

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA FELIPE DA SILVA

EFEITO DO TRATAMENTO COM O INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-4
ROFLUMILASTE SOBRE RESPOSTAS DE MEDO CONTEXTUAL EM MODELO
ANIMAL DE DIABETES *MELLITUS* TIPO-1

CURITIBA

2021

ANA CAROLINA FELIPE DA SILVA

EFEITO DO TRATAMENTO COM O INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE-4
ROFLUMILASTE SOBRE RESPOSTAS DE MEDO CONTEXTUAL EM MODELO
ANIMAL DE DIABETES *MELLITUS* TIPO-1

Monografia apresentada ao Curso de Biomedicina,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Janaína Menezes Zanoveli

Co-orientadora: Msc. Ana Paula Farias Waltrick

CURITIBA

2021

À minha família, que sempre acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

E então, cheguei ao fim. Uma jornada difícil, com muitos momentos de luta e vontade de desistir de tudo, mas que nunca me fizeram deixar de sonhar. Felizmente tenho pessoas incríveis na minha vida, que me ergueram toda vez que pensei que não daria mais. Vocês me ajudaram a realizar esse sonho, serei eternamente grata.

Gostaria, primeiramente, de agradecer aos meus pais, que sempre estiveram prontos para me ajudar e me receber de braços abertos, independente do problema. Também, agradeço ao meu irmão, que acompanhou toda a jornada de perto e me apoiou em todos os momentos. Obrigada, família, pelo suporte e por comemorar comigo as pequenas conquistas deste caminho!

Agradeço minha orientadora, Janaína, por me permitir crescer e contribuir em para a área da Neuropsicofarmacologia, a qual sou apaixonada. Suas atitudes são nobres e me inspiram todos os dias. E aos meus colegas de laboratório, de que acolheram e me ensinaram tudo que conquistei na bancada, principalmente a Ana Paula, minha co-orientadora.

Às professoras Débora Klisiowcz, Katya Naliwaiko e Djanira Veronez que, em vários momentos da graduação, me ouviram e me ajudaram das mais diferentes formas. Sou muito grata por ter cruzado o caminho de mulheres tão inspiradoras e impactantes.

À Universidade Federal do Paraná, que me ofereceu um universo de possibilidades durante a graduação. À Biomedicina, que contribuiu na minha formação tanto de cientista quanto cidadã. E, também, à Chromos, empresa júnior que me fez ver a saúde com outros olhos. Toda forma de conhecimento é apaixonante.

Aos profissionais de saúde que me acompanharam em toda essa jornada e, mais do que nunca, me ensinaram priorizar minha saúde mental. O trabalho que vocês realizam é de muita admiração e respeito.

Ao Victor Maltese Stoco, meu veterano e amigo querido que me inspirou a ser uma pessoa melhor em todos os momentos da graduação. Que você continue brilhando aí do céu.

RESUMO

Estudos apontam maior prevalência do transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo-1 (DMT1). Interessante que em ambas as condições há alterações neurobiológicas comuns, tais como aumento da neuroinflamação, desregulação de neurotransmissores e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), além do prejuízo da plasticidade sináptica. Como uma consequência, estudos demonstram em modelos animais de DMT1 um prejuízo no processamento de memória/aprendizado, ou seja, esses animais apresentam uma maior consolidação de memória de medo contextual e uma generalização dessa resposta de medo quando expostos a ambientes neutros. Tendo em vista o exposto acima associado ao desafio clínico que é tratar o TEPT em pacientes diabéticos – devido a interação com drogas hipoglicemiantes, a busca por novos compostos se torna urgente. Nesse sentido, inibidores de enzimas fosfodiesterase-4 (iFDE4), como o roflumilaste, têm se destacado em tratar doenças que envolvem prejuízo de memória, por melhorar a neurogênese e plasticidade sináptica em áreas encefálicas, através do aumento da disponibilidade de adenosina - 3', 5' - monofosfato cíclico (AMPC), que facilita a cascata de eventos intracelulares e transcreve proteínas envolvidas nestes processos neuroprotetores e reparadores. Portanto, o objetivo deste projeto foi avaliar se o tratamento com o iFDE4 roflumilaste facilitaria a aquisição de uma memória de extinção do medo e prejudicaria a generalização da resposta de medo em animais com o DMT1 induzido quimicamente por estreptozotocina. Uma semana após a diabetização, o tratamento com roflumilaste (0,01; 0,03 ou 0,1 mg/kg) ou veículo foi iniciado e mantido durante 21 dias. Vinte e quatro horas após a familiarização ao contexto, os animais foram submetidos ao protocolo de condicionamento de medo contextual. No dia seguinte, eles foram submetidos a um treino de extinção da memória de medo e, no 28º dia, foram reexpostos ao contexto (sem o choque) a fim de investigar o efeito do tratamento sobre a extinção da memória aversiva. No dia 29, foi avaliado o efeito do tratamento sobre a generalização do medo, ao submeter os animais em um contexto neutro. O tempo de congelamento dos animais foi quantificado em todos os testes como um índice de resposta de medo. Por fim, os animais foram eutanasiados e tiveram o hipocampo removido para análise de expressão proteica do BDNF. Como resultado, o roflumilaste, na sua menor dose, foi capaz de promover um controle glicêmico nos animais diabéticos, além de reduzir a resposta de medo nos testes de extinção e generalização. Ainda, o roflumilaste aumentou os níveis de BDNF no hipocampo. Assim, o estudo indica que o roflumilaste pode ser uma alternativa terapêutica interessante para o tratamento dessas doenças associadas. Apesar desses dados serem promissores, vale ressaltar a necessidade de mais estudos a fim de obtermos um maior entendimento dos mecanismos envolvidos na neurobiologia do TEPT associado ao DMT1.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*. BDNF. TEPT. Extinção. Generalização. Memória aversiva. Estreptozotocina.

ABSTRACT

Studies point to a higher prevalence of post-traumatic stress disorder (PTSD) in individuals with type-1 diabetes mellitus (T1DM). Interestingly, in both conditions, there are common neurobiological changes, such as increased neuroinflammation, dysregulation of neurotransmitters, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), in addition to impaired synaptic plasticity. Consequently, studies demonstrate in animal models of DMT1 an impairment in memory processing/learning, that is, these animals show a greater consolidation of contextual fear memory and a generalization of this fear response when exposed to neutral environments. Given the above, associated with the clinical challenge of treating PTSD in diabetic patients – due to the interaction with hypoglycemic drugs, the search for new compounds becomes urgent. In this sense, inhibitors of phosphodiesterase-4 (iPDE4) enzymes, such as roflumilast, have been highlighted in treating diseases that involve memory impairment, by improving neurogenesis and synaptic plasticity in brain areas, by increasing the availability of adenosine - 3', 5' - cyclic monophosphate (cAMP), which facilitates the cascade of intracellular events and transcribes proteins involved in these neuroprotective and repair processes. Therefore, this project aimed to evaluate whether treatment with iPDE4 roflumilast would facilitate the acquisition of a fear extinction memory and impair the generalization of the fear response in animals with DMT1 chemically induced by streptozotocin. One week after diabetes, treatment with roflumilast (0.01, 0.03, or 0.1 mg/kg) or vehicle was started and continued for 21 days. Twenty-four hours after familiarization with the context, the animals were submitted to the contextual fear conditioning protocol. The next day, they underwent a fear memory extinction training and, on the 28th day, they were re-exposed to context (without the shock) to investigate the effect of the treatment on aversive memory extinction. On day 29, the effect of treatment on fear generalization was evaluated by subjecting the animals to a neutral context. The freezing time of the animals was quantified in all tests as an index of the fear response. Finally, the animals were euthanized, and the hippocampus was removed for analysis of BDNF protein expression. As a result, roflumilast, at its lowest dose, was able to promote glycemic control in diabetic animals, in addition to reducing the fear response in extinction and generalization tests. Furthermore, roflumilast increased BDNF levels in the hippocampus. Thus, the study indicates that roflumilast may be an interesting therapeutic alternative for the treatment of these associated diseases. Although these data are promising, it is worth mentioning the need for further studies to obtain a better understanding of the mechanisms involved in the neurobiology of PTSD associated with DMT1.

Keywords: Diabetes *mellitus*. Extinction. Generalization. Aversive memory. Streptozotocin. Fear.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mecanismo de ação da STZ no modelo animal de DMT1	16
FIGURA 2: Efeito benéfico dos iFDE4 na neuroproteção	22
FIGURA 3: Esquema representativo do CMC	26
FIGURA 4: Delineamento experimental de (A) comportamento e (B) western blot...	28
FIGURA 5: Efeito do tratamento de 21 dias com RFL ou VEI na condição diabética; (glicose sanguínea – painel A - e ganho de peso – painel B)	30
FIGURA 6: Efeito do tratamento de 21 dias com o RFL ou VEI no tempo de congelamento no treino de extinção (painel A), no teste de extinção (painel B) e no teste de generalização (painel C) nos animais diabéticos ou normoglicêmicos	32
FIGURA 7: Efeito do tratamento de 21 dias do RFL nos níveis de BDNF no hipocampo.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

5-HT	- serotonina
AMP	- adenosina - 3', 5' - monofosfato
AMPc	- adenosina - 3', 5' - monofosfato cíclico
ANOVA	- análise de variância (do inglês, <i>analysis of variance</i>)
BDNF	- fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês, <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
CREB	- proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMP cíclico (do inglês, <i>cyclic AMP-response elemento binding protein</i>)
DM	- diabetes <i>mellitus</i>
DMT1	- diabetes <i>mellitus</i> tipo-1
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DSM-V	- Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição (do inglês, <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5</i>)
EPM	- erro padrão da média
FDE4	- fosfodiesterase-4
GLUT2	- transportador de glicose tipo 2
HLA	- antígeno leucocitário humano (do inglês, <i>human leukocyte antigen</i>)
HPA	- eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IDF	- Federação Internacional do Diabetes (do inglês, <i>International Diabetes Federation</i>)
iFDE4	- inibidor de FDE4
IL-10	- interleucina-10
i.p.	- intraperitoneal
NA	- noradrenalina
pCREB	- CREB fosforilado (do inglês, <i>phosphorylated CREB</i>)
PIB	- produto interno bruto
PKA	- proteína quinase A (do inglês, <i>protein kinase A</i>)
RFL	- Roflumilaste
ROS	- espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
SER-133	- serina na posição 133
STZ	- estreptozotocina (do inglês, <i>streptozotocin</i>)

- TBS-T - salina tamponada tris com tween 20 (do inglês, *Tris Buffered Saline with Tween 20*)
- TEPT - transtorno do estresse pós-traumático
- TNF- α - fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*)
- VEI - veículo
- WHO - Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 DIABETES <i>MELLITUS</i>	13
2.1.1 Diabetes <i>mellitus</i> tipo-1 (DMT1)	14
2.2 COMORBIDADES ASSOCIADAS AO DMT1	16
2.3 TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO E SUA RELAÇÃO COM O DMT1	17
2.3.1 Tratamento do Transtorno do Estresse Pós-Traumático Associado ao DMT1	19
2.4 INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE-4 COMO UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA PARA TRATAR O TEPT ASSOCIADO AO DMT1	20
3 METODOLOGIA	23
3.1 MODELO ANIMAL	23
3.2 DROGAS	24
3.2.1 Indução experimental do DMT1	24
3.2.2 Tratamento prolongado com o iFDE4 RFL	24
3.3 CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL (CMC)	25
3.4 <i>WESTERN BLOT</i> PARA AVALIAR A EXPRESSÃO DE BDNF NO HIPOCAMPO	26
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4 RESULTADOS	30
4.1 CONDIÇÃO DIABÉTICA	30
4.2 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO	31
4.3 NÍVEIS DE BDNF NO HIPOCAMPO	32
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	37
7 REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica de caráter inflamatório, que se apresenta ao lado de diversas comorbidades, sendo considerado um dos distúrbios metabólicos mais prevalentes na população mundial e, portanto, causando um grande impacto econômico e na saúde tanto individual quanto coletiva (IDF, 2019).

Cabe ressaltar que dados apontam uma maior prevalência de psicopatologias na população que sofre com o DM, o que acaba prejudicando muito ambas as condições. Dentre essas psicopatologias, e de interesse para este estudo, destaca-se o transtorno do estresse pós-traumático (TEPT), que parece ter uma importante relação com o DM, havendo maior prevalência deste transtorno na população diabética (TRIEF *et al.*, 2006; MILLER-ARCHIE *et al.*, 2014; MICHOUPOULUS *et al.*, 2015; KELMENDI *et al.*, 2016; SCHERRER *et al.*, 2019). O TEPT é o quarto transtorno psiquiátrico mais comum no mundo e caracteriza-se por situações de ameaça à continuidade da vida e está associado a prejuízos sociais e ocupacionais (YEHUDA *et al.*, 2016; LOPRESTO *et al.*, 2016). Muitos desses pacientes apresentam, ainda, depressão, ansiedade e/ou aumento do uso de drogas podendo levar ao transtorno do uso de substâncias (DE MORAIS *et al.*, 2014, 2016; GAMBETA *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2018; PASTOR *et al.*, 2020).

Atualmente, a farmacoterapia do TEPT é similar ao tratamento farmacológico dos transtornos de ansiedade e depressão, composta por inibidores da recaptação de serotonina (ISRS), cuja eficácia é bastante limitada e não promovem remissão da doença (KRYSTAL *et al.*, 2017). Ademais, sabe-se que algumas drogas dessa classe apresentam efeitos colaterais que dificultam a aceitação do tratamento, dentre eles a alteração do controle glicêmico, ainda mais difícil para pacientes diabéticos (ISAAC *et al.*, 2013, GAGNON *et al.*, 2018). Sendo assim, o recurso terapêutico mais seguro para o tratamento do TEPT é a psicoterapia de extinção da memória traumática, embora não seja completamente eficaz (MYERS e DAVIS, 2002).

A extinção é um novo aprendizado que inibe a expressão da memória de medo (LOPRESTO *et al.*, 2016; KIDA, 2019). Interessante que estudos conduzidos por nós utilizando animais diabéticos demonstram que estes animais apresentam uma consolidação bastante expressiva de memória aversiva, além de uma dificuldade em extingui-la (DE SOUZA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2020). Assim, tendo em vista a alta prevalência do TEPT em pacientes com DM e as alterações evidenciadas em

modelos animais de DMT1, torna-se interessante a busca por fármacos que facilitem a extinção dessa memória traumática.

Os inibidores de fosfodiesterase-4 (iFDE4) tem sido uma importante alternativa para o tratamento de distúrbios psiquiátricos e/ou cognitivos, dada a capacidade desses fármacos em estimular vias moleculares de plasticidade sináptica e respostas neuroprotetoras. Essas respostas podem estar ocorrendo no organismo via aumento da adenosina monofosfato cíclico (AMPc), e via ativação da cascata de sinalização da proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB e CREB fosforilado – pCREB), em estruturas cerebrais envolvidas na mediação de respostas emocionais, permitindo um novo aprendizado de extinção da memória traumática (MIAO *et al.*, 2015; JABARIS *et al.*, 2015; PRICKAERTS *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2016; FENG *et al.*, 2019). O pCREB, por sua vez, auxilia na síntese de várias proteínas, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), um fator de crescimento altamente responsável pela plasticidade sináptica e respostas anti-inflamatórias (GUZZARDI *et al.*, 2018; BATHINA *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2016).

Levando em consideração os mecanismos comuns e paralelos de desenvolvimento e manifestação do TEPT e do DM, e a problemática envolvida com a farmacoterapia atual, se faz necessário o estudo de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do TEPT associado ao DM, bem como um maior entendimento do mecanismo neurobiológico de manifestação deste transtorno psiquiátrico e sua associação ao DM, mais especificamente ao diabetes *mellitus* tipo-1 (DMT1), devido à ausência de estudos nessa temática.

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo avaliar, em um modelo animal de DMT1 induzido por estreptozotocina, o efeito do tratamento prolongado com o iFDE4 roflumilaste sobre o processamento de memória de medo ao contexto e sobre o nível de BDNF no hipocampo, a fim de explorar uma proposta de alternativa terapêutica para respostas aversivas associadas ao diabetes.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em animais com o DMT1 induzido experimentalmente:

- O efeito do tratamento prolongado com iFDE4 sobre a formação da memória de medo ao contexto;
- O efeito do tratamento prolongado com iFDE4 sobre a extinção da memória de medo ao contexto;
- O efeito do tratamento prolongado com iFDE4 sobre a generalização da memória de medo ao contexto;
- O efeito neuroprotetor do roflumilaste através da expressão de BDNF no hipocampo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DIABETES MELLITUS

O DM é um distúrbio metabólico crônico, cuja principal característica é o elevado nível de glicemia. Devido a essa condição, os principais sintomas concernem polifagia, polidipsia e poliúria (aumento da fome, sede e da vontade de urinar, respectivamente; *American Diabetes Association - ADA*, 2017). Tal doença é dividida em três tipos principais: tipo 1, relacionada à destruição de células β pancreáticas de forma autoimune e, por consequência, incapacidade em produzir e secretar insulina para promover o armazenamento ou uso de glicose pelas células (GUTHRIE e GUTHRIE, 2004); tipo 2, caracterizada por resistência à insulina e deficiência na produção desse hormônio em graus variados; e gestacional, em que ocorre hiperglicemia e piora da tolerância à glicose durante a gravidez; além de outras variações do diabetes, como endocrinopatias, diabetes induzido por medicação e por infecções (KERNER e BRÜCKEL, 2014; EIZIRIK *et al.*, 2020).

Em seu relatório global, a Federação Internacional do Diabetes (*International Diabetes Federation – IDF*) estimou que mais de 463 milhões de pessoas apresentaram DM em 2019, sendo 32 milhões na América Latina e quase 17 milhões no Brasil. Tal prevalência resultou em um gasto de US\$760 bilhões anuais para os sistemas de saúde no mundo inteiro, representando um aumento de quase 5% em apenas 2 anos (SAEEDI *et al.*, 2019), além da perda de 1,3 trilhões de dólares para os PIBs à nível global (WHO, 2016; BOMMER *et al.*, 2017). No Brasil, quinto país no mundo com maior número de diabéticos, os gastos correspondem a 52,3 bilhões de dólares anuais, o dobro do valor apresentado em 2017 e aproximadamente 2,9% do

PIB nacional (IDF, 2019). Esse gasto se deve tanto ao diagnóstico, muitas vezes tardio, quanto a tratamentos e complicações relacionadas à doença.

Apesar do gasto e do progresso em novas estratégias terapêuticas, ainda não há tratamento eficaz que culmine na cura do diabetes. Essa doença está entre as 10 principais causas de morte no mundo, ocorrendo cerca de 1 morte a cada 8 segundos, fato que resultou em 4,2 milhões de óbitos em 2019, segundo a IDF (IDF, 2019). Ainda, sabe-se que essa patologia está associada a muitas comorbidades, como doenças cardiovasculares; neuropatias; retinopatias e até distúrbios cognitivos e psicopatologias (TRIEF et al., 2006; DIMEGLIO et al., 2018; ARMBRECHT et al., 2020).

2.1.1 Diabetes *mellitus* tipo-1 (DMT1)

De acordo com a IDF, o DMT1 tem uma prevalência de 10%, enquanto o DM tipo-2 de 90%. É muito comum que o DMT1 esteja presente em crianças, porém, tendo em vista seu caráter genético de manifestação da doença, a maior parte da população que apresenta esse distúrbio atualmente é adulta (WHO, 2019). Ainda, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization – WHO*), o DMT1 afeta homens e mulheres igualmente, e reduz a expectativa de vida em 13 anos. Estudos mostram que há uma interação sinérgica entre a resposta autoimune e os fatores metabólicos de disfunção das células β na produção da insulina, determinada a partir da predisposição genética do indivíduo e de fatores ambientais (ANTONIOLLI et al., 2015; WHO, 2019).

Sabe-se que o caráter genético envolvido na ocorrência desse distúrbio é derivado de atividade poligênica; ou seja, diversos genes mutados contribuem para a ativação de uma resposta autoimune de destruição das células β pancreáticas e consequente desenvolvimento da doença (ALY et al., 2006; ACHARJEE et al., 2013; SANTIN e EIZIRIK, 2013; HU et al., 2015; SKYLER et al., 2017; RUSSELL et al., 2019; EIZIRIK et al., 2020). Ainda, apesar de sua prevalência ser em torno de 10%, no último século foi observado um aumento na incidência de DMT1 na população mundial, fato que indica possíveis gatilhos ambientais para essa patologia, como infecções virais que são amplamente conhecidas por modificarem a expressão gênica e contribuem para ativação do sistema imune no DMT1 (DOTTA et al., 2006; SANTIN e EIZIRIK, 2013). Tem-se, também, relatos de infecção materna enteroviral no

período de gestação; microbiota anormal; eventos estressores infantis; além da possibilidade de fatores como a puberdade e estresse psíquico levarem a uma maior progressão do DMT1 (GALE, 2002).

Como resultado da combinação de todos esses efeitos, ocorrem erros na formação de receptores; no reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T; na produção da insulina e até mesmo o mimetismo molecular, que sinalizarão peptídeos das células β como autoantígenos, gerando uma reação autoimune de hipersensibilidade do tipo IV e, conseqüentemente, produzindo lesão tecidual no pâncreas, visto que a atividade de linfócitos citotóxicos e macrófagos libera enzimas lisossomais, espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, que levam a célula à apoptose (UZZAMAN e CHO, 2012; ILONEN et al., 2019). Assim, ocorre o declínio da função ou completa destruição das células β nas ilhotas de Langerhans que deveriam produzir insulina, fator determinante no DMT1 (UZZAMAN e CHO, 2012; DIMEGLIO et al., 2018; WHO, 2019; ILONEN et al., 2019). Importante ressaltar ainda que o DMT1 não é evitável, diferentemente do tipo 2, para o qual existem recomendações de políticas públicas e mudanças de hábitos de vida que reduzem sua prevalência (WHO, 2016; IDF, 2019). Ou seja, mais do que avanços políticos e transformações de comportamentos, no atual cenário, o DMT1 necessita de avanços na área médica para que se diminua seu impacto na vida do paciente e no contexto mundial.

Estudos pré-clínicos conduzidos em laboratório mimetizam a destruição das células β através de uma droga denominada estreptozotocina (STZ). A STZ é uma glicosamina nitrosureia, molécula hidrofílica de meia-vida curta (5 a 15 minutos), captada pelas células pancreáticas que contêm o transportador GLUT2 (GOYAL et al., 2016). Ao adentrar na célula β , a STZ induz alterações bioquímicas, estruturais e funcionais que culminam na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e resultam no dano ao DNA e destruição celular, gerando o efeito de hiperglicemia (Figura 1; WU e YAN, 2015; GOYAL et al., 2016). Apesar da cascata de eventos não ser a mesma que a observada em humanos, visto que a STZ não ativa uma resposta imune igual o DMT1, os modelos animais se mostram bastante promissores por resultarem no efeito esperado de hiperglicemia, que mimetiza algumas características da doença. Importante mencionar que a STZ não é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE), visto que o tecido cerebral não apresenta este transportador GLUT2 e, portanto, se mostra seletiva ao tecido pancreático (GRIEB, 2016).

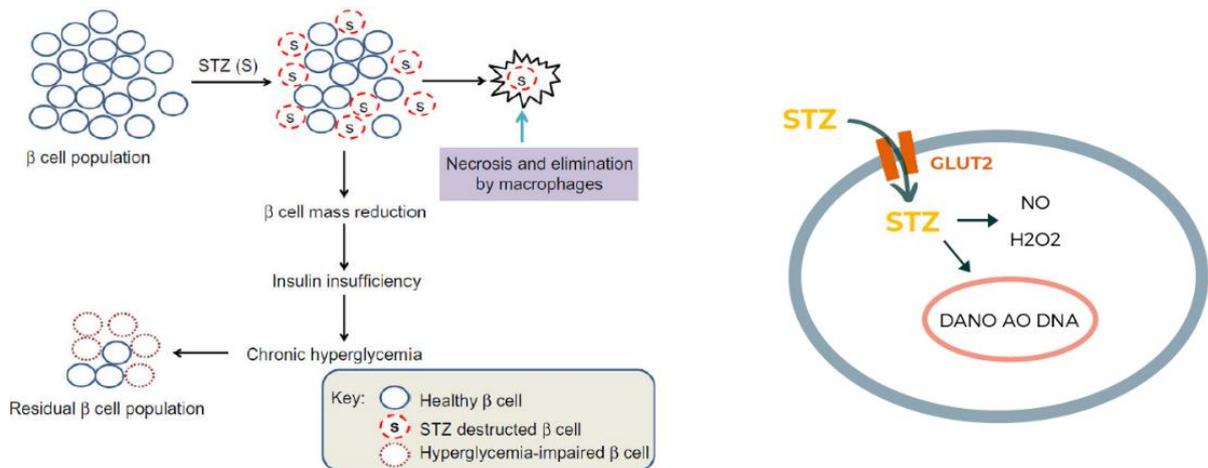


FIGURA 1: Mecanismo de ação da STZ no modelo animal de DMT1.

FONTE: Adaptado de Wu and Yan, 2015; O autor, 2021.

2.2 COMORBIDADES ASSOCIADAS AO DMT1

Sabe-se que o DM *per se* induz um aumento de processos inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a nível central e sistêmico, além de desregulação neuroquímica, levando a diversas comorbidades, tanto em humanos como em modelos animais (DE SOUZA *et al.*, 2018; DA SILVA DIAS *et al.*, 2016; GAMBETA *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2020). Dessa forma, a incidência do DM na população apresenta-se ao lado de uma elevada taxa de prevalência de outros estados patológicos, como encefalopatias diabéticas (MURIACH *et al.*, 2014), doenças cardiovasculares (DEI CAS *et al.*, 2015; AVILA *et al.*, 2014), insuficiência renal (BRAUNWALD, 2019) e neuropatia diabética (SCHREIBER *et al.*, 2015); prejudicando ainda mais a qualidade de vida dos pacientes.

As alterações de processos inflamatórios e neuroquímicos associadas na encefalopatia diabética podem precipitar respostas e doenças associadas ao humor, ansiedade, estresse e prejuízo cognitivo (MIAO *et al.*, 2015; ZHONG *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018). Dessa forma, há alta prevalência de distúrbios psiquiátricos na população diabética, como transtornos de ansiedade, depressão maior e aumento do abuso de drogas (MILLER-ARCHIE *et al.*, 2014; DE MORAIS *et al.*, 2014, 2016; ZANOVELLI *et al.*, 2016; SIBA *et al.*, 2017; GILSANZ *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018; BODEN, 2018; EDMEALEM e OLIS, 2020). Ainda, tem-se prejuízo significativo no

aprendizado/memória, evento presente em alguns transtornos psiquiátricos, mas principalmente no TEPT, tópico de interesse neste estudo.

2.3 TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO E SUA RELAÇÃO COM O DMT1

O TEPT é o quarto transtorno psiquiátrico mais comum no mundo, acometendo cerca de 10% dos homens e 18% das mulheres, e está associado à exposição do indivíduo a um evento traumático (MAREK *et al.*, 2013). Nesse evento, em que houve ameaça à continuidade da vida ou causou danos à saúde, gerou-se uma resposta intensa de medo, desamparo ou horror, causando potenciais prejuízos sociais e ocupacionais (YEHUDA *et al.*, 2016; LOPRESTO *et al.*, 2016). De acordo com o DSM-V, é comum a apresentação de sintomas que facilitam o diagnóstico do TEPT, como lembranças e sonhos angustiantes relacionados ao evento traumático; reações psicológicas e fisiológicas a pistas que possam lembrar ou simbolizar o evento e sensações de estar vivendo novamente o evento, chamada de generalização do medo (*American Psychiatric Association – APA*, 2014). A generalização ocorre em ambientes neutros – não associados ao trauma (APA, 2014). Como consequência ao ocorrido, observa-se a formação de uma memória aversiva relacionada ao trauma, em que os pacientes apresentam dificuldade em extingui-la (RUBIN *et al.*, 2008), podendo até mesmo generalizar essa reação de medo.

Pesquisadores entendem a extinção como um novo aprendizado que coexiste com a memória de medo, mas é capaz de inibir sua expressão (KIDA, 2019). Ou seja, a memória aversiva permanece existindo, porém, alguns mecanismos moleculares favorecem a plasticidade sináptica direcionando um novo aprendizado – que aquele estímulo ou ambiente não é mais aversivo. Dentre esses mecanismos moleculares, observa-se que o AMPc, importante segundo mensageiro envolvido em cascatas de sinalização intracelular, é capaz de ativar a proteína quinase A (PKA), que, por sua vez, fosforila a CREB no resíduo 133 de serina (ser-133), ativando-a em pCREB (GONG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2012; PRICKAERTS *et al.*, 2016). A pCREB, então, ativa fatores de transcrição envolvidos em respostas de plasticidade sináptica e neuroproteção (FENG *et al.*, 2019). Entre estes fatores, destaca-se o BDNF, expresso nos mais diversos tecidos, principalmente pancreático e encefálico (em estruturas como córtex e hipocampo; ANDERO e RESSLER; 2012, FENG *et al.*, 2019,

ROZANSKA *et al.* 2020). O BDNF, em um contexto saudável, apresenta efeitos fisiológicos de regulação do metabolismo da glicose, resistência à insulina, plasticidade sináptica e neuroproteção (NAKAGAWA *et al.*, 2000; ANDERO e RESSLER, 2012; HE *et al.*, 2018; ROZANSKA *et al.*, 2020) e, portanto, o BDNF apresenta um papel protetor contra danos oxidativos, que permite a viabilidade celular e impede a apoptose (BATHINA *et al.*, 2016; ROZANSKA *et al.*, 2020; BATHINA e UNDURTI, 2021). Dessa forma, é possível perceber a importância da ativação da via AMPc/PKA/CREB. Quando a concentração de AMPc está reduzida, essa via de sinalização torna-se inviável, pois reduz a expressão de proteínas envolvidas nos mecanismos de extinção da memória aversiva e de neuroproteção.

Não obstante, a CREB também recruta a transcrição de citocinas, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e aumentando a produção das citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10; SZELÉNYI *et al.*, 2000; AVNI *et al.*, 2010), evidenciando um possível mecanismo de controle da neuroinflamação.

Vários estudos têm mostrado que o balanço entre a CREB e a pCREB está envolvido na regulação do aprendizado/memória e nas respostas inflamatórias hipocámpais em modelos animais da doença de Alzheimer (GONG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2012). Sugere-se, ainda, que a CREB está envolvida na memória de longo prazo dependente de hipocampo (TULLY *et al.*, 2003; ORTEGA-MARTÍNEZ, 2015), e, portanto, a redução tanto de CREB como pCREB e BDNF está associada ao prejuízo da memória e da plasticidade sináptica (LONZE e GINTY 2002; VITOLO *et al.*, 2002), enquanto que seu aumento e o consequente aumento de BDNF podem ser alvos promissores para reduzir a neuroinflamação e melhorar a plasticidade sináptica, aprendizagem e memória, que é de interesse no tratamento do TEPT.

Tendo dito isso, é curioso que a prevalência de TEPT em pacientes com DMT1 é maior. Estudos clínicos e pré-clínicos evidenciam que, assim como os transtornos de ansiedade, o TEPT apresenta importante relação com o risco do aparecimento do DM, inclusive sendo um fator bidirecional, já que se observam mecanismos comuns e paralelos nessas doenças (TRIEF *et al.*, 2006; GOLDEN *et al.*, 2008; ŞIŞMANLAR *et al.*, 2012; KARROURI, 2014; MILLER-ARCHIE *et al.*, 2014; MICHOUPOULUS *et al.*, 2015; RENNA *et al.*, 2016; ZANOVELI *et al.*, 2016; RECHENBERG *et al.*, 2018; SCHERRER *et al.*, 2019). Um dos mecanismos comuns entre elas é a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) que, de forma prolongada, pode facilitar o

desenvolvimento de resistência à insulina; doenças cardiovasculares; desregulações neuroquímicas como a diminuição de monoaminas importantes para etiologia do TEPT (5-HT e NA) e desregulações no sistema imunológico (KELMENDI *et al.*, 2016; PETRAK *et al.*, 2018). Todavia, ainda não há comprovações de que este é o mecanismo desencadeador de ambas as doenças.

Ademais, estudos recentes do nosso laboratório mostraram que os animais com DMT1 apresentam uma consolidação bastante expressiva da memória contextual aversiva, uma vez que eles apresentam uma deficiência em extingui-la e têm capacidade de generalizar esta resposta de medo (DE SOUZA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2020). Por isso, torna-se importante o entendimento mais aprofundado da neurobiologia do TEPT em animais com DMT1, aliado à busca por novos agentes terapêuticos capazes de agir em alvos farmacológicos mais específicos e que facilitem a extinção dessa memória traumática. O desenvolvimento destes modelos experimentais é essencial e está em constante atualização, devido à relevância translacional que traz para o estudo de transtornos psiquiátricos.

2.3.1 Tratamento do Transtorno do Estresse Pós-Traumático Associado ao DMT1

De acordo com o desenvolvimento e complicações do TEPT, principalmente quando associado ao DMT1, o tratamento é um grande desafio para os pacientes diabéticos. Normalmente, as drogas de primeira escolha para psicopatologias como o TEPT e transtornos de ansiedade são os antidepressivos monoaminérgicos, principalmente os ISRS, como sertralina e fluoxetina (HUANG *et al.*, 2013; ZANOVELI *et al.*, 2016). Apesar de promissores no mercado, tais antidepressivos não promovem remissão da doença. Além disso, muitos pacientes não respondem bem ao tratamento – são resistentes e/ou refratários, o que evidencia a eficácia limitada desta abordagem. Os antidepressivos normalmente utilizados também podem precipitar efeitos colaterais indesejáveis, como alterações na pressão sanguínea, alterações de peso e disfunção sexual, e estes efeitos adversos podem acarretar na descontinuidade do uso do medicamento (ROOPAN e LARSEN, 2016). Inclusive, esses medicamentos podem prejudicar o controle glicêmico (ISAAC *et al.*, 2013; KRYSTAL *et al.*, 2017) e interagir com drogas hipoglicemiantes (GHAEI *et al.*, 2004; BARNARD *et al.*, 2013; GAGNON *et al.*, 2018), conseqüentemente piorando o quadro de diabetes.

Estudos recentes alertaram que, mesmo antidepressivos diferentes dentro da mesma classe, como os ISRS, podem alterar o controle glicêmico tanto para hiperglicemia como para hipoglicemia, associados a ganho ou perda de peso, dependendo do fármaco (BRISCOE *et al.*, 2008; ISAAC *et al.*, 2013; ROOPAN e LARSEN, 2016; GAGNON *et al.*, 2018). Tais evidências indicam que tanto a pesquisa acerca do TEPT associada ao DMT1 como a busca por tratamentos mais eficazes são de extrema necessidade. Por enquanto, a principal ferramenta de tratamento do TEPT é através da psicoterapia de reexposição ao evento traumático. Essa abordagem, que se baseia nos mecanismos neurobiológicos de extinção da memória traumática (MYERS e DAVIS, 2002), apresenta diferentes etapas reexposição ao evento traumático, de forma a minimizar os sintomas apresentados no TEPT (RAUCH, EFTEKHARI, RUZEK, 2012; APA, 2014). Mesmo que promissora, essa estratégia não é inteiramente eficaz, visto que demanda muito tempo para observação de resultados. Somado a isso, não se sabe completamente a neurobiologia do TEPT, e, portanto, não há uma cura para tal distúrbio.

Com base no exposto, a busca por tratamentos mais eficazes, com respostas terapêutica rápida e que não alterem a condição diabética se faz urgente.

2.4 INIBIDORES DE FOSFODIESTERASE-4 COMO UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA PARA TRATAR O TEPT ASSOCIADO AO DMT1

As fosfodiesterases (FDEs) são uma superfamília de enzimas – são onze famílias no total – cada uma com múltiplas isoformas e variantes, que degradam segundos mensageiros cíclicos em diferentes estruturas do organismo. As FDEs degradam, por hidrólise, AMPc em 5'AMP e/ou GMPc em 5'GMP, fazendo parte de cascatas que regulam canais iônicos, enzimas e mudanças na transcrição e tradução de proteínas (NEVES-ZAPH, 2017). Utilizando inibidores de FDEs, o AMPc permanece mais tempo disponível na cascata celular e pode regular mais proteínas e ações intracelulares (WANG *et al.*, 2016).

A FDE4 é uma isoforma de FDE específica para AMPc, e está amplamente distribuída no encéfalo, em estruturas como o hipocampo, córtex, bulbo olfatório, corpo estriado e cerebelo (WANG *et al.*, 2016; BLOKLAND *et al.*, 2019; HECKMAN *et al.*, 2018). Por estar presente em estruturas relacionadas à formação de memória, a FDE4 faz parte desse processo, uma vez que a sua inibição aumenta a expressão de

proteínas como CREB e Arc, envolvidas na plasticidade sináptica e relacionadas ao aprendizado e memória (KNOTT *et al.*, 2017; HECKMAN *et al.*, 2018).

O uso de iFDE4 têm sido recentemente apontado como uma importante alternativa para o tratamento de doenças psiquiátricas, dada a capacidade desses fármacos em estimular a plasticidade sináptica via aumento do AMPc e ativação da via de sinalização da CREB e da pCREB em estruturas cerebrais envolvidas na mediação de respostas emocionais (como córtex pré-frontal, amígdala e hipocampo), resultando em efeitos neuroprotetores e pró-cognitivos (Figura 2; SOARES *et al.*, 2016; BLOKLAND *et al.*, 2019; ZHONG *et al.*, 2019).

Essas propriedades colocam fármacos iFDE4 na classificação de drogas que aumentam o aprendizado, os “*cognitive enhancers*” (RICHTER *et al.*, 2013). Todavia, permanece por ser investigado o efeito da inibição da FDE4 sobre a extinção e a generalização da memória de medo em animais diabéticos e, mais ainda, sobre a persistência desses efeitos. Sabendo disso, dois trabalhos foram conduzidos em modelos animais de DMT2 (MIAO *et al.*, 2015; ZHONG *et al.*, 2016), e mostraram que o tratamento com Rolipram, um iFDE4 (GONG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2012), foi capaz de aumentar a expressão de CREB e pCREB no hipocampo e diminuir a reação inflamatória, prevenindo os prejuízos cognitivos de memória espacial nestes animais. Todavia, até o presente momento nenhum estudo investigou o envolvimento da via de sinalização AMPc/PKA/CREB e de drogas capazes de interferir na via de formação de memórias aversivas em modelos animais de DMT1.

Já o trabalho de Soares e colaboradores (2016) mostrou como o uso do Rolipram em animais com isquemia cerebral (outro modelo animal de caráter inflamatório) também foi capaz de promover efeitos tipo-antidepressivos e tipo-ansiolíticos, além de uma melhora na memória espacial através do aumento de CREB e pCREB hipocampal (SOARES *et al.*, 2016). Isso evidencia o efeito promissor dos inibidores de FDE4 tanto na plasticidade sináptica como na redução da

neuroinflamação (PEARSE *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2019), faltando a análise de fatores protetores, como o BDNF.

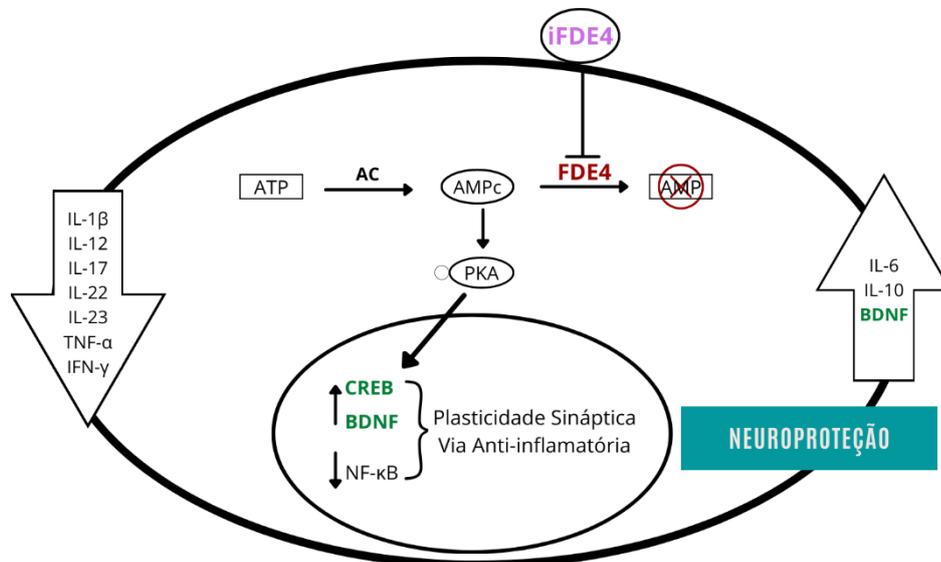


FIGURA 2: Efeito benéfico dos iFDE4 na neuroproteção.

FONTE: Adaptado de Wang *et al.*, 2017.

Sabendo que alguns trabalhos mostram o efeito emético do Rolipram (PRICKAERTS *et al.*, 2016), o Roflumilaste (RFL), outro iFDE4 seletivo para AMPc, se mostra promissor na melhora cognitiva e redução da neuroinflamação, inclusive em suas doses não eméticas – mais baixas (PRICKAERTS *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2018). O RFL é conhecido no tratamento para doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e asma (LI *et al.*, 2018), e vários estudos mostraram eficácia na melhora do déficit cognitivo em modelos de doença de Alzheimer; lesão encefálica induzida por hipoperfusão crônica, além de mostrar significativas melhoras em aspectos inflamatórios, diminuindo citocinas pró-inflamatórias; e de plasticidade neuronal, aumentando níveis do BDNF (MIAO *et al.*, 2015; JABARIS *et al.*, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2018; FENG *et al.*, 2019). Importante destacar, ainda, que o RFL atravessa a BHE, de acordo com suas propriedades estruturais e farmacocinéticas, e, por isso, seu uso é promissor na neuroproteção (LAHU *et al.*, 2011; PRICKAERTS *et al.*, 2016; TAKANO *et al.*, 2018).

Já em modelos de DMT1 e de memória aversiva, as drogas iFDE4 ainda não foram testadas, e parecem ter efeitos positivos e promissores para melhora destas condições psicopatológicas, além de diminuir inflamação e aumentar plasticidade neuronal. Dessa forma, a hipótese do trabalho foi de que o RFL seria capaz de

amenizar os prejuízos no processamento de memória associada ao medo nesses animais DMT1. Mais ainda, melhorar a condição diabética *per se*, além de promover ação neuroprotetora, como facilitar a plasticidade sináptica, através do aumento da expressão proteica de BDNF no hipocampo desses animais.

3 METODOLOGIA

Todos os procedimentos apresentados neste projeto foram conduzidos de acordo com as normas e legislações contidas pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, minimizando o número de animais utilizados e o sofrimento por eles sentido. A metodologia apresentada neste projeto foi aprovada (CEUA/BIO-UFPR; #1204).

Cada bloco de experimentos foi realizado no mesmo período do dia, entre 11 e 17 horas. Todos os animais foram ambientados por pelo menos 30 minutos antes de cada sessão experimental. As salas de experimentação mantiveram constância na temperatura e luminosidade durante os experimentos.

3.1 MODELO ANIMAL

Nesta pesquisa, foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* (variedade *Wistar*), com aproximadamente 60 dias e pesando entre 150 - 220 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. A escolha desta espécie se deu porque tanto a padronização de modelo de DMT1 quanto os estudos realizados em nosso laboratório utilizaram ratos *Wistar* (DE MORAIS *et al.*, 2014; DA SILVA DIAS *et al.*, 2016; REDIVO *et al.*, 2016; DE MORAIS *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2020). Ainda, o uso desses animais foi preferencial devido à disponibilidade do biotério, além de que os machos não apresentam variações hormonais que podem gerar dúvida nos resultados do estudo.

Os animais tiveram acesso a água e alimentação (ração Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes S/A) *ad libitum* e foram mantidos em condições controladas de iluminação, com ciclo claro/escuro de 12 h (7:00 às 19:00); e temperatura, em 22 ± 1 °C. Foram acondicionados quatro ratos em cada caixa de polipropileno (60 x 25 x 15 cm) contendo maravalha, trocada diariamente devido a poliúria induzida pela condição diabética.

3.2 DROGAS

Para o presente estudo foram utilizadas as seguintes drogas: a estreptozotocina (STZ, Cayman) e o roflumilaste (RFL, recebido da parceria do laboratório com a Universidade de Maastricht, na Holanda). A STZ (60 mg/kg; via intraperitoneal – i.p.) foi diluída em tampão citrato (10mM, pH 4.5). O RFL foi diluído em salina estéril (NaCl 0,9%) e polisorbato 80 10% (Tween-80®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; i.p.) resultando nas doses de 0,01; 0,03 ou 0,1 mg/kg. As dosagens selecionadas foram baseadas nos resultados existentes da literatura (DA SILVA DIAS *et al.*, 2016; REDIVO *et al.*, 2016; DE MORAIS *et al.*, 2016; PRICKAERTS *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2018; SOHN *et al.*, 2020). Os animais controle foram tratados apenas com salina estéril.

3.2.1 Indução experimental do DMT1

O diabetes foi induzido por uma única injeção i.p. de STZ em ratos previamente submetidos a jejum de 12 horas. Após a indução, os animais foram mantidos por mais 3 horas em jejum, a fim de se evitar a competição da STZ com a glucose pelo transportador GLUT2 na célula β pancreática. Animais destinados ao grupo normoglicêmico receberam somente tampão citrato, em volume equivalente (DE MORAIS *et al.*, 2014).

A condição diabética foi confirmada 3 dias após o tratamento com STZ por meio da aplicação de 5 μ L de sangue – retirado da cauda – a fitas de teste impregnadas com glucose oxidase (Accu-Check Active™, Roche). Ratos com glicemia \geq 250 mg/dL foram considerados diabéticos e mantidos no estudo.

3.2.2 Tratamento prolongado com o iFDE4 RFL

O tratamento prolongado com o RFL iniciou-se no sétimo dia após indução do diabetes, e durou até o vigésimo oitavo dia de experimento (ver delineamento experimental abaixo), totalizando 21 dias. Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos de tratamento: veículo (VEI) ou RFL (0,01; 0,03 ou 0,1 mg/kg, i.p.). Nos grupos de animais que passaram por testes comportamentais, entre os dias 25 e 28, o tratamento ocorreu após o término da sessão experimental, a fim de evitar

a possibilidade de o fármaco interferir nestes resultados, ou seja, de avaliarmos a ação aguda do fármaco.

3.3 CONDICIONAMENTO DE MEDO CONTEXTUAL (CMC)

Para mimetizar características do TEPT e transtornos de ansiedade, foi utilizado o modelo de CMC, que auxilia na compreensão dessas patologias (VANELZAKKER *et al.*, 2014), junto a um protocolo de generalização; visto que a generalização do medo é um processo fundamental do TEPT e é um sintoma prevalente nos pacientes (APA, 2014; DYMOND *et al.*, 2015).

Foi utilizada uma caixa (contexto A; 26 x 31,5 x 21 cm; Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) composta de três lados de aço e um quarto lado de acrílico transparente, que permitiu a análise comportamental do animal por meio de filmagens. O fundo da caixa consiste em pequenas barras de metal conectados a um estimulador elétrico que pode aplicar correntes elétricas nos animais, e o topo é feito de acrílico transparente. Para o teste de generalização (contexto B), foi utilizada uma segunda caixa feita completamente de acrílico transparente (30 x 30 x 30 cm).

O protocolo de CMC consiste nas seguintes etapas (Figura 3):

- 1º dia - familiarização ao contexto de condicionamento (contexto A – estímulo neutro): consiste em uma apresentação do animal à caixa de condicionamento supracitada, na qual ele foi colocado por 3 minutos sem qualquer apresentação de estímulos;

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

- 3º dia - treino de extinção da memória aversiva contextual (contexto A – estímulo condicionado): O animal foi inserido na caixa de condicionamento e lá permaneceu por 20 minutos sem a apresentação do estímulo aversivo de choque elétrico nas patas. Neste procedimento foi avaliado o tempo (em segundos) que o animal permaneceu em congelamento.

- 4º dia - teste de extinção de memória aversiva contextual (contexto A – estímulo condicionado): O animal foi recolocado na caixa de condicionamento por 3 minutos e novamente foi quantificado o tempo de congelamento do animal.

- 5º dia - teste de generalização de memória aversiva contextual (contexto B – estímulo neutro): O teste foi realizado a fim de investigar uma possível resposta de generalização do medo. Assim, o animal foi colocado no contexto neutro por 3 minutos.

O comportamento de congelamento foi utilizado como um índice de memória aversiva ao contexto. Foi considerado tempo de congelamento do animal quando este apresentou uma posição estereotipada de completa imobilidade, com exceção de movimentos de respiração. Após cada uso, os aparatos foram limpos com álcool etílico 20%.

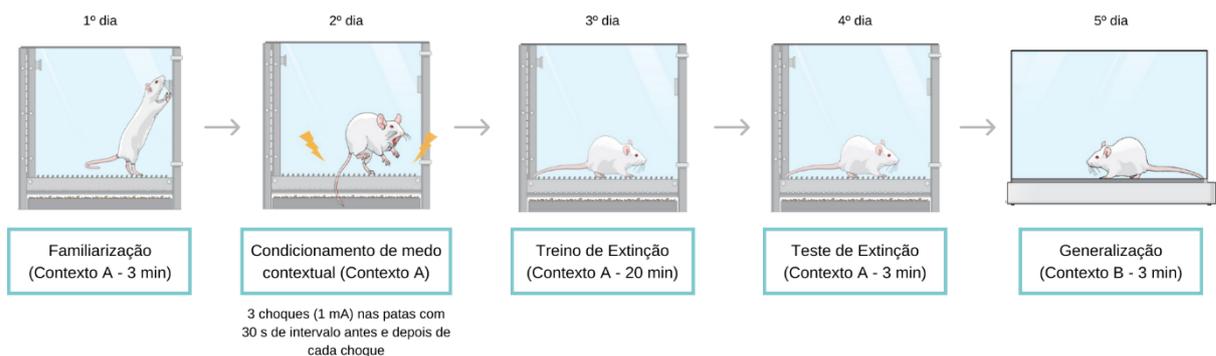


FIGURA 3: Esquema representativo do CMC.

FONTE: O autor, 2020.

3.4 WESTERN BLOT PARA AVALIAR A EXPRESSÃO DE BDNF NO HIPOCAMPO

Para as análises por *western blot* foi realizado um grupo separado, em que os animais foram tratados por 21 dias e não passaram pelo protocolo comportamental. No dia 29, final do protocolo de tratamento, os animais foram decapitados e tiveram o hipocampo removido, que foi mantido em nitrogênio líquido e no freezer -80 °C até a utilização. Os tecidos coletados foram homogeneizados em tampão contendo glicerol 10%, Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 Mm (pH 7,5), e inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e mantidos em repouso por 15 minutos a 4°C. Os tecidos homogeneizados foram então centrifugados a 2.800 rpm por 10 minutos a 4°C, tiveram o sobrenadante (correspondente ao extrato citosólico) separado em novo tubo e centrifugado novamente por 15 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi separado

e os *pellets*, contendo as amostras, foram diluídos para atingir concentrações de proteínas igual a 30 µg e separadas por eletroforese em 10%, 12% e 15% de gel de poliacrilamida e tampão SDS-PAGE. Após essa etapa, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas por uma hora e meia em tampão Tris (25 mM Tris, Glicina 192 mM, 200 mL de metanol, pH 8). Depois da transferência, para realizar o *immunoblotting*, as membranas foram incubadas com leite em pó 5% em salina tamponada tris com tween 20 (TBS-T) em temperatura ambiente por 1 hora, a fim de bloquear sítios de ligação inespecífica. Em sequência, as membranas passaram por três lavagens em TBS-T de 10 minutos cada, e foram incubadas overnight (~16 h) com o anticorpo monoclonal primário anti-BDNF (1:300, Santa Cruz Biotechnology). Mais uma vez, as membranas foram lavadas por três vezes de 10 minutos cada em TBS-T e, então, foram incubadas com anticorpo secundário policlonal (1:2000 em TBS-T; cabra anti-coelho ou coelho anti-camundongo IgG) por 2 horas, seguida de 3 lavagens em TBS-T de 10 minutos cada. Por fim, foi realizada a revelação com kit de quimioluminescência ECLplus® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 10 minutos. As bandas foram visualizadas com auxílio do Chemi-doc (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA), e quantificadas por densitometria usando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA).

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

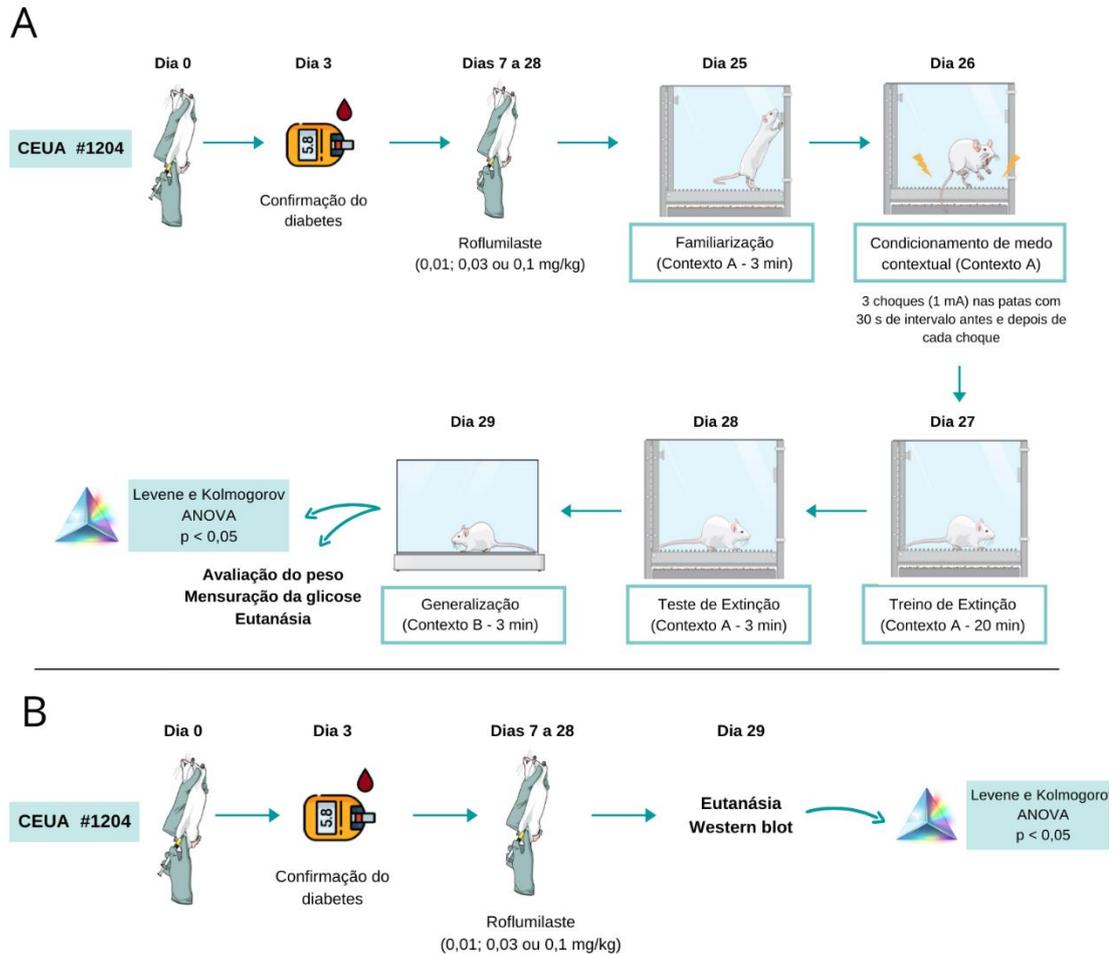


FIGURA 4: Delineamento experimental de (A) comportamento e (B) western blot.

FONTE: O autor, 2021.

No dia 0, os animais – já com jejum de 12 horas – receberam uma única injeção de STZ para a indução do DMT1 experimental. No 3^o dia do protocolo, foi medida a glicemia sanguínea dos animais, considerando diabéticos somente os animais que apresentaram glicemia maior que 250 mg/dL. Os animais diabéticos foram incluídos no estudo e separados em grupos de forma aleatória. A partir do dia 7, até o fim dos experimentos (totalizando 21 dias), foi feito o tratamento com RFL (0,01; 0,03 e 0,1 mg/kg) ou VEI.

No vigésimo quinto dia após a indução do diabetes foi iniciado o protocolo de medo condicionado ao contexto, com a habituação e familiarização. Os animais foram deixados em suas gaiolas por 1h na sala de experimentação para habituação, e em seguida colocados individualmente por 3 minutos no aparato do teste (contexto A) para familiarização, sem qualquer estímulo. No dia 26, os animais foram colocados

novamente no contexto A, e receberam 3 choques nas patas de 1 mA por 3 segundos cada, com 30 segundos de intervalo antes e depois de cada choque. No dia 27, os animais passaram pelo treino de extinção, colocados novamente no contexto A, desta vez por 20 minutos, e não receberam nenhum tipo de estímulo. No dia 28, foi feito o teste de extinção, também no contexto A, por 3 minutos para cada animal. Por fim, no dia 29, os animais foram colocados no contexto B para o teste de generalização, também por 3 minutos. Os testes dos dias 27, 28 e 29 foram filmados para análise do tempo de congelamento. No dia 29, após o teste de generalização, mensurou-se a glicemia e o peso corporal dos animais, e finalizou-se o protocolo com a eutanásia.

O segundo protocolo experimental, que concerne os dados de expressão de BDNF por *western blot*, também conta com os processos de diabetização dos animais e de tratamento prolongado por 21 dias. O que difere é que, neste caso, os animais não passaram pelos testes comportamentais, seguindo apenas com a eutanásia por decapitação e remoção do hipocampo para análise de expressão proteica.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Levene e Kolmogorov foi inicialmente empregado para assegurar que os dados preencheram os critérios necessários de normalidade para se aplicar testes paramétricos. Caso paramétricos, os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 7 animais por grupo experimental. Para os resultados da condição diabética dos animais (glicose sanguínea e ganho de peso) e níveis de BDNF no hipocampo, foi aplicado um teste *t* de Student entre os grupos NGL/VEI e DBT/VEI, e em seguida, uma ANOVA de uma via entre todos os grupos DBT (grupo controle que recebeu veículo, e grupos tratados com RFL). Em relação aos experimentos condicionamento de medo ao contexto, os resultados do teste e treino de extinção e teste de generalização do medo, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias (com tempo e tratamento com o RFL como os fatores da análise).

Após todas as ANOVAs, caso fossem encontradas diferenças estatísticas significativas, o *post-hoc* de Newman-Keuls foi aplicado para múltiplas comparações. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 CONDIÇÃO DIABÉTICA

O tratamento de 21 dias com o RFL foi capaz de alterar os níveis de glicose sanguínea dos animais, mas não alterou o ganho de peso (Figura 5). Em relação à glicose sanguínea, o teste *t* de Student mostrou diferenças significativas entre os grupos NGL/VEI e DBT/VEI [$t = 18,15$; $df = 11$; $p < 0,05$; painel A], confirmando que a injeção de STZ foi capaz de induzir o modelo de DMT1 nos animais. Em seguida, a ANOVA de uma via realizada entre os grupos diabéticos, mostrou diminuições estatisticamente significativas entre o grupo DBT/VEI e os três grupos diabéticos tratados com o RFL [$F(3, 23) = 4,037$; $p < 0,05$; painel A]. O teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls mostrou que as três doses de RFL foram capazes de diminuir a glicose sanguínea dos animais.

Em relação ao ganho de peso, o teste *t* de Student entre os grupos NGL/VEI e DBT/VEI mostrou diferença significativa [$t = 28,75$; $df = 11$; $p < 0,05$; painel B], confirmando que a condição diabética dos animais alterou o ganho de peso nos animais diabéticos. Entre os grupos diabéticos, a ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas para o grupo controle e os grupos tratados [$F(3, 23) = 0,8502$; $p > 0,05$; painel B].

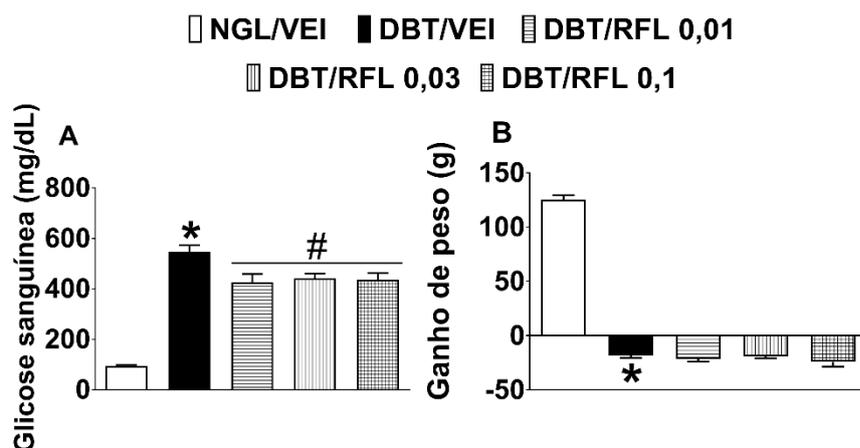


FIGURA 5: Efeito do tratamento de 21 dias com RFL ou VEI na condição diabética; (glicose sanguínea – painel A - e ganho de peso – painel B). NGL = normoglicêmico, VEI = veículo, DBT = diabético, RFL 0,01 = Roflumilaste 0,01 mg/kg, RFL 0,03 = Roflumilaste 0,03 mg/kg, RFL 0,1 = Roflumilaste 0,1 mg/kg. Os valores foram expressos como média \pm EPM ($n = 7$ /grupo), * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NGL/VEI e # $p < 0,05$ quanto comparado com o grupo DBT/VEI.

4.2 CONDICIONAMENTO DE MEDO AO CONTEXTO

O tratamento prolongado com RFL foi capaz de reduzir o tempo de congelamento nos animais diabéticos no treino e teste de extinção, e no teste de generalização do CMC (Figura 6). A ANOVA de duas vias do treino de extinção (painel A) mostrou um efeito estatístico significativo nos dois fatores – tempo [$F(4, 116) = 8,298$; $p < 0,05$] e tratamento com o RFL [$F(4, 29) = 16,97$; $p < 0,05$], mas não mostrou interação entre os dois fatores [$F(16, 116) = 0,732$; $p > 0,05$]. O teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls mostrou uma diferença significativa do grupo NGL em relação aos grupos DBT/VEI nos 5 blocos de 4 minutos ($p < 0,05$; painel B). Entre os grupos DBT tratados com o RFL e o grupo DBT/VEI, não foi observada diferença estatística no primeiro bloco de 4 minutos. A partir do segundo bloco até o quinto, o grupo DBT/RFL 0,01 apresentou diminuição no tempo de congelamento em relação ao grupo DBT/VEI, com diferença estatisticamente significativa. No terceiro, quarto e quinto blocos de 4 minutos, as três doses de RFL foram capazes de diminuir de maneira significativa o tempo de congelamento dos grupos tratados (DBT/RFL 0,01, DBT/RFL 0,03 e DBT/RFL 0,1) em comparação com o grupo que recebeu apenas veículo (DBT/VEI) ($p < 0,05$; painel A).

Em relação ao teste de extinção, o teste t de Student mostrou diferença significativa entre os grupos NGL/VEI e DBT/VEI [$t = 5,983$; $df = 11$; $p < 0,05$], apontando um aumento no tempo de congelamento nos animais DBT/VEI (painel B). A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa quando aplicada entre todos os grupos diabéticos (que receberam veículo e as três doses do RFL) [$F(3, 23) = 7,653$; $p < 0,05$]. O teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls mostrou que o grupo DBT/RFL 0,01 tem o tempo de congelamento diminuído em relação ao grupo DBT/VEI ($p < 0,05$; painel B).

Por fim, no teste de generalização, o teste t de Student mostrou diferença significativa entre os grupos NGL/VEI e DBT/VEI [$t = 7,027$; $df = 11$; $p < 0,05$], indicando um aumento no tempo de congelamento dos animais diabéticos (painel C). A ANOVA de uma via entre os grupos diabéticos (veículo e tratados com RFL) mostrou diferença estatisticamente significativa [$F(3, 23) = 9,825$; $p < 0,05$]. O *posthoc* de Newman-Keuls mostrou diferenças estatísticas em todos os grupos tratados com o

RFL (DBT/RFL 0,01, DBT/RFL 0,03 e DBT/RFL0,01) em relação ao grupo DBT/VEI, indicando que o RFL foi capaz de diminuir o tempo de congelamento nos animais diabéticos tratados ($p < 0,05$; painel C).

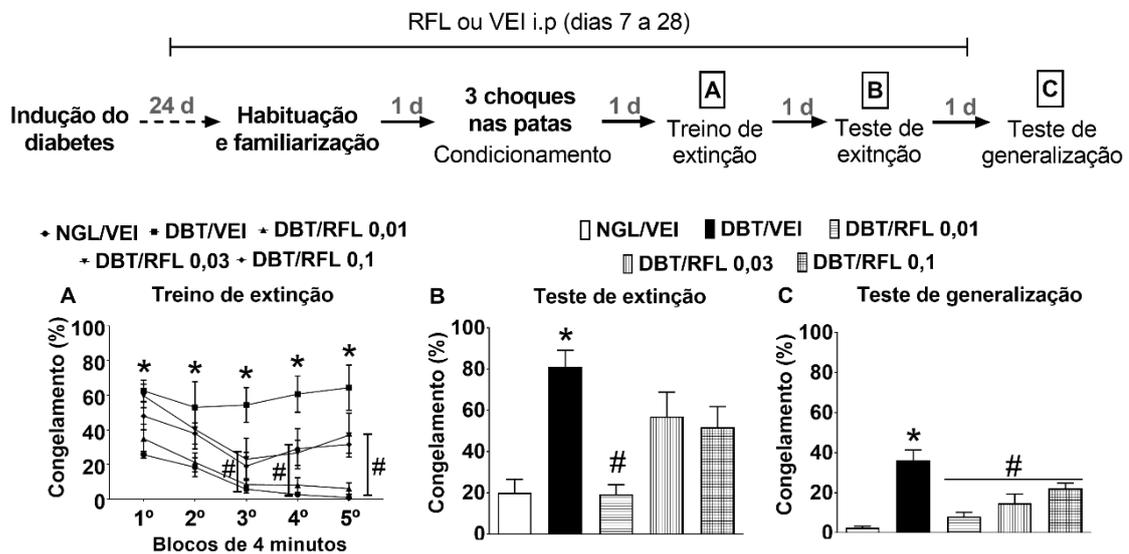


FIGURA 6: Efeito do tratamento de 21 dias com o RFL ou VEI no tempo de congelamento no treino de extinção (painel A), no teste de extinção (painel B) e no teste de generalização (painel C) nos animais diabéticos ou normoglicêmicos. NGL = normoglicêmico, VEI = veículo, DBT = diabético, RFL 0,01 = Roflumilaste 0,01 mg/kg, RFL 0,03 = Roflumilaste 0,03 mg/kg, RFL 0,1 = Roflumilaste 0,1 mg/kg. Os valores foram expressos como a média \pm EPM ($n = 6-7$ /grupo), * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NGL/VEI e # $p < 0,05$ quanto comparado com o grupo DBT/VEI.

4.3 NÍVEIS DE BDNF NO HIPOCAMPO

A diabetes diminuiu os níveis de BDNF no hipocampo dos animais em comparação com os animais normoglicêmicos. O tratamento com o RFL na menor dose, por sua vez, foi capaz de restaurar os níveis de BDNF no hipocampo (Figura 7). O teste *t* de Student mostrou uma diferença significativa entre os grupos NGL/VEI e DBT/VEI [$t = 5,887$; $df = 8$; $p < 0,05$], indicando uma diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo dos animais DBT/VEI. A ANOVA de uma via aplicada entre os grupos diabéticos (veículo e tratados com o RFL) mostrou diferença significativa entre os grupos [$F(2, 12) = 4,301$; $p < 0,05$]. O teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls apontou diferença significativa entre os grupos DBT/VEI e DBT/RFL 0,01, indicando que a menor dose de RFL aumentou os níveis de BDNF no hipocampo dos animais diabéticos ($p < 0,05$).

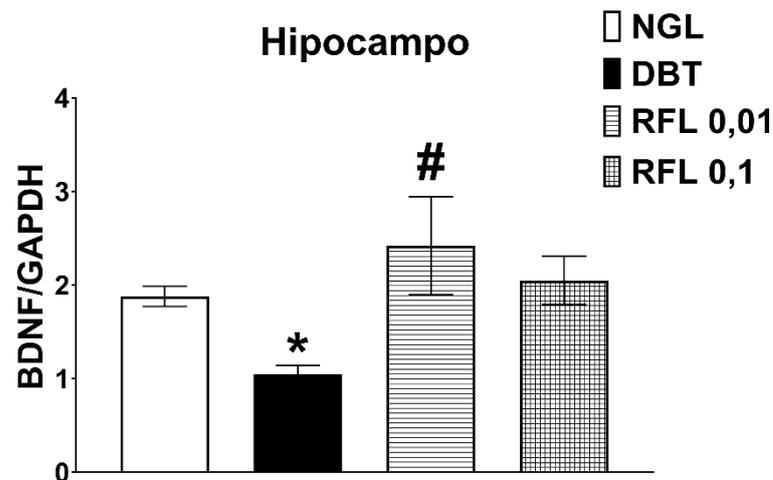


FIGURA 7: Efeito do tratamento de 21 dias do RFL nos níveis de BDNF no hipocampo. NGL = normoglicêmico, VEI = veículo, DBT = diabético, RFL 0,01 = Roflumilaste 0,01 mg/kg, RFL 0,1 = Roflumilaste 0,1 mg/kg. Os valores foram expressos como média ± EPM (n = 7/grupo), *p<0,05 quando comparado ao grupo NGL/VEI e #p<0,05 quando comparado ao grupo DBT/VEI.

5 DISCUSSÃO

A relação entre o DMT1 e os transtornos psiquiátricos, mais especificamente o TEPT, foi previamente descrita em alguns estudos clínicos e pré-clínicos, inclusive em nosso laboratório (ZANOVELI *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2020); embora os mecanismos comuns dessas doenças ainda não estejam bem estabelecidos. Este fato indica a necessidade de mais estudos que abordem o tema e possíveis tratamentos que não prejudiquem ou que favoreçam o controle glicêmico e funcionamento cerebral. Assim, o objetivo do atual trabalho foi avaliar o efeito do iFDE4 RFL no processamento de memórias associadas ao medo em modelo animal de DMT1 induzido quimicamente por STZ, bem como na condição diabética em si. Para tanto, os animais foram submetidos a um tratamento prolongado com o RFL e submetido ao protocolo de CMC seguido de um teste de generalização do medo. Adicionalmente, foi analisado o efeito do RFL sobre a expressão de BDNF no hipocampo.

Os dados mostraram que a menor dose de RFL, de 0,01 mg/kg, foi capaz de reverter o tempo de congelamento elevado dos animais diabéticos, comparando com animais normoglicêmicos. Ou seja, essa dose foi capaz de facilitar a extinção da memória aversiva e também de reverter a generalização dessa memória de medo.

Interessante que as demais doses foram capazes de reduzir o tempo de congelamento desses animais com DMT1, mas não de maneira tão efetiva.

Conforme esperado, nossos dados reproduziram a condição de DMT1 após a injeção de STZ, mostrando um aumento na glicemia e uma redução no ganho de peso, bem como mostrou a prevalência de sinais clássicos dessa condição, como polifagia e poliúria – quando comparado aos animais NGL (DA SILVA DIAS *et al.*, 2016; ZANOVELI *et al.*, 2016; SIBA *et al.*, 2017; DE SOUZA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2020; ADA, 2017). Quando tratados com o RFL, os animais com o diabetes induzido tiveram uma redução da glicemia, embora tal tratamento não tenha alterado o ganho de peso. Interessante que esta melhora da glicemia também já havia sido observada no trabalho conduzido por Tikoo e colaboradores (2014) usando também ratos com DMT1 induzido por STZ (TIKOO *et al.*, 2014). Em outro estudo conduzido por Vollert e colaboradores (2012) foi demonstrado essa redução da glicemia após RFL em camundongos geneticamente modificados para o DMT2. Ainda não se sabe ao certo o mecanismo que resultou nesse efeito; porém, foi sugerido o envolvimento do peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1), que, ao ser controlado pela atividade do AMPc, é liberado em células intestinais e gera efeitos de estimulação da proliferação de células β e evita a apoptose das mesmas (FARILLA *et al.*, 2002; GRIBBLE, 2008; VOLLERT *et al.*, 2012). Apesar das dosagens de RFL administradas serem diferentes em cada estudo, os resultados mostrados corroboram com nossos achados; entretanto, é possível dizer que os resultados aqui visualizados se mostram promissores, ressaltando o benefício de se utilizar doses menores de RFL que evitam a promoção de efeitos colaterais como êmese e diarreia (PRICKAERTS *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2018; SOHN *et al.*, 2020). Mesmo que não seja capaz de reverter o quadro diabético por completo, nem de alterar o reduzido ganho de peso desses animais, o RFL já possui a vantagem de não piorar a condição diabética, podendo inclusive ajudar no controle da glicemia dos animais.

Apesar de não termos investigado o processo inflamatório ou neuroinflamatório, condição presente periféricamente e no sistema nervoso central de animais DMT1, é importante mencionar que o RFL é um medicamento aprovado para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica, e seu efeito nesta doença é anti-inflamatório, diminuindo citocinas e mediadores pró-inflamatórios como a IL-6, IL-1 β e o TNF- α (WANG *et al.*, 2017; DING *et al.*, 2019). Dessa forma, pode-se imaginar que a administração sistêmica do RFL tenha promovido a redução dessas citocinas,

controlando o quadro inflamatório sistêmico relacionado ao DMT1, embora faltem estudos que comprovem este efeito. Importante notar que essa resposta anti-inflamatória poderia ser benéfica inclusive para o DMT2, que é mais prevalente na população (WHO, 2016; IDF, 2019). Ainda urge a necessidade de mais estudos que comprovem esse efeito.

Na análise comportamental relacionada à memória de medo, após o procedimento de CMC, o comportamento de medo foi indicado pelo congelamento do animal em três momentos: no treino de extinção, teste de extinção e teste de generalização. Nos três testes encontramos diferenças estatisticamente significativas. Importante aqui mencionar que, em relação ao tempo do treino de extinção, outro trabalho ainda não publicado do laboratório mostrou que um treino de extinção de 40 minutos é eficaz, ou seja reduz o comportamento de congelamento dos animais DBT no momento do treino. Porém, 24 horas após, no teste de extinção, o comportamento de congelamento mais elevado desses animais diabéticos ressurgiu, mostrando que apesar da eficiência do treino de extinção, esses animais apresentam uma dificuldade em extinguir a memória de medo ou uma super consolidação dessa memória de medo (DA LIMA SILVA *et al.*, dados não publicados).

Esses resultados já haviam sido observados no nosso laboratório (DE SOUZA *et al.*, 2018 ; RIBEIRO *et al.*, 2020). Ou seja, a condição diabética leva ao aumento expressivo do tempo de congelamento dos animais, independente do treino de extinção ser ou não eficiente. Isto se reflete nos testes subsequentes de extinção e generalização, quando comparado aos NGL, sugerindo assim uma hiperconsolidação da memória aversiva nos animais. Interessante que o tratamento com RFL foi capaz de reduzir o tempo de congelamento, sendo este efeito mais expressivo no teste de extinção e de generalização do medo após o tratamento contínuo com a menor dose de RFL (0,01 mg/kg). Importante aqui mencionar que muitos fármacos apresentam curvas dose-resposta não lineares, e, portanto, pode ser que a menor dose tenha sido a mais eficaz, enquanto que doses maiores possam ter sido inespecíficas, ou seja, atingindo outros sítios além daquele essencial para o efeito. Outra possibilidade é a de que a eficácia da menor dose nos animais utilizados seja devido ao acaso, havendo necessidade de mais estudos a fim de confirmarmos tal efeito e aprofundarmos essas questões relacionadas às doses.

Algumas hipóteses foram formuladas para explicar estes efeitos. Primeiramente, essa melhora no comportamento após tratamento com RFL pode ser

uma consequência da melhora periférica do estado inflamatório, presente nesses animais com diabetes induzido. Como observamos um aumento de BDNF no hipocampo, pode-se sugerir que o RFL também atue diretamente no sistema nervoso central e, por estimular mecanismos moleculares envolvidos na formação de memória e na plasticidade sináptica, facilita a criação de uma nova memória de extinção (PRICKAERTS *et al.*, 2016). A inibição da FDE4 provavelmente impediu maior degradação de AMPc, aumentando seu tempo de permanência e ação. O AMPc pôde, então, ativar a PKA, que, conseqüentemente, fosforilou a CREB em pCREB, levando a cascata de sinalização à síntese de uma série de proteínas, inclusive o BDNF. De acordo com a literatura, o BDNF é uma proteína de 12,4 kDa que participa ativamente de processos envolvidos na neurogênese, plasticidade sináptica e neuroproteção através da ligação ao receptor de ligação à proteína tirosina quinase B (TrKB) que permite o aumento de pCREB e fosforila receptores ionotrópicos AMPA e NMDA, essenciais no processamento de memórias (LEAL, COMPRIDO, DUARTE, 2014; MIAO *et al.*, 2015; JABARIS *et al.*, 2015; REDIVO *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2018; FENG *et al.*, 2019; AMIDFAR *et al.*, 2020). É interessante considerar o envolvimento do BDNF no TEPT, visto que a literatura já demonstra seu efeito benéfico em transtornos psiquiátricos, como na ansiedade e depressão, podendo ser um mecanismo comum entre essas doenças emocionais (AUTRY e MONTEGGIA, 2012; NOTARAS e VAN DEN BUUSE, 2020).

Não obstante, nos animais diabéticos, é sabido que a enzima glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 β) tem importante atividade sinalizadora de apoptose das células β pancreáticas. Somado a isso, a GSK3 β também tem mostrado efeito em inativar a CREB, assim impedindo a transcrição de BDNF (ZHANG *et al.*, 2018). Dessa forma, poder-se-ia sugerir que a formação de uma memória de extinção esteve prejudicada nos animais diabéticos devido a atividade dessa enzima, e que o RFL viabilizou novamente a cascata de eventos através da inibição da FDE4, podendo ser outro mecanismo de ação da droga.

Ademais, é sugestivo que, de acordo com a literatura, o RFL tenha atuado diretamente no sistema nervoso central reduzindo a neuroinflamação através da redução de citocinas pró-inflamatórias (JABARIS *et al.*, 2015; MIAO *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2019), embora não tenha dados experimentais que comprovem tal hipótese, sendo um próximo passo para a pesquisa.

Por fim, assim como observamos nos estudos comportamentais, parece que a

questão da dose é importante, uma vez que quando analisamos a expressão proteica de BDNF nós observamos que a menor, mas não a maior, dose de RFL foi capaz de aumentar a expressão de BDNF. Corroborando com a teoria protetora do BDNF, esta neurotrofina pode ter sido capaz de proteger as células contra danos oxidativos e citocinas pró-inflamatórias, tanto no pâncreas quanto no cérebro (LOMMATZSCH *et al.*, 1999; REDIVO *et al.*, 2016; GIACOBBO *et al.*, 2019; BATHINA e UNDURTI, 2021). De acordo com Giacobbo e colaboradores (2019), o BDNF é conhecido por promover efeitos benéficos na plasticidade sináptica e redução da neuroinflamação, através do receptor TrKB, assim ativando uma variedade de cascatas de sinalização que promovem o aumento do cálcio intracelular (Ca^{2+}) e, conseqüentemente, a fosforilação de diversos fatores de transcrição que resultarão na sobrevivência neuronal (GIACOBBO *et al.*, 2019).

Mesmo com o avanço nas pesquisas, o tratamento de transtornos psiquiátricos associados ao diabetes ainda é um desafio, tanto pela característica de polifarmácia necessária nestes quadros, quanto pela ineficácia dos tratamentos existentes. Inclusive, como mencionado anteriormente, o uso de antidepressivos ISRS podem dificultar o controle glicêmico, seja para hiperglicemia – por inibir a secreção de insulina – ou hipoglicemia – por modular a atividade do sistema nervoso autônomo simpático e aumentar a secreção de hormônios contra-reguladores (BRISCOE *et al.*, 2008; ROOPAN e LARSEN, 2016). É possível observar, portanto, que o RFL parece ter potencial para tratar transtornos psiquiátricos (incluindo o TEPT) associado ao DMT1, já que seu uso não prejudicou o controle glicêmico. Mais ainda, o reposicionamento de fármacos apresenta algumas vantagens, como o conhecimento da farmacocinética, a segurança relacionada com doses terapêuticas e tóxicas, o conhecimento de interações medicamentosas, tempo de meia-vida e efeitos colaterais; e, portanto, reduzindo o custo do tratamento.

6 CONCLUSÃO

Apesar do desafio no tratamento dos transtornos psiquiátricos associado ao DMT1, os dados aqui apresentados em um modelo animal de DMT1 sugerem que o RFL apresenta potencial terapêutico para aliviar doenças associadas com processamento disfuncional da memória de medo, como o TEPT. Mais ainda, a ação neuroprotetora deste composto em aumentar a expressão do fator neurotrófico, o

BDNF, no hipocampo pode estar envolvida nesse benefício de amenizar a expressão comportamental de medo.

7 REFERÊNCIAS

ACHARJEE, S. *et al.* Understanding Type 1 Diabetes: Etiology and Models. **Can. J. Diabetes.**, v. 37, p. 269 – 276, 2013. doi: 10.1016/j.jcjd.2013.05.001.

ALY, T. A. *et al.* Extreme Genetic Risk for Type 1A Diabetes. **PNAS.**, v. 103, n. 38, p. 14074 – 14079, 2006. doi: 10.1073/pnas.060634910.

American Diabetes Association (ADA, 2017). Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care.**, v. 41, p. 13 – 27, 2018. doi: 10.2337/dc18-S002.

American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Porto Alegre: Artmed, 5ª ed., 2014.

AMIDFAR, M. *et al.* The Role of CREB and BDNF in Neurobiology and Treatment of Alzheimer's Disease. **Life Sciences**, v. 257, 118020, 2020. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118020.

ANDERO, R.; RESSLER, K. J. Fear Extinction and BDNF: Translating Animal Models of PTSD to the Clinic. **Genes, Brain and Behavior**, v. 11, p. 503 – 512, 2012. doi: 10.1111/j.1601-183X.2012.00801.x.

ANTONIOLLI, L. *et al.* Adenosine Signalling in Diabetes Mellitus – Pathophysiology and Therapeutic Considerations. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 11, p. 228–241, 2015. doi: 10.1038/nrendo.2015.10.

ARMBRECHT, E. *et al.* Economic and Humanistic Burden Associated with Noncommunicable Diseases Among Adults with Depression and Anxiety in the United States. **J. Med. Econ.**, v. 0, p. 000, 2020. doi: 10.1080/13696998.2020.1776297.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. **Pharmacol. Rev.**, v. 64, p. 238 – 258, 2012. doi: 10.1124/pr.111.005108.

AVILA, G. *et al.* Functional and Structural Impact of Pirfenidone on the Alterations of Cardiac Disease and Diabetes Mellitus. **Cell Calcium**, v. 56, p. 428 – 435, 2014. doi: 10.1016/j.ceca.2014.07.008.

AVNI, D. *et al.* Role of CREB in Modulation of TNF α and IL-10 Expression in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophages. **Mol. Immunol.**, v. 47, p. 1396–1403, 2010. doi: 10.1016/j.molimm.2010.02.015.

BARNARD, K. *et al.* Antidepressant Medication as a Risk Factor for Type 2 Diabetes and Impaired Glucose Regulation: Systematic Review. **Diabetes Care**, v. 36, p. 3337–45, 2013. doi: 10.2337/dc13-0560.

BATHINA, S.; SRINIVAS, N.; UNDURTI, N. D. BDNF Protects Pancreatic β Cells (RIN5F) Against Cytotoxic Action of Alloxan, Streptozotocin, Doxorubicin and Benzo(a)pyrene in Vitro. **Metabolism Clin. Exp.**, v. 65, p. 667 – 684, 2016. doi: 10.1016/j.metabol.2016.01.016.

BATHINA, S.; UNDURTI, N. D. Resolvin D1 Decreases Severity of Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mellitus by Enhancing BDNF Levels, Reducing Oxidative Stress, and Suppressing Inflammation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, p. 1516, 2021. doi: 10.3390/ijms22041516.

BLOKLAND, A. *et al.* Phosphodiesterase Type 4 Inhibition in CNS Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 0, p. 000, 2019. doi: 10.1016/j.tips.2019.10.006.

BODEN, M. T. Prevalence of mental disorders and related functioning and treatment engagement among people with diabetes. **J Psychosom Res.**, v. 106, p. 62 – 69, 2018. doi: 10.1016/j.jpsychores.2018.01.001.

BOMMER, C. *et al.* The Global Economic Burden of Diabetes in Adults Aged 20–79 years: a Cost-of-Illness Study. **Lancet Diabetes Endocrinol.**, v. 5, p. 423–430, 2017. doi: 10.1016/S2213-8587(17)30097-9.

BRAUNWALD, E. Diabetes, Heart Failure, and Renal Dysfunction: The Vicious Circles. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 62, n. 4, p. 298 – 302, 2019. doi: 10.1016/j.pcad.2019.07.003.

BRISCOE, V. J. *et al.* Effects of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Fluoxetine on Counterregulatory Responses to Hypoglycemia in Individuals With Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3315 – 3322, 2008. doi: 10.2337/db08-1000.

DA SILVA DIAS, I. C. *et al.* Indoleamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes. **Mol Neurobiol.**, v. 53, p. 6997 – 7009, 2016. doi: 10.1007/s12035-015-9617-0.

DE MORAIS, H. *et al.* Anandamide Reverses Depressive-like Behavior, Neurochemical Abnormalities and Oxidative-Stress Parameters in Streptozotocin-Diabetic Rats: Role of CB1 Receptors. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 26, n. 10, p. 1590–1600, 2016. doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.08.007.

DE MORAIS, H. *et al.* Increased Oxidative Stress in Prefrontal Cortex and Hippocampus is Related to Depressive-like Behavior in Streptozotocin-Diabetic Rats. **Behav. Brain Res.**, v. 258, p. 52–64, 2014. doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.011.

DE SOUZA, C. *et al.* Posttraumatic Stress Disorder-type Behaviors in Streptozotocin-induced Diabetic Rats can be Prevented by Prolonged Treatment with Vitamin E. **Behav. Brain Res.**, v. 359, p. 749–754, 2019. doi: 10.1016/j.bbr.2018.09.008.

DEI CAS, A. *et al.* Impact of Diabetes on Epidemiology, Treatment, and Outcomes of Patients with Heart Failure. **JACC Heart Fail.**, v. 3, n. 2, p. 136 – 45, 2015. doi: 10.1016/j.jchf.2014.08.004.

DIMEGLIO, L. A.; EVANS-MOLINA, C.; ORAM, R. A. Type 1 Diabetes. **Lancet**, v. 391, p. 2449 – 2462, 2018. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5.

DING, H. *et al.* The Phosphodiesterase type 4 Inhibitor Roflumilast Suppresses Inflammation to Improve Diabetic Bladder Dysfunction Rats. **Int. Uro. and Nephrol.**, v. 51, p. 253 – 260, 2019. doi: 10.1007/s11255-018-2038-z.

DOTTA, F. *et al.* Coxsackie B4 Virus Infection of β cells and Natural killer cell Insulinitis in Recent-onset type 1 Diabetic Patients. **PNAS**, v. 104, n. 12, p. 5115 – 5120, 2006. doi: 10.1073/pnas.0700442104.

DYMOND, S. *et al.* Fear Generalization in Humans: Systematic Review and Implications for Anxiety Disorder Research. **Behav. Ther.**, v. 46, n. 5, p. 561–582, 2015. doi: 10.1016/j.beth.2014.10.001.

EDMEALEM, A.; OLIS, C. S. Factors Associated with Anxiety and Depression among Diabetes, Hypertension, and Heart Failure Patients at Dessie Referral Hospital, Northeast Ethiopia. **Behav. Neurology**, v. 2020, p. 1 – 10, 2020. doi: 10.1155/2020/3609873.

EIZIRIK, D. L.; PASQUALI, L.; CNOP, M. Pancreatic β Cells in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus: Different Pathways to Failure. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 16, p. 349 – 362, 2020. doi: 10.1038/s41574-020-0355-7.

FARILLA, L. *et al.* Glucagon-Like Peptide-1 Promotes Islet Cell Growth and Inhibits Apoptosis in Zucker Diabetic Rats. **Endocrinology**, v. 143, n. 11, p. 4397 – 4408, 2002. doi: 10.1210/en.2002-220405.

FENG, H. *et al.* Roflumilast Ameliorates Cognitive Impairment in APP/PS1 Mice via cAMP/CREB/BDNF Signaling and Anti-Neuroinflammatory Effects. **Metab. Brain Dis.**, v. 34, p. 583–591, 2019. doi: 10.1007/s11011-018-0374-4.

GAGNON, J. *et al.* The Impact of Antidepressant Therapy on Glycemic Control in Canadian Primary Care Patients with Diabetes Mellitus. **Front. Nutr.**, v. 5, a. 47, 2018. doi: 10.3389/fnut.2018.00047.

GALE, E. A. M. The Rise of Childhood Type 1 Diabetes in the 20th Century. **Diabetes**, v. 51, n. 12, p. 3353 – 61, 2002. doi: 10.2337/diabetes.51.12.3353.

GAMBETA, E. *et al.* Reestablishment of the Hyperglycemia to the Normal Level Seems not to be Essential to the Anxiolytic-like Effect Induced by Insulin. **Metab. Brain Dis.**, v. 31, n. 3, p. 563 – 571, 2016. doi: 10.1007/s11011-015-9770-1.

GHAELI, P. *et al.* Comparing the Effects of 8-week Treatment with Fluoxetine and Imipramine on Fasting Blood Glucose of Patients with Major Depressive Disorder. **J. Clin. Psychopharmacol.**, v. 24, n. 4, p. 386 – 8, 2004. doi: 10.1097/01.jcp.0000132441.27854.0d.

GIACOBBO, B. L. *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. **Mol. Neurobiol.**, v. 56, n. 5, p. 3295 – 3312, 2019. doi: 10.1007/s12035-018-1283-6.

GILSANZ, P. *et al.* The Bidirectional Association Between Depression and Severe Hypoglycemic and Hyperglycemic Events in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 41, n. 3, p. 446 – 452, 2018. doi: 10.2337/dc17-1566.

GOLDEN, S. H. *et al.* Examining a Bidirectional Association Between Depressive Symptoms and Diabetes. **JAMA**, v. 299, n. 23, p. 2751 – 9, 2008. doi: 10.1001/jama.299.23.2751.

GONG, B. *et al.* Persistent Improvement in Synaptic and Cognitive Functions in an Alzheimer Mouse Model after Rolipram Treatment. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 11, p. 1624 – 1634, 2004. doi: 10.1172/JCI22831.

GOYAL, S. N. *et al.* Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes: A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 49 – 63, 2016. doi: 10.1016/j.cbi.2015.11.032.

GRIBBLE, F. M. Targeting GLP-1 Release as a Potential Strategy for the Therapy of Type 2 Diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 25, p. 889 – 894, 2008. doi: 10.1111/j.1464-5491.2008.02514.x.

GRIEB, P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. **Mol. Neurobiology**, v. 53, p. 1741 – 1752, 2016. doi: 10.1007/s12035-015-9132-3.

GUTHRIE, R.; GUTHRIE, D. Pathophysiology of Diabetes Mellitus. **Crit. Care. Nurs.**, v. 27, n. 2, p. 113 – 125, 2004. doi: 10.1097/00002727-200404000-00003.

GUZZARDI, M. A. *et al.* Elevated Glycemia and Brain Glucose Utilization Predict BDNF Lowering Since Early Life. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 38, n. 3, p. 447 – 455, 2018. doi: 10.1177/0271678X17697338.

HE, M. *et al.* Synaptic Plasticity in PTSD and associated Comorbidities: The Function and Mechanism for Diagnostics and Therapy. **Curr. Pharm. Design**, v. 24, p. 4051 – 4059, 2018. doi: 10.2174/1381612824666181120094749.

HECKMAN, P. R. A.; BLOKLAND, A.; BOLLEN, E. P. P.; PRICKAERTS, J. Phosphodiesterase Inhibition and Modulation of Corticostriatal and Hippocampal Circuits: Clinical overview and translational considerations. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 87, p. 233–254, 2018. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.02.007.

HU, X. *et al.* Additive and Interaction Effect at Three Aminoacid Positions in HLA-DQ and HLA-DR Molecules Drive Type 1 Diabetes Risk. **Nat. Genet.**, v. 47, n. 8, p. 898 – 905, 2015. doi: 10.1038/ng.3353.

HUANG, Y.; WEI, X.; WU, T.; CHEN, R.; GUO, A. Collaborative Care for Patients with Depression and Diabetes Mellitus: a Systematic Review and Meta-Analysis. **BMC Psychiatry**, a. 13, 260, 2013. doi: 10.1186/1471-244X-13-260.

International Diabetes Federation (IDF). IDF Diabetes Atlas. 9^a edição, 2019. <http://www.diabetesatlas.org>

ILONEN, J.; LEMPAINEN, J.; VEIJOLA, R. The Heterogeneous Pathogenesis of Type 1 Diabetes Mellitus. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 15, p. 635 – 650, 2019. doi: 10.1038/s41574-019-0254-y.

ISAAC, R. *et al.* Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) Inhibit Insulin Secretion and Action in Pancreatic β Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 8, p. 5682–5693, 2013. doi: 10.1074/jbc.M112.408641.

JABARIS, S. *et al.* Phosphodiesterase-4 Inhibitors Ameliorates Cognitive Deficits in Deoxycorticosterone Acetate Induced Hypertensive Rats via cAMP/CREB Signaling System. **Brain Res.**, v. 1622, p. 279–291, 2015. doi: 10.1016/j.brainres.2015.07.003.

KARROURI, R. Post Traumatic Type 1 Diabetes Mellitus (Insulin-dependent): a case report. **Pan Afr. Med. J.**, v. 19, p. 328, 2014. doi: 10.11604/pamj.2014.19.328.5632.

KELMENDI, B. *et al.* PTSD: From Neurobiology to Pharmacological Treatments. **Eur. J. Psychotraumatol.**, Rev. 7, 31858, 2016. doi: 10.3402/ejpt.v7.31858.

KERNER, W.; BRÜCKEL, J. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, n. 122, p. 384–386, 2014. doi: 10.1055/s-0034-1366278.

KIDA, S. Reconsolidation/Destabilization, Extinction and Forgetting of Fear Memory as Therapeutic Targets for PTSD. **Psychopharmacology**, n. 236, p. 49 – 57, 2019. doi: 10.1007/s00213-018-5086-2.

KNOTT, E. *et al.* Phosphodiesterase Inhibitors as a Therapeutic Approach to Neuroprotection and Repair. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, Rev. 696, 2017. doi: 10.3390/ijms18040696.

KRYSTAL, J. *et al.* Synaptic Loss and the Pathophysiology of PTSD: Implications for Ketamine as a Prototype Novel Therapeutic. **Curr. Psychiatry Rep.**, v. 19, n. 10, Rev. 74, 2017. doi: 10.1007/s11920-017-0829-z.

LAHU, G.; NASSR, N.; HÜNNEMEYER, A. Pharmacokinetic Evaluation of Roflumilast. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.**, v. 7, n. 12, p. 1577 – 1591. doi: 10.1517/17425255.2011.632409.

LEAL, G., COMPRIDO, D., DUARTE, C. B. BDNF-Induced Local Protein Synthesis and Synaptic Plasticity. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 639 – 656, 2014. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.005.

LI, H.; ZUO, J.; TANG, W. Phosphodiesterase-4 inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. **Front. Pharmacol.**, v. 9, Rev. 1048, p. 1 – 21, 2018. doi: 10.3389/fphar.2018.01048.

LOMMATZSCH, M. *et al.* Abundant Production of Brain-Derived Neurotrophic Factor by Adult Visceral Epithelia: Implications for Paracrine and Target-Derived Neurotrophic Functions. **Am. J. Pathol.**, v. 155, n. 4, p. 1183 – 1193, 1999. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65221-2.

LONZE, B. E.; GINTY, D. D. Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. **Neuron**, v. 35, p. 605 – 623, 2002. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00828-0.

- LOPRESTO, D.; SCHIPPER, P.; HOMBERG, J. R. Neural circuits and mechanisms involved in fear generalization: Implications for the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. **Neurosci. Biobehav.**, Rev. 60, p. 31–42, 2016. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.10.009.
- MAREK, R.; STROBEL, C.; BREDY, T. W.; SAH, P. The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. **J. Physiol.**, v. 591, n. 10, p. 2381-91, 2013. doi: 10.1113/jphysiol.2012.248575.
- 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. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 35, p. 1157–1164, 2015. doi: 10.1007/s10571-015-0209-3.
- MICHOPOULOS, V.; NORRHOLM, S. D.; JOVANOVIC, T. Diagnostic Biomarkers for Posttraumatic Stress Disorder: Promising Horizons from Translational Neuroscience Research. **Biol. Psychiatry**, v. 78, n. 5, p. 344-53, 2015. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.01.005.
- MILLER-ARCHIE, S. A. *et al.* Posttraumatic Stress Disorder and New-Onset Diabetes among Adult Survivors of the World Trade Center Disaster. **Prev. Med.** (Baltim), v. 66, p. 34–38, 2014. doi: 10.1016/j.ypmed.2014.05.016.
- MURIACH, M.; FLORES-BELLVER, M.; ROMERO, F. J.; BARCIA, J. M. Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2014, a. 102158, 2014. doi: 10.1155/2014/102158.
- MYERS, K. M.; DAVIS, M. Behavioral and Neural Analysis of Extinction. **Neuron**, v. 36, n. 4, p. 567 – 584, 2002. doi: 10.1016/s0896-6273(02)01064-4.
- NAKAGAWA, T. *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulates Glucose Metabolism by Modulating Energy Balance in Diabetic Mice. **Diabetes**, v. 49, n. 3, p. 436 – 444, 2000. doi: 10.2337/diabetes.49.3.436.
- NEVES-ZAPH, S. R. Phosphodiesterase Diversity and Signal Processing Within cAMP Signaling Networks. **Adv. Neurobiol.**, v. 17, p. 3 – 14, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-58811-7_1.
- NOTARAS, M.; VAN DEN BUUSE, M. Neurobiology of BDNF in Fear Memory, Sensitivity to Stress, and Stress-Related Disorders. **Mol. Psychiatry**, v. 25, n. 10, p. 2251 – 2274, 2020. doi: 10.1038/s41380-019-0639-2.
- ORTEGA-MARTÍNEZ, S. A New Perspective on the Role of the CREB Family of Transcription Factors in Memory Consolidation via Adult Hippocampal Neurogenesis. **Front. Mol. Neurosci.**, v. 8, a. 46, p. 1 – 12, 2015. doi: 10.3389/fnmol.2015.00046.
- PASTOR, A. *et al.* Alcohol and Illicit Drug Use in People with Diabetes. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 8, n. 3, p. 239 – 248, 2020. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30410-3.
- PEARSE, D. D.; HUGHES, Z. A. PDE4B as a Microglia Target to Reduce Neuroinflammation. **Glia**, v. 64, n. 10, p. 1698 – 1709, 2016. doi: 10.1002/glia.22986.

PETRAK, F. *et al.* Depression and Diabetes. In: Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–, 2018. PMID: 29714935.

PRICKAERTS, J. *et al.* The PDE4 Inhibitor Roflumilast Improves Memory in Rodents at Non-Emetic Doses. **Behav. Brain Res.**, n. 303, p. 26 – 33, 2016. doi: 10.1016/j.bbr.2016.01.031.

RAUCH, S. A. M.; EFTEKHARI, A.; RUZEK, J. I. Review of Exposure Therapy: A Gold Standard for PTSD Treatment. **JRRD**, v. 49, n. 5, p. 679 – 688, 2012. doi: 10.1682/JRRD.2011.08.0152.

RECHENBERG, K.; GREY, M.; SADLER, L. "Anxiety and Type 1 Diabetes are like Cousins": The Experience of Anxiety Symptoms in Youth with Type 1 Diabetes. **Res. Nurs. Health**, v. 41, n. 6, p. 544 – 554, 2018. doi: 10.1002/nur.21913.

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. **Behav. Brain Res.**, n. 298, p. 57 – 64, 2016. doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.058.

RENNA, C. P. *et al.* Posttraumatic Stress Related to Hyperglycemia: Prevalence in Adults with Type 1 Diabetes. **J. Clin. Psychol. Med. Settings**, v. 23, n. 3, p. 269 – 284, 2016. doi: 10.1007/s10880-016-9463-x.

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** (Berl), n. 237, p. 529 – 542, 2020. doi: 10.1007/s00213-019-05388-9.

RICHTER, W. *et al.* PDE4 as a Target for Cognition Enhancement. **Expert Opin. Ther Targets**, v. 17, n. 9, p. 1011 – 1027, 2013. doi: 10.1517/14728222.2013.818656.

ROOPAN, S.; LARSEN, E. R. Use of Antidepressants in Patients with Depression and Comorbid Diabetes Mellitus: a Systematic Review. **Acta Neuropsychiatr.**, v. 29, n. 3, p. 127 – 139, 2017. doi: 10.1017/neu.2016.54.

ROZANSKA, O.; URUSKA, A.; ZOZULINSKA-ZIOLKIEWICZ, D. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Diabetes. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 3, p. 841 – 853, 2020. doi: 10.3390/ijms21030841.

RUBIN, D. C.; BERNTSEN, D.; JOHANSEN, M. K. A Memory Based Model of Posttraumatic Stress Disorder: Evaluating Basic Assumptions Underlying the PTSD Diagnosis. **Psychol. Rev.**, v. 115, n. 4, p. 985 – 1011, 2008. doi: 10.1037/a0013397.

RUSSELL, M. A. *et al.* HLA Class II Antigen Processing and Presentation Pathway Components Demonstrated by Transcriptome and Protein Analyses of Islet β -Cells from Donors with Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 68, p. 988 – 1001, 2019. doi: 10.2337/db18-0686.

SAEEDI, P. *et al.* Global and Regional Diabetes Prevalence Estimates for 2019 and Projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 157, a. 107843, 2019. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.

SANTIAGO, A. *et al.* Roflumilast Promotes Memory Recovery and Attenuates White Matter Injury in Aged Rats Subjected to Chronic Cerebral Hypoperfusion. **Neuropharmacology**, v. 138, p. 360 – 370, 2018. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.06.019.

SANTIN, I.; EIZIRIK, D. L. Candidate Genes for Type 1 Diabetes Modulate Pancreatic Islet Inflammation and β -Cell Apoptosis. **Diabetes, Obesity and Metab.**, v. 15, p. 71 – 81, 2013. doi: 10.1111/dom.12162.

SCHERRER, J. F. *et al.* Association Between Clinically Meaningful Posttraumatic Stress Disorder Improvement and Risk of Type 2 Diabetes. **JAMA Psychiatry**, v. 76, n. 11, p. 1159 – 1166, 2019. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2019.2096.

SCHREIBER, A. K.; NONES, C. F. M.; REIS, R.C.; CHICHORRO, J.G.; CUNHA, J. M. Diabetic Neuropathic Pain: Physiopathology and Treatment. **World J. Diabetes**, v. 15, n. 6 (3), p. 432 – 444, 2015. doi: 10.4239/wjd.v6.i3.432.

SIBA, I.P. *et al.* Fish Oil Prevents Rodent Anxious States Comorbid with Diabetes: A Putative Involvement of Nitric Oxide Modulation. **Behav. Brain Res.**, v. 326, p. 173 – 186, 2017. doi: 10.1016/j.bbr.2017.03.008.

ŞIŞMANLAR, S. G. *et al.* Posttraumatic Stress Symptoms in Children Diagnosed with Type 1 Diabetes. **Ital J. of Pediatr**, v. 38, n. 13, 2012. doi: 10.1186/1824-7288-38-13.

SKYLER, J. S. *et al.* Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History and Prognosis. **Diabetes**, v. 66, p. 241 – 255, 2017. doi: 10.2337/db16-0806.

SOARES, L. M. *et al.* Rolipram Improves Cognition, Reduces Anxiety- and Despair-Like Behaviors and Impacts Hippocampal Neuroplasticity after Transient Global Cerebral Ischemia. **Neuroscience**, v. 326, p. 69 – 83, 2016. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.03.062.

SOHN, J. M. B. *et al.* Persistence of the extinction of fear memory requires late-phase cAMP/PKA signaling in the infralimbic cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 172, 2020. doi: 10.1016/j.nlm.2020.107244.

SZELÉNYI, J.; KISS, J. P.; VIZI, E. S. Differential Involvement of Sympathetic Nervous System and Immune System in the Modulation of TNF- α Production by α 2- and β -Adrenoceptors in Mice. **J. Neuroimmunol.**, v. 103, n. 1, p. 34 – 40, 2000. doi: 10.1016/s0165-5728(99)00234-9.

TAKANO, A. *et al.* A Nonhuman Primate PET Study: Measurement of Brain PDE4 Occupancy by Roflumilast Using (R)-[11C] Rolipram. **Mol. Imaging Biol.**, v. 20, n. 4, p. 615 – 622, 2018. doi: 10.1007/s11307-018-1168-0.

TIKOO, K. *et al.* Calorie Restriction Mimicking Effects of Roflumilast Prevents Diabetic Nephropathy. **Biochem. and Biophys. Res. Comm.**, v. 450, p. 1581 – 1586, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.039.

TRIEF, P. M.; OUIMETTE, P.; WADE, M.; SHANAHAN, P.; WEINSTOCK, R. S. Post-traumatic Stress Disorder and Diabetes: Co-morbidity and Outcomes in a Male

Veterans Sample. **J. Behav. Med.**, n. 29, n.5, p. 411 – 418, 2006. doi: 10.1007/s10865-006-9067-2.

TULLY, T.; BOURTCHOULADZE, R.; SCOTT, R; TALLMAN, J. Targeting the CREB Pathway for Memory Enhancers. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 4, p. 267 – 277, 2003. doi: 10.1038/nrd1061.

UZZAMAN, A.; CHO, S. H. Classification of Hypersensitivity Reactions. **Allergy Asthma Proc.**, v. 33, n. 6, p. S96 – S99, 2012. doi: 10.2500/aap.2012.33.3561.

VANELZAKKER, M. B.; DAHLGREN, M. K.; DAVIS, F. C.; DUBOIS, S.; SHIN, L. M. From Pavlov to PTSD: The Extinction of Conditioned Fear in Rodents, Humans, and Anxiety Disorders. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 113, p. 3 – 18, 2014. doi: 10.1016/j.nlm.2013.11.014.

VITOLLO, O. V. *et al.* Amyloid β -peptide Inhibition of the PKA/CREB Pathway and Long-term Potentiation: Reversibility by Drugs that Enhance cAMP Signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.**, v. 99, n. 20, p. 13217 – 13221, 2002. doi: 10.1073/pnas.172504199.

VOLLERT, S. *et al.* The Glucose-Lowering Effects of the PDE4 Inhibitors Roflumilast and Roflumilast-N-Oxide in db/db Mice. **Diabetologia**, v. 55, p. 2779 – 2788, 2012. doi: 10.1007/s00125-012-2632-z.

WANG, C. *et al.* The Phosphodiesterase-4 Inhibitor Rolipram Reverses A β Induced Cognitive Impairment and Neuroinflammatory and Apoptotic Responses in Rats. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 15, n. 6, p. 749 – 766, 2012. doi: 10.1017/S1461145711000836.

WANG, Z. Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, H. T.; LI, Y. F. Phosphodiesterase: an Interface Connecting Cognitive Deficits to Neuropsychiatric and Neurodegenerative Diseases. **Curr. Pharm. Des.**, v. 21, n. 3, p. 303 – 316, 2016. doi: 10.2174/1381612820666140826115559.

WANG, C. *et al.* Reducing Neuroinflammation in Psychiatric Disorders: Novel Target of Phosphodiesterase 4 (PDE4) and Developing of the PDE4 Inhibitors. **Mechanisms of Neuroinflammation**, c. 1, p. 1 – 22, 2017. doi: 10.5772/intechopen.69154.

World Health Organization. **Classification of Diabetes Mellitus** 2019, ISBN 978-92-4-151570-2, 2019.

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. doi: 10.2147/DMSO.S82272.

YEHUDA, R. *et al.* Post-Traumatic Stress Disorder. **Nat. Rev. Dis. Prim.**, v. 1, a. 15057, p. 1 – 22, 2015. doi: 10.1038/nrdp.2015.57.

ZANOVELI, J. M. *et al.* Depression Associated with Diabetes: From Pathophysiology to Treatment. **Curr. Diabetes Rev.**, v. 12, n. 3, p. 165 – 178, 2016. doi: 10.2174/1573399811666150515125349.

ZHANG, X. *et al.* Pharmacological Mechanism of Roflumilast in the Treatment of Asthma-COPD Overlap. **Drug Des. Devel. Ther.**, v. 12, p. 2371 – 2379, 2018. doi: 10.2147/DDDT.S165161.

ZHANG, Y. *et al.* Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: GSK-3 β as a Potential Link. **Behav. Brain Res.**, v. 339, p. 57 – 65, 2018. doi: 10.1016/j.bbr.2017.11.015.

ZHONG, Y. *et al.* Rolipram-induced Improvement of Cognitive Function Correlates with Changes in Hippocampal CREB Phosphorylation, BDNF and Arc Protein Levels. **Neurosci. Lett.**, v. 610, p. 171–176, 2016. doi: 10.1016/j.neulet.2015.09.023.

ZHONG, Q. *et al.* FCPR16, a Novel Phosphodiesterase 4 Inhibitor, Produces an Antidepressant-like Effect in Mice Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 2, n. 90, p. 62 – 75, 2019. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.10.017.