes: The search for shared mechanisms. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 3, n. 6, p. 461–471, 2015.
- MURIACH, M. et al. Diabetes and the brain: Oxidative stress, inflammation, and autophagy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.
- MYERS, K. M.; DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 2, p. 120–150, 2007.
- NAIR, J.; AJIT, S. S. The role of the glutamatergic system in posttraumatic stress disorder. **CNS Spectrums**, v. 13, n. 7, p. 585–591, 2008.
- NEWPORT, D. J.; NEMEROFF, C. B. Neurobiology of posttraumatic stress disorder. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, n. 2, p. 211–218, 2000.
- NONAKA, A. et al. Synaptic plasticity associated with a memory engram in the basolateral amygdala. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 28, p. 9305–9309, 2014.
- NORTHAM, E. A. et al. Psychiatric morbidity and health outcome in Type 1 diabetes - Perspectives from a prospective longitudinal study. **Diabetic Medicine**, v. 22, n. 2, p. 152–157, 2005.
- ONAKPOYA, I. J. et al. Benefits and harms of pregabalin in the management of neuropathic pain: A rapid review and meta-analysis of randomised clinical trials. **BMJ Open**, v. 9, n. 1, 2019.
- PANDE, A. C. et al. Pregabalin in generalized anxiety disorder: A placebo-controlled trial. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, n. 3, p. 533–540, 2003.
- PARÉ, D.; QUIRK, G. J.; LEDOUX, J. E. New vistas on amygdala networks in conditioned fear. **Journal of Neurophysiology**, v. 92, n. 1, p. 1–9, 2004.
- PASLAKIS, G.; GILLES, M.; DEUSCHLE, M. Pregabalin in the treatment of posttraumatic stress disorder: A case report. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 4, p. 1160–1161, 2011.
- PATEL, R. et al. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and beyond: A meta-analysis of functional neuroimaging studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 9, p. 2130–2142, 2012.
- PATEL, R.; DICKENSON, A. H. Mechanisms of the gabapentinoids and $\alpha 2\delta$ -1 calcium channel subunit in neuropathic pain. **Pharmacology Research and Perspectives**, v. 4, n. 2, 2016.
- PELLOW S et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as

a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149–167, 1985.

PEREIRA, M. M. et al. The antioxidant gallic acid induces anxiolytic-, but not antidepressant-like effect, in streptozotocin-induced diabetes. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 5, p. 1573–1584, 2018.

PETERSMANN, A. et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 126, n. 7, p. 406–410, 2018.

PITMAN, R. K. et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 769–787, 2012.

PITOCCO, D. et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. **Review of Diabetic Studies**, v. 7, n. 1, p. 15–25, 2010.

PNS. **Pesquisa nacional de saúde 2019: Ciclos de vida**. [s.l: s.n.].

POHL, R. B. et al. Efficacy of pregabalin in the treatment of generalized anxiety disorder: Double-blind, placebo-controlled comparison of BID versus TID dosing. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 151–158, 2005.

POPA, D. et al. Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction. **Nature**, 2008.

PRABHAKAR, V. et al. Diabetes-associated depression: The serotonergic system as a novel multifunctional target. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 4–10, 2015.

RAJPUT, R. et al. Prevalence and predictors of depression and anxiety in patients of diabetes mellitus in a tertiary care center. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 746–751, 2016.

REBOLLEDO-SOLLEIRO, D. et al. Dopamine D1 receptor activity is involved in the increased anxiety levels observed in STZ-induced diabetes in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 313, p. 293–301, 2016.

RECHENBERG, K.; WHITTEMORE, R.; GREY, M. Anxiety in Youth With Type 1 Diabetes. **Journal of Pediatric Nursing**, v. 32, p. 64–71, 2017.

REDIVO, D. D. B. et al. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. **Behavioural Brain Research**, v. 298, p. 57–64, 2016.

RENN, B. N.; FELICIANO, L.; SEGAL, D. L. The bidirectional relationship of depression and diabetes: A systematic review. **Clinical Psychology Review**, v. 31, n. 8, p. 1239–1246, 2011.

RENNA, C. P. et al. Posttraumatic Stress Related to Hyperglycemia: Prevalence in Adults with Type I Diabetes. **Journal of Clinical Psychology in Medical Settings**, v. 23, n. 3, p. 269–284, 2016.

RÉUS, G. Z. et al. Relationship of oxidative stress as a link between diabetes mellitus and major depressive disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, n. Mdd, 2019.

RIBEIRO, T. O. et al. Activation of mineralocorticoid receptors facilitate the acquisition of fear memory extinction and impair the generalization of fear memory in diabetic animals. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 2, p. 529–542, 2020.

RICHARDSON, S. J. et al. The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 52, n. 6, p. 1143–1151, 2009.

RICHTER-LEVIN, G. The Amygdala, the Hippocampus, and Emotional Modulation of Memory. **Neuroscientist**, v. 10, n. 1, p. 31–39, 2004.

RICKELS, K. et al. Pregabalin for treatment of generalized anxiety disorder: A 4-week, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of pregabalin and alprazolam. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 9, p. 1022–1030, 2005.

ROBERT LEE PAGE, I. I. et al. Possible heart failure exacerbation associated with pregabalin: Case discussion and literature review. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 9, p. 922–925, 2008.

ROBERTS, A. L. et al. Posttraumatic stress disorder and incidence of type 2 diabetes mellitus in a sample of women: A 22-year longitudinal study. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 3, p. 203–210, 2015.

RODRIGUEZ, B. F. et al. Characteristics and predictors of full and partial recovery from generalized anxiety disorder in primary care patients. **Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 194, n. 2, p. 91–97, 2006.

ROIVAINEN, M.; KLINGEL, K. Role of enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 52, n. 6, p. 995–996, 2009.

ROMITELLI, F.; J., M.; J., M. Efficacy of intravenous ketamine for treatment of chronic posttraumatic stress disorder: A randomized clinical trial. **JAMA Psychiatry**, v. 71, n. 6, p. 681–688, 2014.

ROWN, G. K. B. Glucose transporters: Structure, function and consequences of deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 23, p. 237–46, 2000.

ROY AND LLOYD. Epidemiology of depression and diabetes: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 142, n. SUPPL., p. S8–S21, 2012.

SALAŁ, K. et al. Effect of pregabalin on contextual memory deficits and inflammatory state-related protein expression in streptozotocin-induced diabetic mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 6, p. 613–623, 2016.

SANTINI, E.; QUIRK, G. J.; PORTER, J. T. Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 15, p. 4028–4036, 2008.

SANTINI, E.; SEPULVEDA-ORENGO, M.; PORTER, J. T. Muscarinic receptors modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and consolidation of fear extinction. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 9, p. 2047–2056, 2012.

SANTOS, C. J. P. A.; STERN, C. A. J.; BERTOGLIO, L. J. Attenuation of anxiety-related behaviour after the antagonism of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the rat ventral hippocampus. **Behavioural Pharmacology**, v. 19, n. 4, p. 357–360, 2008.

SAREEN, J. et al. Risk factors for post-injury mental health problems. **Depression and Anxiety**, v. 30, n. 4, p. 321–327, 2013.

SATHISH, T. et al. Proportion of newly diagnosed diabetes in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 23, n. 3, p. 870–874, 2021.

SCHÖNENBERG, M. et al. Ketamine aggravates symptoms of acute stress disorder in a naturalistic sample of accident victims. **Journal of Psychopharmacology**, v. 22, n. 5, p. 493–497, 2008.

SHARMA, M. et al. Association of glutathione-S-transferase with patients of type 2 diabetes mellitus with and without nephropathy. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 10, n. 4, p. 194–197, 2016.

SIBA, I. P. et al. Fish oil prevents rodent anxious states comorbid with diabetes: A putative involvement of nitric oxide modulation. **Behavioural Brain Research**, v. 326, p. 173–186, 2017.

SILVESTRE, J. S. et al. Acute effects of ketamine in the holeboard, the elevated-plus maze, and the social interaction test in Wistar rats. **Depression and Anxiety**, v. 5, n. 1, p. 29–33, 1997.

SIMS-ROBINSON, C. et al. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 10, p. 551–559, 2010.

SMITH, K. J. et al. Association of diabetes with anxiety: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 74, n. 2, p. 89–99, 2013.

SNOUFFER, E. An inexplicable upsurge: The rise in type 1 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 137, p. 242–244, 2018.

SOUTHWICK SM et al. Abnormal noradrenergic function in posttraumatic stress disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 266–274, 1993.

STEIMER, T. The biology of fear- and anxiety-related behaviors. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 231–249, 2002.

STEIN, M. B. et al. Fluvoxamine treatment of social phobia (social anxiety disorder): A double-blind, placebo-controlled study. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 5, p. 756–760, 1999.

STERN, C. A. J. et al. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: Evidence from cannabidiol treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 9, p. 2132–2142, 2012.

STRAWN, J. R. et al. Establishing the neurobiologic basis of treatment in children and adolescents with generalized anxiety disorder. **Depression and Anxiety**, v. 29, n. 4, p. 328–339, 2012.

STRAWN, J. R.; LEVINE, A. Treatment response biomarkers in anxiety disorders: From neuroimaging to neuronally-derived extracellular vesicles and beyond. **Biomarkers in Neuropsychiatry**, v. 3, p. 100024, 2020.

STRÖHLE, A.; GENSICHEN, J.; DOMSCHKE, K. The Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 115, n. 37, p. 611–620, 2018.

SUE, M. et al. Characteristics of fulminant type 1 diabetes mellitus. **Medical Science Monitor**, v. 14, n. 10, 2008.

SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 172, n. 1, p. 49–84, 1977.

TAKIZAWA, F. et al. Glucose-independent persistence of PAI-1 gene expression and H3K4 tri-methylation in type 1 diabetic mouse endothelium: Implication in metabolic memory. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 433, n. 1, p. 66–72, 2013.

TALBOTT, J. A. Prevalence, Severity, and Comorbidity of 12-Month DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Yearbook of Psychiatry and Applied Mental Health**, v. 2006, p. 131–132, 2006.

TANIELIAN & JAYCOX, L. Invisible Wounds of War: Psychological and Cognitive Injuries, Their Consequences, and Services to Assist Recovery. **Invisible Wounds of War: Psychological and Cognitive Injuries, Their Consequences, and Services to Assist Recovery**, 2020.

TAYLOR, C. P.; ANGELOTTI, T.; FAUMAN, E. Pharmacology and mechanism of

action of pregabalin: The calcium channel $\alpha 2\text{-}\delta$ (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. **Epilepsy Research**, v. 73, n. 2, p. 137–150, 2007.

TESFAYE, S. et al. **Duloxetine and pregabalin: High-dose monotherapy or their combination? the “cOMBO-DN study” - A multinational, randomized, double-blind, parallel-group study in patients with diabetic peripheral neuropathic pain.** [s.l.: s.n.]. v. 154

USUN, Y. et al. Ketamine increases striatal dopamine release and hyperlocomotion in adult rats after postnatal functional blockade of the prefrontal cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 229–237, 2013.

VACCARINO, V. et al. Posttraumatic stress disorder and incidence of type-2 diabetes: Aprospective twin study. **Journal of Psychiatric Research**, v. 56, n. 1, p. 158–164, 2014.

VALDIVIESO, D. A. et al. Effects of pregabalin on neurobehavior in an adult male rat model of PTSD. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, 2018.

VAN AMERINGEN, M. A. et al. Sertraline treatment of generalized social phobia: A 20-week, double-blind, placebo-controlled study. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 2, p. 275–281, 2001.

VANELZAKKER, M. B. et al. From Pavlov to PTSD: The extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 113, p. 3–18, 2014.

VENTURINI, C. D. et al. Resveratrol and red wine function as antioxidants in the central nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 6, 2010.

WALKUP, J. T. et al. Cognitive Behavioral Therapy, Sertraline, or a Combination in Childhood Anxiety. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 26, p. 2753–2766, 2008.

WANG, X. P. et al. Expression Changes of NMDA and AMPA Receptor Subunits in the Hippocampus in rats with Diabetes Induced by Streptozotocin Coupled with Memory Impairment. **Neurochemical Research**, v. 44, n. 4, p. 978–993, 2019.

WEISBERG, R. B.; BRUCE, S. E.; MACHAN, J. T. Nonpsychiatric illness among primary care patients with trauma histories and posttraumatic stress disorder. **Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry**, v. 4, n. 3, p. 118, 2002.

WELGE et al. Efficacy and tolerability of antidepressants in pediatric anxiety disorders: A systematic review and meta-analysis. **Depression and Anxiety**, v. 32, n. 3, p. 149–157, 2015.

WELLEN, K.; HOTAMISLIGIL, G. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, 2005.

WIŚNIEWSKI, K. Influence of NMDA, a potent agonist of glutamate receptors, on behavioral activity in 4-week streptozotocin-induced diabetic rats. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 345–351, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and Other Common Mental Disorders. p. 24, 2017.

WRIGHTEN, S. A. et al. A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 5, p. 444–453, 2009.

WU, J.; YAN, L. J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 8, p. 181–188, 2015.

WU, M. et al. Rotenone protects against β -cell apoptosis and attenuates type 1 diabetes mellitus. **Apoptosis**, v. 24, n. 11–12, p. 879–891, 2019.

YEHUDA, R. et al. Post-traumatic stress disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 131–150, 2015.

ZANOVELI, J. M. et al. Depression Associated with Diabetes: From Pathophysiology to Treatment. **Current diabetes reviews**, v. 12, n. 3, p. 165–78, 2016.

ZHANG, L. M. et al. Anxiolytic effects of ketamine in animal models of posttraumatic stress disorder. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 4, p. 663–672, 2015.

ZOHAR, J. et al. Brief post-stressor treatment with pregabalin in an animal model for PTSD: Short-term anxiolytic effects without long-term anxiogenic effect. **European Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 9, p. 653–666, 2008.

ZUNG, A. et al. Increase in the incidence of type 1 diabetes in Israeli children following the Second Lebanon War. **Pediatric Diabetes**, v. 13, n. 4, p. 326–333, 2012.

APÊNDICE 1- EFEITOS DE CURTO E LONGO PRAZO DE UMA ÚNICA INJEÇÃO DE PGB SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DO MEDO E SOBRE A ANSIEDADE EM ANIMAIS DIABÉTICOS

Conforme as evidências demonstram, o processamento da memória ocorre em etapas temporalmente distintas (aquisição, consolidação e evocação), assim avaliamos também os efeitos da PGB sobre a consolidação da memória de extinção do medo ao contexto. Neste estudo a PGB foi administrada logo após o treino de extinção (TrExt), nas doses de 0, 30, 100 ou 300 mg/kg (i.p.). Posteriormente, os animais foram submetidos a dois testes - Teste de extinção 1 (Ext 1) e teste de extinção 2 (Ext 2). Após o teste Ext 2, os animais foram submetidos ao teste do LCE.

RESULTADO

Como pode ser visto na Fig. 13, quando analisados os dados de treinamento de extinção (Fig. 13A), a ANOVA de duas vias mostrou diferença estatística entre os tratamentos [$F(4, 66) = 33,63$; $p < 0,05$], diferença no tempo [$F(1, 66) = 91,75$; $p < 0,05$] e interação entre essas variáveis [$F(4, 66) = 5,270$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* de Bonferroni mostrou uma diferença significativa nos grupos NGL e DBT em relação aos seus respectivos 1º blocos ($p < 0,05$), exceto do bloco que foi tratado posteriormente com PGB 30.

No Ext 1 (Fig. 13B) e no teste Ext 2 (Fig. 13C), a ANOVA de uma via mostrou, respectivamente, efeito significativo do tratamento entre os grupos DBT [$F(4, 40) = 29,68$; $p < 0,05$] e [$F(4, 38) = 94,41$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* de Bonferroni mostrou no teste Ext (Fig. 13B) que todos os grupos tratados com PGB apresentaram redução significativa no congelamento ($p < 0,05$), assim como no teste Ext 2 (Fig. 13C), mostrando que o efeito da PGB foi de longa duração. Além disso, a injeção de PGB 300 normalizou o comportamento de congelamento, não diferindo estatisticamente do grupo NGL/VEI ($p < 0,05$).

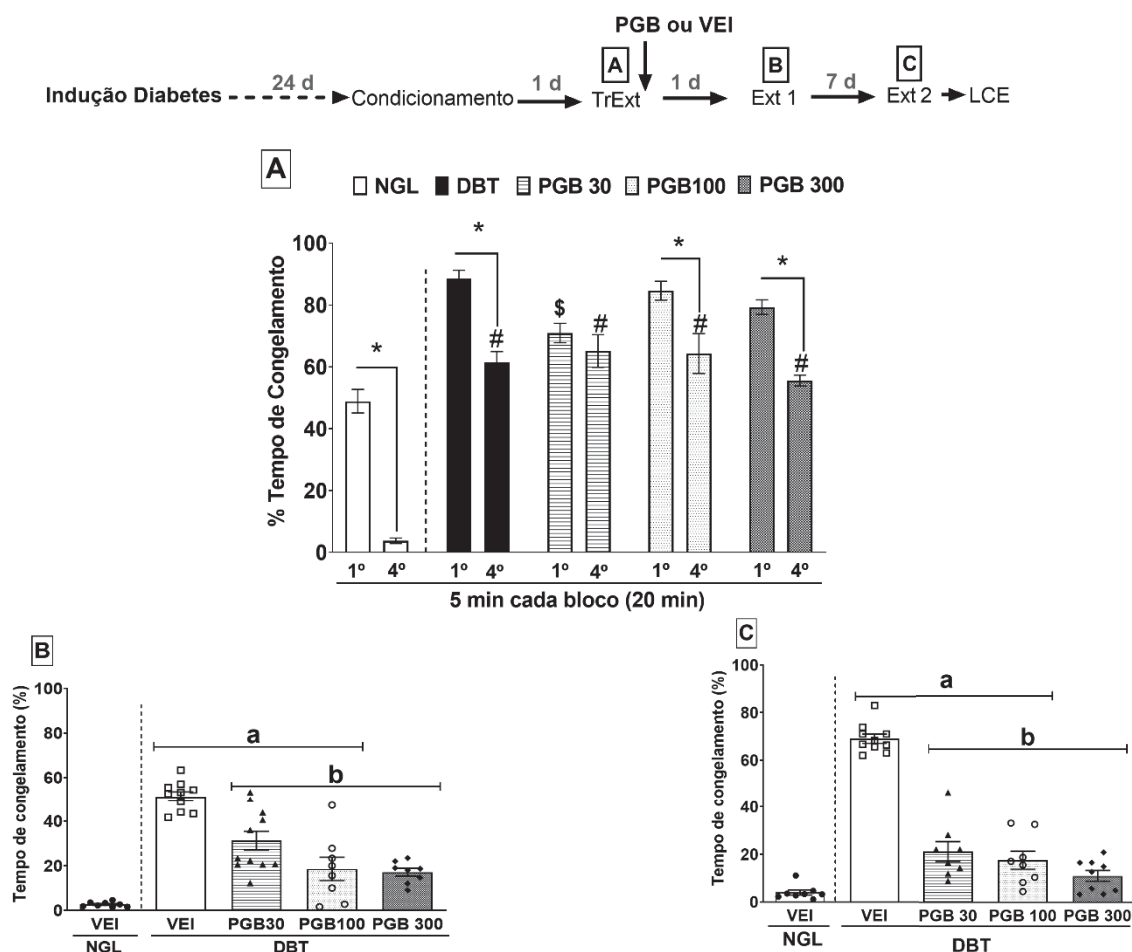


Fig. 13 - Efeitos de uma única injeção de PGB na consolidação da memória de extinção do medo em animais DBT. O esquema acima dos gráficos representa o desenho experimental usado neste experimento. (A) os animais DBT apresentaram comportamento de congelamento aumentado durante o treinamento de extinção; (B) PGB facilitou a consolidação da extinção da memória do medo em animais DBT; (C) PGB prejudicou a recuperação da memória do medo em animais DBT. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 8-10$ /grupo). * $p < 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo do 1º bloco; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo do 4º bloco (NGL); \$ $p < 0,05$ comparado ao grupo do 1º bloco (DBT); ap $< 0,05$ em comparação com NGL/VEI; bp $< 0,05$ em relação ao DBT/VEI.

No labirinto em cruz elevado, a ANOVA de uma via mostrou que o tratamento foi capaz de alterar a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [$F(4, 38) = 6,872$; $p < 0,05$; Fig. 14A], a porcentagem de entradas nos braços abertos [$F(4, 38) = 8,964$, $p < 0,05$; Fig. 14B], frequência de afundamento da cabeça [$F(4, 31) = 9,281$, $p < 0,05$; Fig. 14C], e o número total de entradas nos braços fechados [$F(4, 38) = 10,41$, $p > 0,05$; Fig. 14D]. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que os animais DBT

tratados com PGB (todas as doses) apresentaram redução significativa do comportamento do tipo ansiedade quando comparados ao DBT/VEI durante o tempo e entradas nos braços abertos ($p < 0,05$). Na frequência de afundamento da cabeça apenas os animais PGB 300 foram significativamente diferentes do grupo DBT/VEI ($p < 0,05$). Em nenhuma das doses de PGB foi observada um aumento significativo no número de entradas nos braços fechados, em comparação ao grupo DBT/VEI ($p > 0,05$).

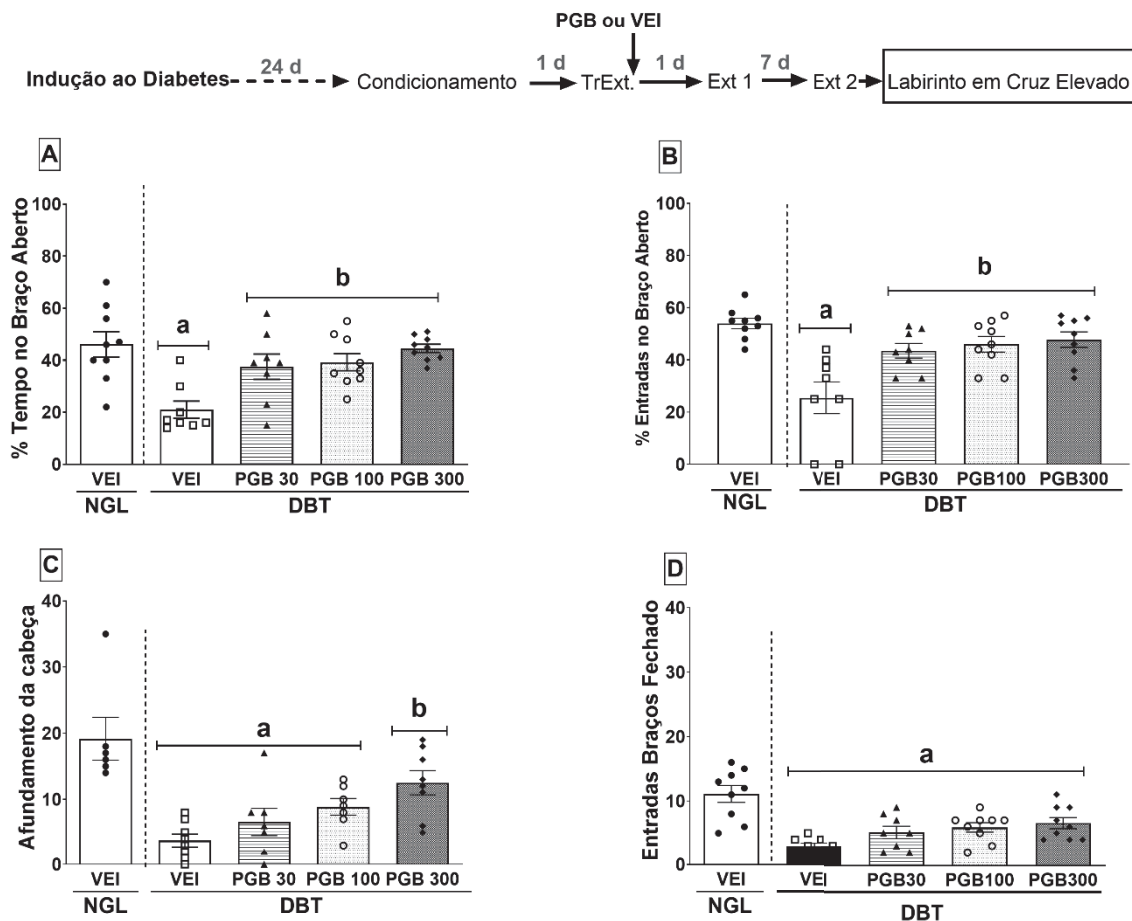


Fig. 14 - Efeito de uma única injeção de PGB sobre parâmetros de ansiedade em animais DBT. Teste de labirinto em cruz elevado (LCE) - Painéis A (% do tempo nos braços abertos), B (% das entradas nos braços abertos), C (frequência de afundamento da cabeça) e D (número de entradas nos braços fechados). Os valores são expressos como média $\pm$ EPM $n = 8-10$ /grupo). ap $<0,05$ em comparação com NGL/VEI; bp $<0,05$ em relação ao DBT/VEI.

Em relação aos parâmetros de glicemia e peso dos animais diabéticos tratados com PGB, a ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre os tratamentos quando o ganho de peso [$F(4, 33) = 112,3$, $p < 0,05$] e glicose no sangue [$F(4, 33) = 54,29$, $p < 0,05$] foi analisado. quando comparado ao grupo NGL. Esses parâmetros não foram alterados por nenhum tratamento empregado neste estudo. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que todos os animais DBT independente do tratamento apresentaram redução significativa no ganho de peso ($p < 0,05$) e aumento da glicemia em relação aos animais NGL ($p < 0,05$) (ver Tabela 4 abaixo).

Tabela 4: Efeito da PGB após o TrExt sobre os parâmetros de glicemia e peso dos animais diabéticos.

Grupo	Glicemia (mg/dL)	Ganho de peso (g)
NGL/VEI	115,62 ± 2,10	183,00 ± 5,40
DBT/VEI	464,10 ± 15,69*	32,25 ± 4,03*
DBT/PGB 30	453,13 ± 18,85*	19,41 ± 6,40*
DBT/PGB 100	544,80 ± 34,22*	12,83 ± 7,56*
DBT/PGB 300	482,64 ± 31,65*	15,22 ± 6,41*

Grupo normoglicêmico veículo (NGL/VEI); grupo diabético veículo (DBT/VEI); grupos tratados com pregabalina na dose de 30 mg/kg (PGB 30), na dose de 100 mg/kg (PGB 100) e na dose de 300 mg/kg (PGB 300). Resultados foram expressos como a média ± EPM; n = 8-10, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NGL/VEI.

APÊNDICE 2 - EFEITO DO TREINO PROLONGADO (40 MIN) SOBRE A AQUISIÇÃO DA MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DO MEDO E SOBRE A ANSIEDADE EM ANIMAIS DBT

Tendo em vista que um TrExt da memória de medo contextual de 20 min é ineficiente para a completa aquisição da extinção em animais diabéticos, realizamos a extensão desse tempo para verificar se com uma exposição prolongada os animais diabéticos apresentariam maior redução do comportamento de congelamento. Para isso, realizamos um TrExt de 40 min, no mesmo contexto do condicionamento aversivo. A sequência do protocolo foi a mesma do experimento avaliando a PGB. Após o TrExt, os animais foram submetidos ao Teste de extinção 1 (Ext 1) e sete dias depois, ao teste de extinção 2 (Ext 2), logo após os animais foram também avaliados no teste do LCE.

RESULTADO

Conforme mostrado na Fig. 15A ao analisar os dados de TrExt, a ANOVA de duas vias mostrou diferença estatística entre os grupos [$F(2, 42) = 40,59, p < 0,05$] e o fator tempo [$F(1, 42) = 294,1; p < 0,05$]. A análise *post-hoc* de Bonferroni mostrou uma diferença significativa em todos os grupos em relação aos seus respectivos grupos do 1º bloco ($p < 0,05$). O grupo DBT/20min foi significativamente diferente de NGL/20min em relação ao 4º bloco ($p < 0,05$), demonstrando dificuldade na aquisição da extinção. Já os animais do grupo DBT40min não foram significativamente diferentes do grupo NGL20min, em relação ao 4º bloco, demonstrando que o treino prolongado melhorou a aquisição da extinção.

No teste Ext 1 (Fig. 15B) e Ext 2 (Fig. 15C) a ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas entre os grupos [$F(2, 21) = 26,65, p > 0,05$; Fig. 15B] e [$F(2, 21) = 22,72, p > 0,05$; Fig. 15C]. A análise *post-hoc* de Bonferroni mostrou diferença significativa entre os grupos DBT (20min e 40min) em relação ao grupo NGL ($p > 0,05$), tanto no teste Ext 1 (Fig. 15B) quanto no teste Ext 2 (Fig. 15C). Ainda mais, o grupo DBT40min também foi significativamente diferente do grupo DBT20min ($p < 0,05$).

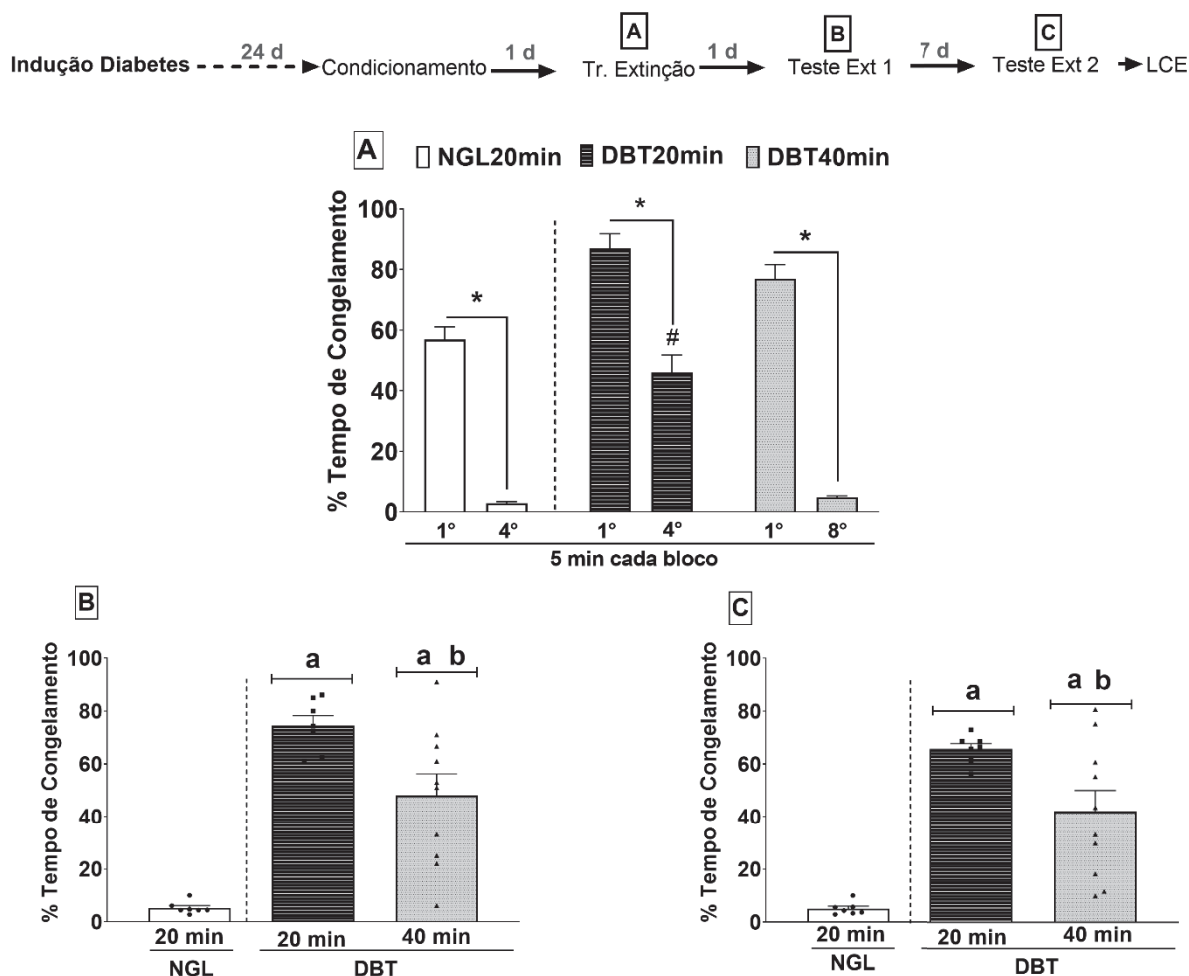


Fig. 15 - Efeito do treino prolongado de 40 min sobre a aquisição da memória de extinção do medo em animais DBT. O esquema acima dos gráficos representa o desenho experimental usado neste experimento. (A) o treino prolongado melhorou a aquisição da memória de extinção, reduzindo o comportamento de congelamento aumentado de animais DBT; (B) o treino prolongado reduziu o comportamento de congelamento aumentado de animais DBT; (C) o treino prolongado reduziu a memória do medo a longo prazo em animais DBT. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7-10/\text{grupo}$). * $p < 0,05$ quando comparado ao seu respectivo grupo do 1º bloco; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo 4º bloco (NGL); ap $<0,05$ em comparação com NGL (VEI); bp $<0,05$ em relação ao DBT/VEI.

Ao avaliar o comportamento tipo ansiedade (Fig. 16), a ANOVA de uma via mostrou que os grupos foram diferentes em relação a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [$F(2, 21) = 11,38$; $p > 0,05$; Fig. 16A], a porcentagem de entradas nos braços abertos [$F(2, 21) = 32,30$, $p > 0,05$; Fig. 16B], número total de entradas nos braços fechados [$F(2, 21) = 20,95$, $p > 0,05$; Fig. 16C] e a frequência de afundamento da

cabeça [$F(2, 21) = 11,63$, $p > 0,05$; Fig. 16D]. O teste *post-hoc* de Bonferroni mostrou que os animais dos grupos DBT (20min e 40min) apresentaram aumento no comportamento tipo ansiedade, demonstrado pela diferença significativa nos parâmetros de tempo e entradas nos braços abertos, e entradas nos braços fechados, em relação ao NGL20min ($p < 0,05$). No entanto, o grupo DBT40min também demonstrou diferença significativa em relação ao DBT20min ($p < 0,05$), reduzindo o comportamento tipo ansiedade nos parâmetros de entradas no braço aberto (Fig. 16B) e frequência de afundamento da cabeça (Fig. 16D).

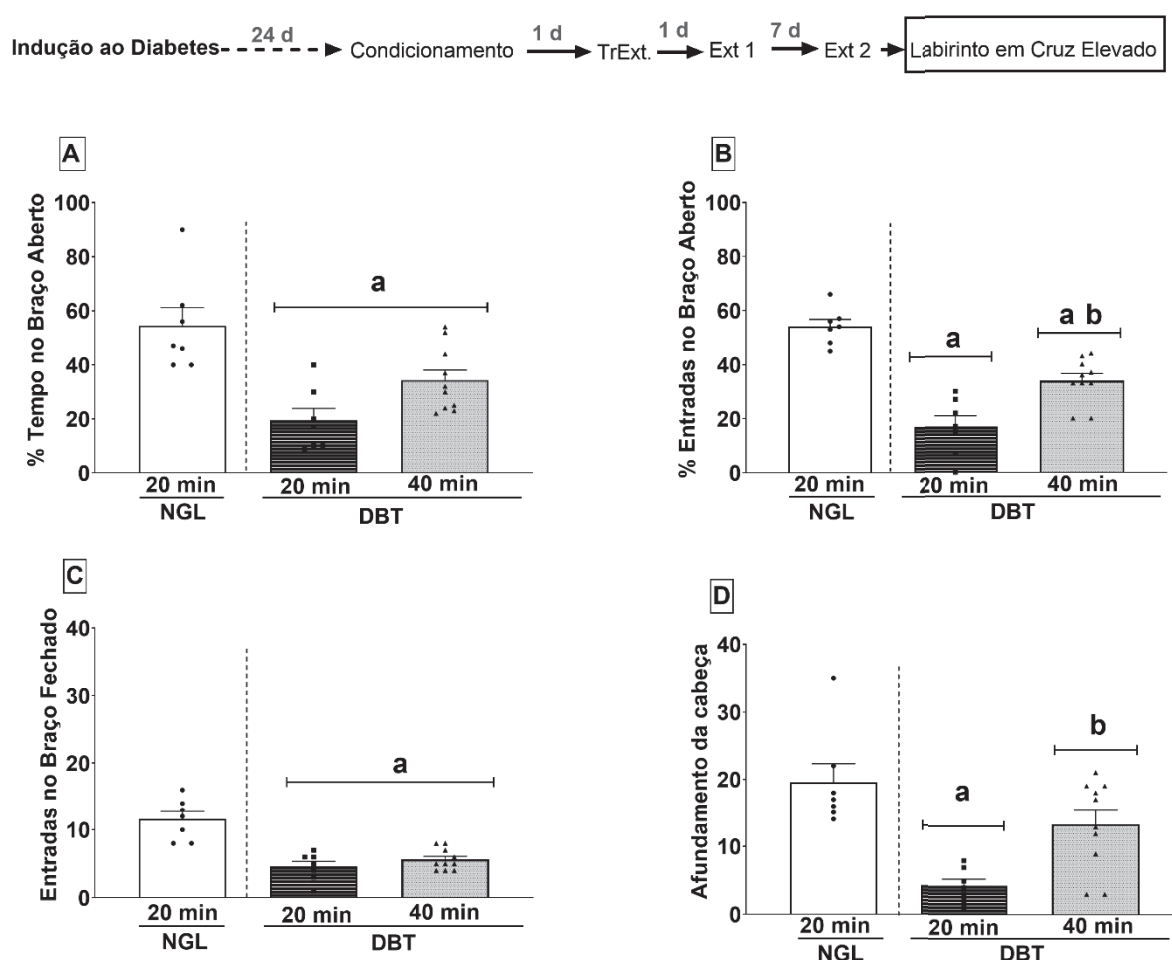


Fig. 16 - Efeito do treino prolongado de 40 min sobre o comportamento do tipo ansiedade em animais DBT. Teste de labirinto em cruz elevado (LCE) - Painéis A (% do tempo nos braços abertos), B (% das entradas nos braços abertos), C (número de entradas nos braços fechados) e D (frequência de afundamento da cabeça). Os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n = 7-10$ /grupo). $a_{p < 0,05}$ quando comparado ao grupo NGL/VEI; $b_{p < 0,05}$ em relação ao DBT/VEI.