



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM RESVERATROL SOBRE ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS, HISTOFISIOLOGIA DOPAMINÉRGICA E
ESTADO OXIDATIVO NO ENCÉFALO DE RATOS DIABÉTICOS**

PAMELA BRAMBILLA BAGATINI

PORTO ALEGRE

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM RESVERATROL SOBRE ASPECTOS
COMPORTAMENTAIS, HISTOFISIOLOGIA DOPAMINÉRGICA E
ESTADO OXIDATIVO NO ENCÉFALO DE RATOS DIABÉTICOS**

PAMELA BRAMBILLA BAGATINI

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval Elena

PORTO ALEGRE

2016

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Matilde Achaval, que tanto respeito e admiro. Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório, pela confiança e pelos inúmeros ensinamentos durante nossa convivência.

Ao Léder Xavier, meu grande amor, que sempre esteve presente ao longo desta jornada. Não tenho palavras capazes de expressar a gratidão que sinto pelo auxílio que me destes. Obrigada pela compreensão, pelo apoio e pelo carinho.

À colega e amiga Priscylla Senna. Fostes a primeira pessoa que me deu a oportunidade de aprender sobre diabetes experimental e análises comportamentais, junto aos seus experimentos. Obrigada por sempre estar disposta a ajudar e pela parceria.

A todos os colegas do Laboratório de Histofisiologia Comparada da UFRGS. Em especial, agradeço ao Otávio Augustin, à Ethiane Segabinazi e à Maria Augusta (Guta), pela amizade e auxílio prestado das mais variadas formas, e por tornar a rotina no laboratório mais leve e divertida!

À técnica do Laboratório de Histofisiologia Comparada da UFRGS, minha amiga Sílvia Barbosa. Obrigada pelo companheirismo, pela ajuda nos experimentos, pela paciência, pelos momentos de aprendizado e por sempre me estender a mão e me apoiar quando preciso. Te admiro muito!

À minha irmã de coração, Marília Marques. Sou eternamente grata pela oportunidade de ter te conhecido, pelo forte laço de amizade que criamos e por todo o auxílio que me destes ao longo desses anos.

Aos queridos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da PUCRS: Lisiani Saur, Raquel Oliveira, Pedro Baptista e Prof. Régis Mestriner. Agradeço imensamente pela disponibilidade de vocês em me auxiliar no que fosse preciso, pelos ensinamentos e pela fiel colaboração.

À Laura Neves, minha aluna de IC de coração. Sempre dedicada e responsável, fostes meu braço direito em várias etapas deste trabalho.

À Prof^a. Ionara Siqueira, por ter permitido realizar meus experimentos em seu laboratório, e poder contar com o auxílio dos seus alunos: Karine Bertoldi, Felipe Moysés e Gisele Lovatel. Foi um grande prazer ter trabalhado junto com vocês, pessoas tão queridas e sempre dispostas a ensinar e colaborar.

Às professoras da UFRGS Wânia Partata, Paula Rigon, Adriana Bos-Mikich e Tatiana Luft, por me aceitarem como aluna de estágio didático em algumas de suas disciplinas. Foi uma fase muito importante para mim, cheia de aprendizados e superações. Obrigada pela oportunidade e pelos inúmeros conhecimentos transmitidos.

Ao professor André Souto, da Faculdade de Química da PUCRS, pelo fornecimento do resveratrol.

À minha família, pelo apoio incondicional. Em especial, agradeço aos meus pais e irmãs, que são meu porto seguro. Obrigada por acreditarem em mim, por tornarem meus dias mais felizes, e pelo amor que vocês me transmitem, das mais diferentes formas.

Às minhas amigas de longa data: Aline Farina, Helaine Figueiredo, Luciana Aires, Marina Kober e Renata Ramos, que sempre me apoiam e me incentivam. Obrigada pela amizade e pelo carinho.

Aos professores e funcionários do PPG em Neurociências da UFRGS, pelos momentos de aprendizado e pela dedicação no trabalho que desempenham na Universidade.

A todos os funcionários do Ratário do ICBS da UFRGS. Sem o trabalho de vocês, meus experimentos não poderiam ser realizados. Obrigada pela dedicação e cuidado no tratamento com os animais.

À CAPES, pela bolsa concedida.

“Nada no mundo é mais perigoso que a ignorância sincera e a estupidéz conscienciosa.”

Martin Luther King Jr.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Diabetes <i>mellitus</i>	1
1.2 Disfunções encefálicas relacionadas ao diabetes <i>mellitus</i>	3
1.2.1 Modelo de diabetes <i>mellitus</i> experimental para o estudo de disfunções encefálicas.....	7
1.2.2 Efeitos do diabetes <i>mellitus</i> na via nigroestriatal.....	9
1.2.3 Efeitos do diabetes <i>mellitus</i> no hipocampo.....	11
1.3 Resveratrol.....	14
1.3.1 Resveratrol como agente terapêutico no diabetes <i>mellitus</i>	16
1.3.2 Resveratrol e efeitos neuroprotetores em roedores com diabetes <i>mellitus</i> induzido por estreptozotocina.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. MODO DE APRESENTAÇÃO DOS MÉTODOS E RESULTADOS.....	20
3.1 Capítulo 1.....	21
3.2 Capítulo 2.....	34
4. DISCUSSÃO.....	55
4.1 Implicações metodológicas.....	55
5. CONCLUSÕES.....	66
6. PERSPECTIVAS.....	68
7. REFERÊNCIAS.....	70
8. ANEXO.....	96

RESUMO

O diabetes *mellitus* é uma disfunção metabólica capaz de gerar déficits motores e prejuízos cognitivos. A hiperglicemia e a sinalização deficiente de insulina no sistema nervoso central desencadeiam uma série de mecanismos que geram inflamação e estresse oxidativo, prejudicando a plasticidade neural em diferentes regiões encefálicas. Desta forma, a ação do resveratrol, um composto polifenólico presente no vinho tinto e em alguns alimentos naturais, e que apresenta atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, destaca-se como potencial opção terapêutica para as disfunções neurológicas associadas ao diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2.

No primeiro estudo desta tese foram avaliados os efeitos do tratamento via oral com resveratrol sobre parâmetros locomotores, densidade de células neuronais e gliais, e imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH) na parte compacta da substância negra (SNPC) de ratos *Wistar* machos adultos com modelo de diabetes *mellitus* similar ao tipo 1 induzido por estreptozotocina (STZ). Os animais foram divididos em 4 grupos: não-diabéticos tratados com salina (SAL), não-diabéticos tratados com resveratrol (RSV), diabéticos tratados com salina (DM) e diabéticos tratados com resveratrol (DM+RSV). O resveratrol foi administrado na dose de 20 mg/kg, conforme preconizado na literatura. Os resultados desse estudo demonstraram que os ratos do grupo DM desenvolveram acinesia, a qual foi atenuada pelo tratamento com resveratrol no grupo DM+RSV. Ratos diabéticos dos grupos DM e DM+RSV desenvolveram bradicinesia. Em relação aos principais achados histofisiológicos, foi demonstrado que a diminuição da imunorreatividade celular para TH e o aumento na densidade de células gliais observados no grupo DM foram revertidos pelo tratamento com resveratrol no grupo DM+RSV.

No segundo estudo desta tese, foram avaliados os efeitos do tratamento via oral com resveratrol sobre a memória aversiva e o estado oxidativo - conteúdo total de espécies reativas e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutatona peroxidase - no hipocampo de ratos *Wistar* machos adultos com modelo de diabetes *mellitus* similar ao tipo 1 induzido por STZ. Os animais foram divididos em 8 grupos: não-diabéticos tratados com salina (ND SAL), não-diabéticos tratados com resveratrol na dose de 5 mg/kg (ND RSV 5), não-diabéticos tratados com resveratrol na dose de 10 mg/kg (ND RSV 10), não-diabéticos tratados com resveratrol na dose de 20 mg/kg (ND RSV 20), diabéticos tratados com salina (D SAL), diabéticos tratados com resveratrol na dose de 5 mg/kg (D RSV 5), diabéticos tratados com resveratrol na dose de 10 mg/kg (D RSV 10) e diabéticos tratados

com resveratrol na dose de 20 mg/kg (D RSV 20). Os principais resultados desse estudo mostraram que o diabetes experimental não promoveu déficits de memória ou alterações no estado oxidativo hipocampal, e a administração de resveratrol não modificou esses parâmetros de forma relevante nos diferentes grupos estudados.

Os resultados desta tese indicam que o resveratrol exerce efeitos terapêuticos nas disfunções nigroestriatais induzidas pelo diabetes, visto que é capaz de reverter a acinesia causada pelo diabetes experimental, e de atenuar o aumento na densidade glial e a diminuição do conteúdo de TH nos neurônios da SNPC em ratos diabéticos. Por outro lado, a memória aversiva e o estado oxidativo no hipocampo permanecerem inalterados nos ratos diabéticos submetidos ou não ao tratamento com resveratrol. Os achados sugerem que determinadas regiões encefálicas apresentam maior suscetibilidade ao dano induzido pelo referido modelo de diabetes experimental, que pode culminar em um desequilíbrio dos circuitos relacionados aos núcleos da base. Ademais, os resultados indicam a necessidade de estudos adicionais para a avaliação dos efeitos do diabetes experimental e do tratamento com resveratrol sobre a memória aversiva e sobre o estado oxidativo hipocampal, de forma tempo e dose-dependentes.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disorder that can promote motor deficits and cognitive dysfunctions. Hyperglycemia and insulin deficient signaling in the central nervous system triggers mechanisms that generate inflammation and oxidative stress, which may impair neural plasticity in different brain regions. Thus, the use of resveratrol, a polyphenolic compound found in red wine and in some natural foods, that has antioxidant and anti-inflammatory activities, could be a potential treatment for neurological disorders associated with type 1 and type 2 diabetes.

In the first study of this PhD thesis, we evaluated the effects of oral resveratrol treatment on locomotor parameters, neuronal and glial densities and tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity in the substantia *nigra pars compacta* (SNpc) in adult male *Wistar* rats with a streptozotocin-induced (STZ) type 1-like diabetes model. The animals were divided into 4 groups: non-diabetic animals treated with saline (SAL), non-diabetic animals treated with resveratrol (RSV), diabetic animals treated with saline (DM) and diabetics animals treated with resveratrol (DM + RSV). Resveratrol was administered at a dose of 20 mg/kg, as recommended in the literature. Our results showed rats from the DM group developed akinesia, which was attenuated after resveratrol treatment in the DM + RSV group, while rats from the DM and DM + RSV groups developed bradykinesia. In relation to the histological and physiological findings, the DM group showed a reduction in cellular TH immunoreactivity and increased glial cell density, both of which were reversed by resveratrol treatment in the DM + RSV group.

In the second study of this PhD thesis, we evaluated the effects of oral resveratrol treatment on aversive memory and oxidative status - total content of reactive species and antioxidant activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes - in the hippocampus of adult male *Wistar* rats with STZ-induced type 1-like diabetes. The animals were divided into 8 groups: non-diabetic treated with saline (ND SAL); non-diabetic treated with resveratrol at a dose of 5 mg/kg (ND RSV 5); non-diabetic treated with resveratrol at a dose of 10 mg/kg (ND RSV 10); non-diabetic treated with resveratrol at a dose of 20 mg/kg (ND RSV 20); diabetic treated with saline (D SAL); diabetic treated with resveratrol at a dose of 5 mg/kg (D RSV 5); diabetic treated with resveratrol at a dose of 10 mg/kg (D RSV 10); and diabetic treated with resveratrol at a dose of 20 mg/kg (D RSV 20). The main results of this study showed that experimental diabetes did not induce memory deficits or changes in

hippocampal oxidative status and resveratrol administration did not modify these parameters in the different treatment groups.

The results of this PhD thesis indicate that resveratrol exerts therapeutic effects on the nigrostriatal dysfunctions induced by diabetes, since it is able to reverse the akinesia caused by experimental diabetes and attenuate the increased glial density and decreased TH immunoreactivity in the SNpc neurons of diabetic rats. On the other hand, aversive memory and the hippocampal oxidative status remain unchanged in diabetic rats, treated or not with resveratrol. The findings suggest that some brain regions are more susceptible to damage induced by the experimental model of diabetes, which may culminate in an imbalance in the circuits related to the basal ganglia. Moreover, the results indicate the need for additional studies to evaluate the effects of experimental diabetes and resveratrol treatment on aversive memory and the hippocampal oxidative state, in relation to time and dose dependency.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	Produtos Finais de Glicação Avançada
AMPK	Proteína Quinase ativada por Adenosina Monofosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
CA	Corno de Ammon
CAC	Condicionamento Aversivo ao Contexto
CAT	Catalase
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DMT1	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1
DMT2	Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 2
DP	Doença de Parkinson
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
GLUT2	Transportador de Glicose tipo 2
GLUT4	Transportador de Glicose tipo 4
GPe	Globo Pálido, segmento externo
GPI	Globo Pálido, segmento interno
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDAC	Histona Desacetilase
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IGF-1	Fator de Crescimento semelhante à Insulina tipo 1
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
LTD	Depressão de Longa Duração
LTP	Potenciação de Longa Duração
MAO	Monoamina Oxidase
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
NTPDase	Nucleosídeo Trifosfato Difosfoidrolase

RAGE.....Receptor para Produtos Finais de Glicação Avançada
Sir2.....Regulador de informação silenciosa 2
SIRT1.....Sirtuína 1
SN.....Substância Negra
SNC.....Sistema Nervoso Central
SNPC.....Substância Negra, Porção Compacta
SOD.....Superóxido Dismutase
STZ.....Estreptozotocina
TH.....Tirosina Hidroxilase
TNF- αFator de Necrose Tumoral alfa
UPDRS.....Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias metabólicas favorecidas pela hiperglicemia...	5
Figura 2. Representação esquemática dos principais fatores que contribuem para o prejuízo cognitivo relacionado ao diabetes <i>mellitus</i>	6
Figura 3. Representação esquemática do mecanismo citotóxico da estreptozotocina.....	8
Figura 4. Representação esquemática da circuitaria dos núcleos da base no estado normal e na doença de Parkinson.....	10
Figura 5. Representação esquemática do circuito tri-sináptico hipocampal, com base no encéfalo de rato.....	12
Figura 6. Estruturas químicas dos isômeros de resveratrol: <i>trans</i> e <i>cis</i> -resveratrol.....	14

Capítulo 1

Table 1 - Body weight and blood glucose levels.....	24
Fig. 1 - Timeline of the experimental design.....	24
Fig. 2 - Latency to remove both paws from the horizontal bar in the bar test.....	25
Fig. 3 - a) Number of lines crossed in the open field test. b) Average speed in the open field test.....	25
Fig. 4 - a) Density of the Nissl-stained neurons in the SNpc. b) Density of the Nissl-stained glial cells in the SNpc.....	26

Fig. 5 - Digitized images from coronal mesencephalic sections, showing Nissl-stained neuronal and glial cells in the SNpc in the four experimental groups (SAL, RSV, DM and DM+RSV).....26

Fig. 6 - a) Density of TH immunoreactive neurons in the SNpc. b) Regional OD in the SNpc. c) Cellular OD in the SNpc.....27

Fig. 7 - Digitized images from coronal mesencephalic sections, showing TH immunoreactivity in the SNpc in the four experimental groups (SAL, RSV, DM and DM+RSV).....27

Capítulo 2

Fig. 1 - Timeline of the experimental design.....51

Fig. 2 - Percentage (%) of freezing behavior measured in the test session.....52

Fig. 3 - Measurement of free radical content using DCFH-DA as a probe (a), and enzymatic antioxidant activity of SOD (b) and GPx (c) in the hippocampi of rats from all experimental groups.....53

Table 1 - Body weight and blood glucose levels.....54

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Diabetes mellitus*

O diabetes *mellitus* (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas definido pela presença de hiperglicemia, resultante de uma diminuição na secreção de insulina e/ou por uma ação deficiente da insulina nos tecidos-alvo (American Diabetes Association, 2016). Trata-se de uma disfunção metabólica crônica com incidência e prevalência crescentes, e mundialmente reconhecida como uma importante causa de incapacidade e mortalidade prematura (WHO, 2016).

Entre os anos de 1980 e 2014, o número de adultos com DM quadruplicou no mundo todo, contabilizando cerca de 422 milhões de indivíduos em 2014 (NCD-RisC, 2016). Atualmente, o DM é classificado como a sétima principal causa de incapacidade em todo o mundo (Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators, 2015), e é responsável por mais de 2 milhões de mortes anualmente (The Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration, 2014). Mais de 90% dos casos de DM se enquadram em duas categorias principais: DM tipo 1 (DMT1) e DM tipo 2 (DMT2) (American Diabetes Association, 2016).

O DMT1 compreende 5 a 10% dos casos de DM, e tem como principal causa a destruição auto-imune das células beta do pâncreas endócrino, que resulta em uma deficiência grave de insulina e torna os pacientes dependentes do tratamento com insulina para sobreviverem (American Diabetes Association, 2012; WHO, 2016). A destruição auto-imune no DMT1 tem um perfil multifatorial, que envolve múltiplas predisposições genéticas - fortemente associadas a genes do complexo de histocompatibilidade principal - e fatores ambientais pouco conhecidos (Pirrot et al., 2008). Nesses casos, o DMT1 normalmente se desenvolve durante a infância e adolescência, embora possa ocorrer em qualquer idade (American Diabetes Association, 2012).

A destruição auto-imune no DMT1 pode ocorrer de forma rápida (principalmente em crianças) ou lenta (principalmente em adultos), fazendo com que os pacientes apresentem, em poucos dias ou semanas, as principais características clínicas desencadeadas pela hiperglicemia: poliúria associada a glicosúria, noctúria, nictúria e até mesmo enurese, uma vez que a quantidade de glicose que passa no processo de filtração glomerular supera a capacidade de reabsorção renal; polidipsia, visto que a desidratação gerada pela poliúria, juntamente com o aumento da osmolaridade plasmática induzida pela hiperglicemia, ativam

os núcleos hipotalâmicos responsáveis pela sensação de sede; polifagia, gerada pela falta de glicose intracelular que ativa o hipotálamo lateral e inibe o hipotálamo ventro-medial, levando à sensação de fome; perda de peso, uma vez que a falta de insulina reduz a captação de glicose em diferentes tecidos, promovendo vias catabólicas como gliconeogênese, glicogenólise, lipólise e proteólise, o que pode induzir o quadro de cetoacidose diabética (Funk, 2007; American Diabetes Association, 2012).

O DMT2 compreende 90 a 95% dos casos de DM, e está associado à diminuição da responsividade dos receptores de insulina - caracterizando uma resistência desse hormônio em seus tecidos-alvo - e também à deficiência relativa na produção de insulina pelas células beta do pâncreas (Kahn et al., 2014). Diferente do DMT1, no início do desenvolvimento da disfunção ou até mesmo ao longo da vida, os pacientes com DMT2 não necessitam de tratamento com insulina para sobreviverem (American Diabetes Association, 2012; Kahn et al., 2014). Devido à secreção residual de insulina, a hiperglicemia se desenvolve gradualmente, fazendo com que muitos pacientes com DMT2 sejam assintomáticos e, por esse motivo, acabam sendo diagnosticados tardiamente (WHO, 2016). Outros pontos relevantes são que o DMT2 apresenta uma importante predisposição genética, sendo fortemente correlacionado com a idade e também com a obesidade (responsável por cerca de 80% dos casos de DMT2), principalmente em pacientes com obesidade abdominal central (Funk, 2007; American Diabetes Association, 2012).

Além dos sintomas clássicos da hiperglicemia (poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso), o diagnóstico clínico do DM leva em consideração critérios laboratoriais, incluindo glicose plasmática em jejum de 8 h ≥ 126 mg/dL, ou hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$, ou glicose plasmática ≥ 200 mg/dL após uma dose oral de 75 g de glicose (teste de tolerância à glicose oral), ou na presença de sintomas clínicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica junto a uma glicose plasmática em amostra aleatória ≥ 200 mg/dL (American Diabetes Association, 2016).

O DM é responsável por uma série de disfunções que afetam negativamente a qualidade de vida, e são consideradas causas importantes de morbidade e mortalidade. Essas complicações podem ser classificadas em microvasculares - retinopatia, nefropatia e neuropatia - e macrovasculares - doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica (Cade, 2008; Fowler, 2008). Além disso, os distúrbios vasculares e metabólicos são capazes de promover danos clinicamente relevantes no sistema nervoso central (SNC) de indivíduos diagnosticados com DM (Biessels et al., 1994; Biessels, 2013).

1.2 Disfunções encefálicas relacionadas ao diabetes *mellitus*

As primeiras descrições de déficits cognitivos relacionados ao DM datam do início da década de 20, a partir de um estudo realizado por Miles e Root (1922). Os autores relataram pior desempenho de adultos diabéticos em tarefas envolvendo memória de trabalho (memorização de números e letras) e atenção contínua (teste de cancelamento de dígitos), quando comparados a adultos não-diabéticos (Miles & Root, 1922).

Nos últimos anos, houve um maior interesse na avaliação dos impactos negativos do DM no SNC. Evidências clínicas mostraram que, em pacientes com DMT1, as disfunções cognitivas são mais acentuadas quando o início da doença ocorre na infância, e parecem não ter relação com o envelhecimento, visto que a progressão do declínio cognitivo ao longo do tempo ocorre de forma lenta na maioria dos casos (Gaudieri et al., 2008; Biessels, 2013; Koekkoek et al., 2015). Por outro lado, pacientes com DMT2 exibem prejuízos cognitivos independentemente da idade e possuem maior chance de desenvolvimento de demência, uma condição fortemente associada ao envelhecimento (Biessels et al., 2014; Koekkoek et al., 2015).

Nesse sentido, estudos indicam que, em comparação a indivíduos não-diabéticos, indivíduos diagnosticados com DMT1 ou DMT2 apresentam pior desempenho em tarefas empregadas para avaliação de diferentes domínios cognitivos, entre eles: atenção, incluindo atenção visual (habilidade de atender seletivamente a uma informação visual apresentada) e atenção contínua (habilidade de manter-se concentrado durante um longo período de tempo), flexibilidade cognitiva (habilidades relacionadas a mudança de conceitos e criação de estratégias para a resolução de problemas), e inteligência (habilidade de aplicar conhecimentos para solucionar determinados problemas) (Gold et al., 2007; Harten et al., 2007; McCrimmon et al., 2012). Além disso, foi observado que tanto o DMT1 quanto o DMT2 são capazes de afetar a velocidade motora e a eficiência psicomotora, evidenciadas pela lentidão em executar tarefas envolvendo atividades motoras manuais básicas, e pela redução da eficiência psicomotora em tarefas que avaliam a rapidez e acurácia no processamento de informações e consequente execução manual de determinada atividade (Brands et al., 2005; Harten et al., 2007; Patiño-Fernández et al., 2010; McCrimmon et al., 2012).

Em relação à memória, evidências clínicas sugerem que o DMT1 raramente está associado a déficits de memória em indivíduos adultos, enquanto um número mais expressivo de adultos com DMT2 apresentam pior desempenho em tarefas de aprendizado

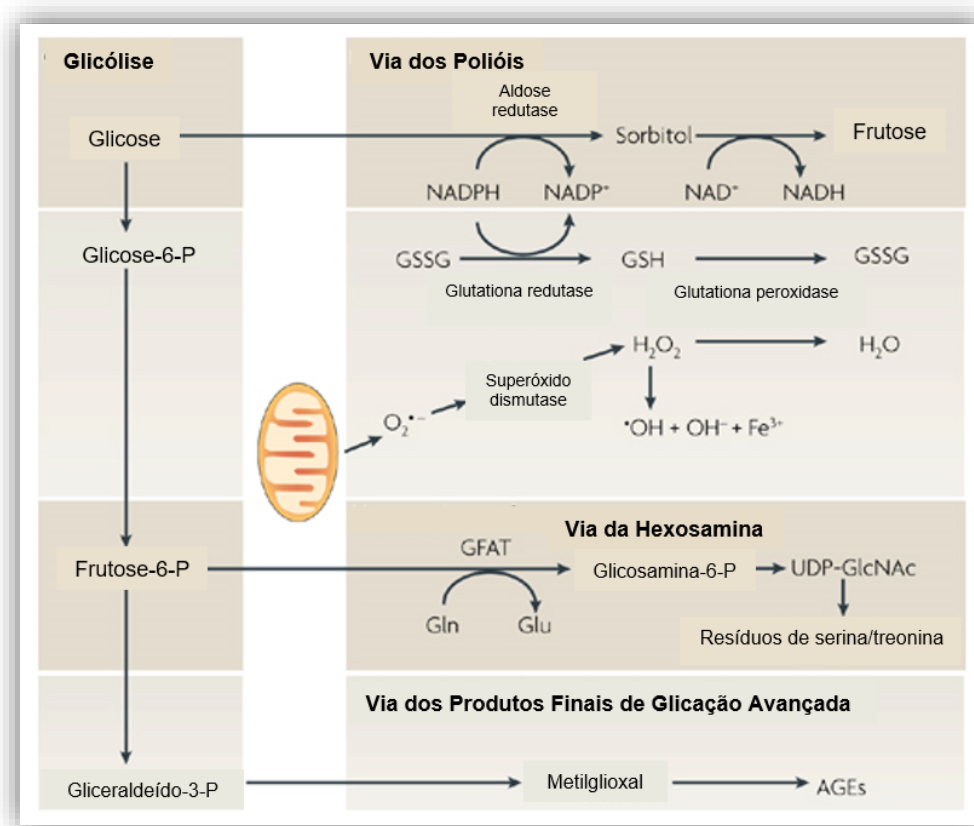
e memória, comparados a adultos não-diabéticos (Koekkoek et al., 2015; Moheet et al., 2015). A presença de co-morbidades relacionadas ao DMT2, como dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e doença cerebrovascular, podem estar relacionadas ao desenvolvimento de disfunções de memória, pois são consideradas fatores de risco vascular e causas potenciais de disfunções cognitivas (McCrimmon et al., 2012; Moheet et al., 2015).

Além de avaliações comportamentais, alguns estudos clínicos buscaram analisar o impacto do DM na estrutura encefálica com o uso de técnicas de neuroimagem, onde foram observados atrofia cortical e diminuição do volume das substâncias cinzenta e branca em indivíduos diabéticos (Reagan, 2012; Moheet et al., 2015), enquanto que diminuição do volume hipocampal foi mais comumente observado em pacientes com DMT2 (Gold et al., 2007; Bruehl et al., 2009; McCrimmon et al., 2012).

Desta forma, podemos considerar que as alterações no SNC de indivíduos diabéticos estão relacionadas a deficiências em diferentes domínios cognitivos. Entretanto, características clínico-metabólicas desses pacientes devem ser levadas em consideração, pois podem exercer influência nos parâmetros cognitivos e neuroestruturais; entre essas características, pode-se citar o grau de controle glicêmico, o número e a frequência de episódios hipoglicêmicos, a idade do diagnóstico inicial e duração do DM, HAS, dislipidemia e complicações vasculares (Biessels et al., 2008; McCrimmon et al., 2012; Moheet et al., 2015).

A hiperglicemia se destaca como uma das principais e mais conhecidas causas de complicações no DM. Embora o encéfalo utilize a glicose como sua principal fonte energética, em situações de hiperglicemia prolongada o transporte de glicose pode ser desequilibrado, fazendo com que a glicose seja desviada para vias metabólicas que podem culminar em neurotoxicidade (Tomlinson & Gardiner, 2008; Mergenthaler et al., 2013).

Figura 1. Representação esquemática das vias metabólicas favorecidas pela hiperglicemia.



GSSG: glutaciona oxidada; GSH: glutaciona reduzida; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; H_2O : água; $O_2^{\bullet-}$: superóxido; $\bullet OH$: radical hidroxila; GFAT: glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase; UDP-GlcNAc: uridina 5'-difosfato-N-acetilglicosamina; AGEs: produtos finais de glicação avançada. Adaptado de Tomlinson & Gardiner, 2008.

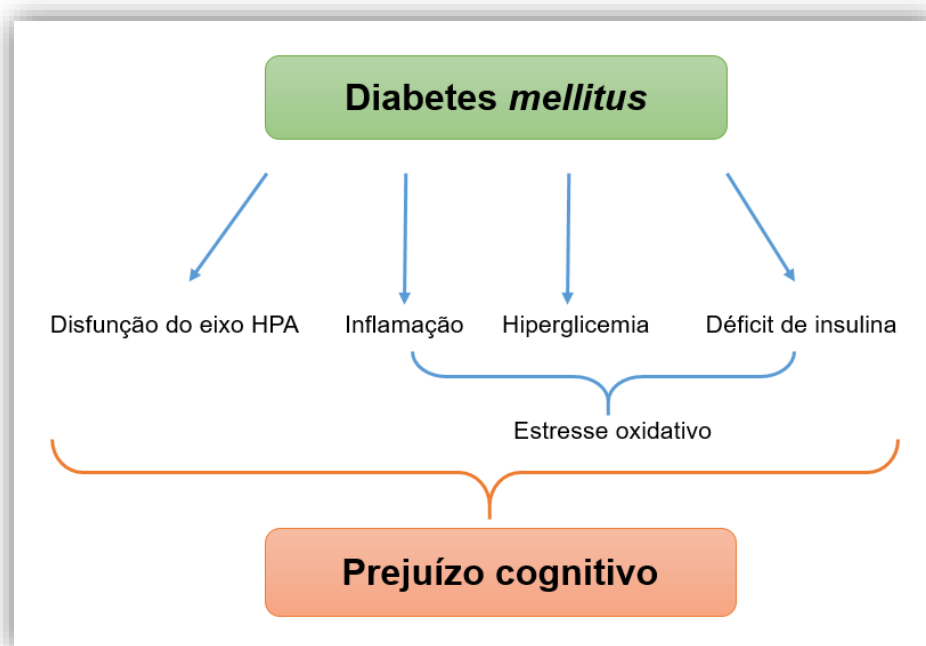
O aumento no fluxo da via dos polióis pode comprometer o ciclo da glutaciona e a atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx), levando a um aumento no conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Tomlinson & Gardiner, 2008). Concomitantemente, ocorre um aumento na produção de superóxido devido à sobrecarga na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, o qual é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). As enzimas GPx e catalase (CAT) atuam impedindo o acúmulo de H_2O_2 , pois este é capaz de iniciar diferentes eventos, entre eles as reações de Fenton (oxidação do ferro(II) a ferro(III) pelo H_2O_2), culminando na formação de radicais hidroxila ($\bullet OH$), que são altamente reativos (Barnham et al., 2004; Tomlinson & Gardiner, 2008). Todos esses eventos podem levar ao estresse oxidativo, um desequilíbrio entre a

produção de agentes oxidantes e as defesas antioxidantes, capaz de causar danos em macromoléculas, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Sies, 2015).

Por sua vez, o aumento no fluxo da via da hexosamina resulta no aumento da síntese de uridina 5'-difosfato-N-acetilglicosamina, estimulando a glicosilação de proteínas nucleares e citoplasmáticas e comprometendo suas funções biológicas (Bond & Hanover, 2015). Ademais, a hiperglicemia pode causar um aumento na formação de produtos finais de glicação avançada (AGE), moléculas capazes de modificar irreversivelmente as propriedades de diferentes estruturas biológicas e de se ligar aos seus receptores (RAGE), promovendo respostas inflamatórias via *up regulation* de RAGE e via ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB); a ativação deste fator de transcrição leva à ativação de sequências de sinalização pró-inflamatórias e pró-apoptóticas, aumentando a produção de ERO e contribuindo para o dano de células endoteliais vasculares, neurônios e células gliais (Tomlinson & Gardiner, 2008; Callaghan et al., 2012).

Junto à hiperglicemia, há outros fatores que podem estar relacionados às disfunções neurológicas no DMT1 e no DMT2, incluindo diminuição da secreção e/ou ação da insulina, alteração na atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e inflamação (Gaspar et al., 2016).

Figura 2. Representação esquemática dos principais fatores que contribuem para o prejuízo cognitivo relacionado ao diabetes *mellitus*.



HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal. Modificado de Gaspar et al., 2016.

A insulina tem um papel importante para a homeostase do SNC, pois se liga ao seu próprio receptor e também ao receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), os quais são distribuídos em diferentes regiões encefálicas e promovem a ativação de vias de sinalização relacionadas à expressão de genes anti-apoptóticos, à síntese de proteínas ligadas à plasticidade sináptica - envolvidas no estabelecimento da potenciação de longa duração (LTP) e da depressão de longa duração (LTD) - e estabilização de microtúbulos (Blázquez et al., 2014; Werner & LeRoith, 2014). No DM, quando há diminuição da secreção e/ou ação da insulina, pode-se inibir as referidas vias de sinalização, prejudicando a plasticidade neural e aumentando a vulnerabilidade neuronal ao dano (Banks et al., 2012; Blázquez et al., 2014; Gaspar et al., 2016).

Em relação às alterações na função e atividade do eixo HPA, sabe-se que o consequente aumento dos níveis basais de glicocorticoides pode ser capaz de promover prejuízos na plasticidade hipocampal, incluindo inibição da plasticidade sináptica e da neurogênese (Reagan et al., 2008; Wrighten et al., 2009).

Ademais, a presença de microglia com fenótipo reativo e o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo de roedores com modelos experimentais semelhantes ao DMT1 ou DMT2 podem promover uma *up regulation* de RAGE e ativação do NF-κB, capazes de gerar inflamação e estresse oxidativo, culminando em eventos neurodegenerativos e disfunções cognitivas (Sima et al., 2009; Hwang et al., 2014; Gaspar et al., 2016).

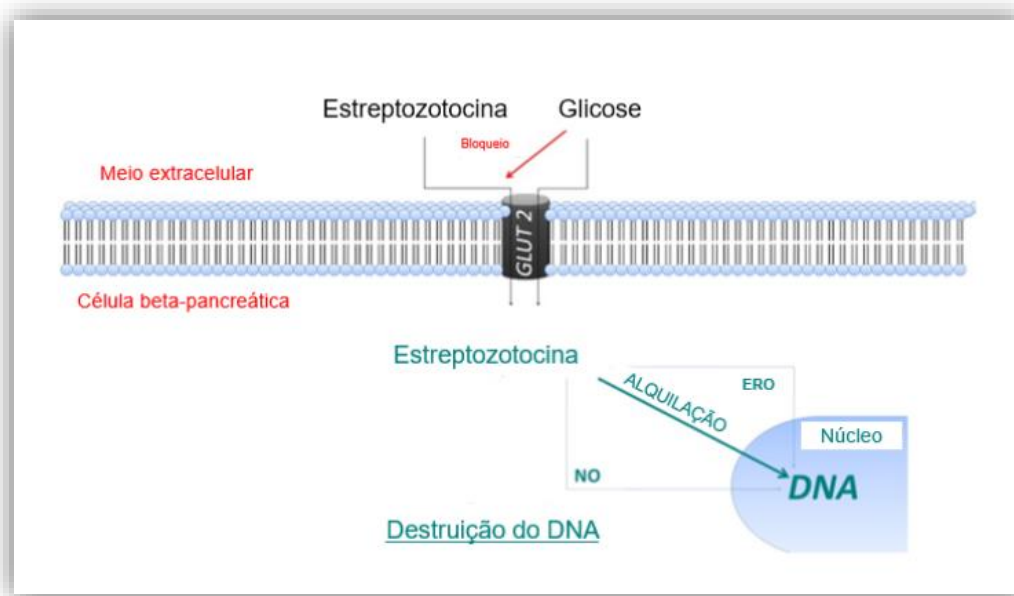
1.2.1 Modelo de diabetes *mellitus* experimental para o estudo de disfunções encefálicas

Um dos métodos mais comumente utilizados para a indução do DM experimental com características semelhantes ao DMT1 é a injeção intravenosa ou intraperitoneal do agente citotóxico estreptozotocina (STZ; Haider et al., 2013; Damasceno et al., 2014; Radenković et al., 2016). Esse composto glicosamina-nitrosuréia é captado pelas células via transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT2), muito expressos pelas células beta produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans do pâncreas (Wolfgang et al., 1994). A barreira hematoencefálica não expressa GLUT2, excluindo, desta forma, qualquer efeito direto da STZ no SNC após sua administração sistêmica (Kumagai, 1999).

O efeito citotóxico da STZ é mediado principalmente pela atividade alquilante do DNA (transferência de grupos metil para as bases nitrogenadas e fosfatos, resultando em

quebras nas cadeias de DNA), porém o aumento na geração de ERO e liberação de óxido nítrico (NO) após a metabolização da STZ também contribuem para a morte das células beta-pancreáticas (Radenković et al., 2016).

Figura 3. Representação esquemática do mecanismo citotóxico da estreptozotocina.



GLUT 2: transportador de glicose tipo 2; NO: óxido nítrico; ERO: espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Radenkovic et al., 2016.

Roedores com DM semelhante ao tipo 1 induzido por STZ apresentam um pico hiperglicêmico cerca de 72 h pós-indução e, depois desse período, permanecem hiperglicêmicos, com níveis de glicose sanguínea entre 350 e 450 mg/dL (o nível considerado normal é de aproximadamente 90 mg/dL; Gispén & Biessels, 2000). Além disso, esses animais tornam-se hipoinsulinêmicos, porém não necessitam de tratamento com insulina para sobreviverem (Figlewicz et al., 1996; Biessels, 2013). Assim como os pacientes diabéticos, os roedores desenvolvem danos microvasculares e macrovasculares, havendo comprometimento do sistema nervoso periférico e do SNC (Gispén & Biessels, 2000; Biessels et al., 2002).

O modelo de DM induzido por STZ está associado ao desenvolvimento de alterações estruturais no encéfalo de roedores, demonstradas em estudos que relatam morte neuronal no córtex frontal (Jakobsen et al., 1987) e no hipocampo (Jing et al., 2013), desmielinização e degeneração axonal no estriado e no córtex motor/somatossensorial (Huang et al., 2012), alterações estruturais na barreira hematoencefálica (Mooradian, 1997), e diminuição no

conteúdo total de proteínas, ácidos graxos e colesterol por microgramas de DNA no encéfalo de ratos jovens (4 a 8 semanas de vida), indicando uma possível redução no conteúdo de mielina nos encéfalos desses animais (Malone et al., 2006).

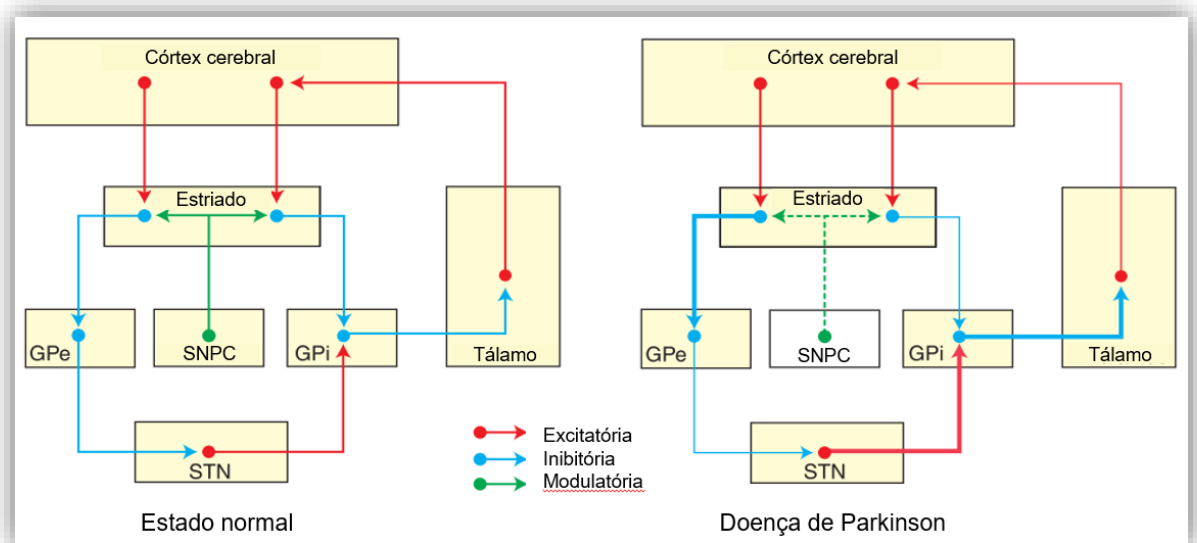
1.2.2 Efeitos do diabetes *mellitus* na via nigroestriatal

Os núcleos da base compreendem um grupo de núcleos subcorticais interconectados, compostos pela substância negra (SN), estriado (caudado e putame), segmento interno do globo pálido (GPi), segmento externo do globo pálido (GPe) e núcleo subtalâmico, os quais participam principalmente do controle motor, mas também são engajados em outras funções, como aprendizagem motora, funções executivas e emoções (Lanciego et al., 2012; Barrett et al., 2014).

A SN compreende dois núcleos separados: a parte reticular, que contém neurônios GABAérgicos, e a parte compacta, composta por neurônios dopaminérgicos (Villalba et al., 2015). Na via nigroestriatal, os neurônios da parte compacta da SN (SNPC) projetam seus axônios ao estriado, liberando dopamina e causando despolarização dos neurônios estriatais que possuem receptores dopaminérgicos D1, e hiperpolarização dos neurônios estriatais que possuem receptores dopaminérgicos D2 (Korchounov et al., 2010). Os neurônios estriatais com receptores D1 realizam conexões inibitórias com o GPi, enquanto que os neurônios com receptores D2 realizam conexões inibitórias com o GPe; esses circuitos coexistem em equilíbrio funcional, facilitando e inibindo o movimento, respectivamente (Lanciego et al., 2012).

Na doença de Parkinson (DP), há uma diminuição significativa de dopamina estriatal secundária à morte de neurônios da SNPC, que causa disfunção na circuitaria dos núcleos da base e leva ao aparecimento de sintomas parkinsonianos, como acinesia¹ (Gershanik, 2010; Lerner, 2010; Mazzoni et al., 2012), bradicinesia² (Simões & Litvan, 2010; Mazzoni et al., 2012), tremor involuntário de repouso³ e instabilidade postural⁴ (Dauer & Przedborski, 2003; Messing, 2007; Mazzoni et al., 2012). Evidências clínicas sugerem que os sintomas motores da DP surgem quando há perda de pelo menos 30% dos neurônios da SNPC (Cheng et al., 2010).

Figura 4. Representação esquemática da circuitaria dos núcleos da base no estado normal e na doença de Parkinson.



A espessura das setas representa o estado funcional de um determinado circuito, onde setas espessas ilustram vias hiperativadas, e setas mais finas representam circuitos hipoativados. GPi: globo pálido, segmento interno; GPe: globo pálido, segmento externo; SNPC: substância negra, porção compacta; STN: núcleo subtalâmico. Modificado de Lanciego et al., 2012.

¹Acinesia tem origem a partir da palavra grega *akinesis*: o prefixo *a* significa “sem”, e o sufixo *kinesis* significa “movimento”. Desta forma, acinesia pode ser definida como uma incapacidade de iniciar movimentos voluntários. Entretanto, a literatura médica emprega o termo “acinesia” para designar dificuldade (ou atraso) para iniciar movimentos voluntários.

²Bradicinesia tem origem a partir das palavras gregas *bradys*, que significa “baixo”, “inferior”, e *kinesis*, que significa “movimento”. Bradicinesia pode ser definida como lentidão dos movimentos voluntários, ou seja, diminuição da velocidade na execução de movimentos voluntários. Alguns estudos utilizam o termo “bradicinesia” para incluir três diferentes fenômenos: lentidão dos movimentos voluntários (bradicinesia), redução na amplitude dos movimentos voluntários (hipocinesia) e dificuldade para iniciar movimentos voluntários (acinesia).

³Tremor involuntário de repouso é um movimento repetitivo de “vai e vem” em qualquer membro, ou na mandíbula, cabeça ou tronco, que ocorre quando tal parte do corpo não está se movendo de forma ativa (voluntária).

⁴Instabilidade postural se refere à reação prejudicada quando há perturbação do equilíbrio.

Nesse sentido, estudos clínicos apontam uma possível relação entre DM e parkinsonismo, visto que pacientes diagnosticados com DMT1 ou DMT2 possuem maior risco de desenvolver DP no futuro se comparados a indivíduos não-diabéticos (Xu et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que o DMT2 pode causar disfunções na marcha - padrão de marcha festinante - e prejudicar reflexos posturais em idosos (Arvanitakis et al., 2007). Outro estudo prévio sugere que tanto o DMT1 quanto o DMT2 estão associados ao desenvolvimento de sinais e sintomas severos da DP, evidenciados em pacientes diabéticos submetidos a avaliações clínicas com base na Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS; Cereda et al., 2012).

Ademais, foi demonstrada uma diminuição da imunorreatividade para receptores de insulina em neurônios da SNPC de seres humanos *post-mortem* (Moroo et al., 1994), e todos esses achados sugerem a existência de vias comuns entre os mecanismos patofisiológicos do DM e da DP.

Além das evidências clínicas, estudos pré-clínicos também mostraram que o estado diabético possivelmente prejudica a função motora. Nesses estudos, os autores observaram alterações motoras similares às de pacientes parkinsonianos em roedores com modelo de DM induzido por STZ, incluindo diminuição da coordenação motora e da locomoção geral (de Senna et al., 2011; do Nascimento et al., 2011; Piazza et al., 2011), bem como redução de parâmetros locomotores no teste de campo aberto, como distância percorrida, tempo de duração do movimento e velocidade média do movimento (Revsin et al., 2009).

Junto aos achados comportamentais, alguns estudos demonstraram que a SNPC apresenta maior vulnerabilidade ao dano no DM experimental induzido por STZ em ratos, comprovada pelos declínios na expressão de RNAm e imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH) - enzima essencial para a síntese de catecolaminas - nessa região (Figlewicz et al., 1996; do Nascimento et al., 2011).

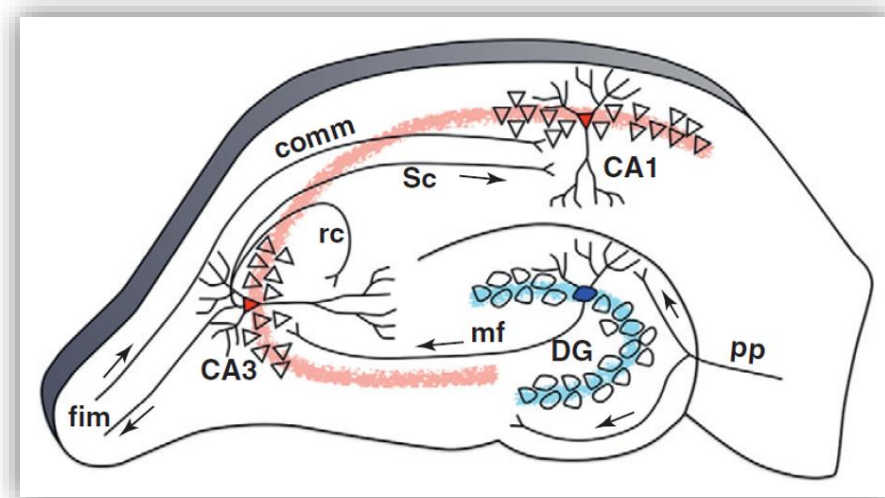
1.2.3 Efeitos do diabetes *mellitus* no hipocampo

Em mamíferos, o hipocampo é uma estrutura bilateral localizada no lobo temporal medial, formado por duas regiões principais: giro denteado e Corno de Ammon (CA), o qual é dividido em subcampos (Andersen et al., 2007). Em estudos envolvendo ratos e camundongos, o termo “hipocampo” descreve o giro denteado e os subcampos CA1, CA2 e CA3, enquanto que em estudos com o uso de ressonância magnética funcional em seres

humanos, o termo “hipocampo” tipicamente inclui o giro denteado, o *subiculum* e os subcampos CA1, CA2, CA3 e CA4 (Strange et al., 2014).

O hipocampo faz parte de um sistema extremamente importante para o processamento de memórias declarativas de curta e de longa duração, as quais compreendem as memórias semânticas (memórias de significados, entendimentos e conhecimentos baseados em conceitos) e as memórias episódicas (memórias de eventos ou episódios e fatos; Kandel et al., 2014). Os sinais que chegam ao hipocampo são transmitidos principalmente a partir de neurônios do córtex entorrinal, o qual mantém conexões aferentes e eferentes com o restante do córtex (Izquierdo, 2011). Axônios provenientes do córtex entorrinal atravessam o *subiculum* e o giro denteado através da via perforante, para fazerem sinapses com neurônios do giro denteado. Este envia projeções às células piramidais em CA3 através das fibras musgosas, e a partir de CA3 grande parte dos axônios são enviados para CA1, pelos colaterais de Schaffer. Os neurônios piramidais de CA1, por sua vez, fazem sinapses com células do *subiculum*, o qual envia projeções de volta ao córtex entorrinal (Deng et al., 2010; Izquierdo, 2011; Yassa & Stark, 2011).

Figura 5. Representação esquemática do circuito tri-sináptico hipocampal, com base no encéfalo de rato.



DG: giro denteado; pp: via perforante; mf: fibras musgosas; rc: colaterais recorrentes; fim: fimbria; Sc: colaterais de Schaffer; comm: fibras comissurais.
Adaptado de Yassa & Stark, 2011.

Estudos sugerem que o estado diabético pode ser capaz de causar disfunções neuroquímicas e até mesmo atrofia do hipocampo, visto que é considerado uma estrutura muito sensível e responsiva a mudanças na homeostase da glicose (Gold et al., 2007; Wrighten et al., 2009; Kamiyama et al., 2010; McCrimmon et al., 2012). Tanto no DMT1 quanto no DMT2, o estresse oxidativo e o acúmulo de AGE são apontados como as principais causas de prejuízos na integridade hipocampal, culminando em déficits de memória (Wrighten et al., 2009; Sima, 2010; Moghaddam et al., 2014).

Nesse sentido, estudos pré-clínicos demonstraram que o DM semelhante ao tipo 1 induzido por STZ é capaz de prejudicar a plasticidade hipocampal em ratos e camundongos, diminuindo a neurogênese e a proliferação celular, e promovendo astrogliose reativa e neurodegeneração (Li et al., 2002; Alvarez et al., 2009; Jing et al., 2013).

Em roedores, as memórias dependentes do hipocampo podem ser avaliadas de diversas maneiras, dentre elas: diferentes formas de “condicionamento aversivo”, onde os animais são treinados pela exposição a um estímulo condicionado sensorial determinado (por exemplo, um som) ou indeterminado (um lugar); grupo de “aprendizagens espaciais”, onde o estímulo condicionado envolve um conjunto de estímulos visuais à distância do animal, o qual pode realizar um percurso na água (“labirinto aquático de Morris”) ou em um labirinto de vários braços; e a memória de reconhecimento, que inclui reconhecimento de animais da mesma espécie ou de um objeto (Izquierdo, 2011).

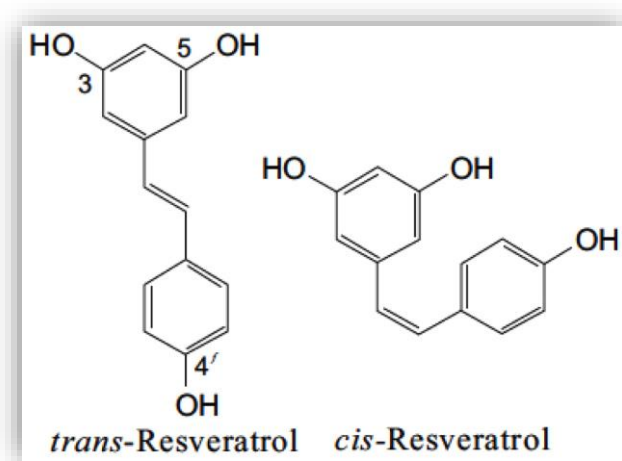
De fato, deficiências comportamentais em animais com DM experimental foram evidenciadas em tarefas de aprendizado e memória dependentes do hipocampo, onde ratos adultos jovens submetidos à tarefa do labirinto aquático de Morris apresentaram déficits de memória espacial a partir de 10 semanas após a indução do DM experimental induzido por STZ, e a severidade dos déficits demonstraram correlação com o tempo de duração do DM (Biessels et al., 1994; Kamal et al., 2000; Grzęda & Wiśniewska, 2008). O implante de *pellets* subcutâneos de insulina no início do estado diabético foram capazes de prevenir o déficit de aprendizado, entretanto, quando iniciada 10 semanas após a indução do DM experimental, a terapia com insulina promoveu apenas uma recuperação parcial, devido aos prejuízos já estabelecidos na aprendizagem (Biessels et al., 1998). Ademais, disfunções na memória espacial de ratos com DM induzido por STZ foram observadas no teste de reconhecimento do objeto reposicionado, demonstradas pela diminuição da preferência desses roedores em explorar o objeto realocado (de Senna et al., 2011; Piazza et al., 2011). Déficits de memória em tarefas de condicionamento aversivo também foram observados em

roedores com DM experimental induzido por STZ, quando comparados a animais não-diabéticos (Alvarez et al., 2009; Kalalian-Moghaddam et al., 2013).

1.3 Resveratrol

A palavra resveratrol é derivada do latim *Res* que significa “que vem”, da planta *Veratrum*, e o sufixo “ol” indica a presença de grupos álcool (hidroxila) em sua estrutura (Harikumar & Aggarwal, 2008). O resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) é um composto polifenólico que foi isolado pela primeira vez em 1940, a partir da raiz do heléboro branco (*Veratrum grandiflorum*) e, posteriormente, na década de 60, da raiz do *Polygonum cuspidatum*, uma planta utilizada nas medicinas tradicionais chinesa e japonesa para o tratamento de infecções fúngicas, doenças inflamatórias, HAS, alergias e dislipidemias (Nonomura et al., 1963; Langcake et al., 1979; Shisodia & Aggarwal, 2006). O resveratrol existe nas formas isômeras *cis* e *trans*, sendo a forma *trans* considerada a mais estável (Rege et al., 2014).

Figura 6. Estruturas químicas dos isômeros de resveratrol: *trans* e *cis*-resveratrol.



Modificado de Rege et al., 2014.

O resveratrol pode ser encontrado em mais de 70 espécies de plantas, sendo produzido em grande quantidade em videiras *Vitis vinifera* e em outras plantas como uma resposta protetora a infecções por fungos ou ao estresse ambiental, como exposição à luz ultravioleta (Langcake & Pryce, 1976).

Atualmente, sabe-se que o resveratrol é o principal polifenol não-flavonóide encontrado em uvas, amendoins, mirtilo e ameixas (Kovacic & Somanathan, 2010). Por ser encontrado no vinho tinto, acredita-se que o referido composto seja o principal responsável pelo “paradoxo francês”, fenômeno no qual o consumo frequente de vinho tinto na França está associado a uma reduzida mortalidade por doenças cardíacas, em comparação aos outros países europeus (Renaud & de Lorgeril, 1992). Estudos sugerem que as atividades cardioprotetoras do resveratrol estão relacionadas às suas propriedades antioxidantes e à capacidade de modular e aprimorar as defesas antioxidantes das células (Soleas et al., 1997; Frémont, 2000). Entretanto, somente as atividades modulatórias do estado oxidativo celular não esclarecem os efeitos farmacológicos desse composto, o qual demonstra, além das propriedades cardioprotetoras, atividades anti-inflamatórias, anti-tumorais, anti-envelhecimento, anti-diabéticas e neuroprotetoras (Frémont, 2000; Baur & Sinclair, 2006; Novelle et al., 2015).

Evidências experimentais demonstraram que a proteína denominada sirtuína 1 (SIRT1) é um dos principais alvos do resveratrol e, quando ativada, medeia muitas ações fisiológicas do resveratrol (Camins et al., 2010; Kulkarni & Cantó, 2015). SIRT1 foi primeiramente identificada como ortóloga humana do *silent information regulator 2* (Sir2) de leveduras, pertencente a uma família de histona desacetilases (HDACs) que é dividida em 4 grupos (Frye, 2000). As HDACs classe III são denominadas sirtuínas, as quais apresentam sete isoformas já caracterizadas em mamíferos (SIRT1-7) com diferentes localizações e funções celulares (Denu, 2005; Dali-Youcef et al., 2007).

A isoforma SIRT1 exerce seus efeitos a partir de duas vias distintas: modificações das histonas, que podem resultar no silenciamento da cromatina e na repressão da transcrição gênica; e regulação de substratos celulares não-histonas, especialmente fatores de transcrição, incluindo o supressor de tumor p53, a família FOXO de fatores de transcrição FOXO 1, 3 e 4, e a família do NF- κ B (Camins et al., 2010). A desacetilação desses fatores resultam, entre outras consequências, na inibição da expressão de fatores pró-apoptóticos e pró-inflamatórios; em específico, alguns membros da família FOXO estão envolvidos na regulação do metabolismo celular, e a desacetilação do fator de transcrição FOXO1 via SIRT1 parece estar envolvida na diminuição da resistência à insulina e na homeostase da glicose (Camins et al., 2010; Hubbard & Sinclair, 2014; Kulkarni & Cantó, 2015).

Ademais, a ativação da SIRT1 parece estar envolvida direta ou indiretamente com a ativação de outras proteínas, como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), enzima importante na regulação do metabolismo e da sobrevivência celular (Price et al., 2012;

Kulkarni & Cantó, 2015). Desta forma, acredita-se que muitos dos efeitos benéficos do resveratrol estão relacionados à ativação da SIRT1 e à modulação da atividade de proteínas envolvidas na regulação de mecanismos celulares importantes para a promoção da homeostase da glicose e neuroproteção (Baur & Sinclair, 2006; Szkudelska & Szkudelski, 2010; Bastianetto et al., 2015).

1.3.1 Resveratrol como agente terapêutico no diabetes *mellitus*

Estudos em roedores com DM experimental induzido por STZ e nicotinamida revelaram efeitos anti-hiperglicêmicos do resveratrol, evidenciados pela diminuição dos níveis de glicose sanguínea e de HbA1c (Palsamy & Subramanian, 2008, 2009). Seu efeito nos níveis glicêmicos pode estar relacionado à ação estimulante no transporte de glicose intracelular, visto que fibras musculares do sóleo, hepatócitos e adipócitos, isolados de ratos com DM experimental induzido por STZ, foram capazes de captar significativamente mais glicose quando tratados com resveratrol (Su et al., 2006).

Acredita-se que o estímulo na captação de glicose gerado pelo resveratrol esteja associado a uma maior ação dos transportadores de glicose na membrana plasmática, uma vez que estudos evidenciaram um aumento na expressão do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) em ratos com DM induzido por STZ e tratados com resveratrol, comparados aos animais diabéticos não tratados (Chi et al., 2007; Penumathsa et al., 2008).

Além dos efeitos anti-hiperglicêmicos, a atuação benéfica do resveratrol pode estar relacionada aos seus efeitos anti-inflamatórios: em ratos com DM experimental, foi demonstrado que o tratamento via oral com resveratrol reduziu significativamente os níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias denominadas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) no encéfalo e em outros órgãos dos animais, em comparação aos ratos diabéticos não tratados (Palsamy & Subramanian, 2010, 2011; Prabhakar, 2013).

Ademais, o tratamento com resveratrol pode ser capaz de modular o estado oxidativo, pois promove a normalização dos índices de lipoperoxidação, bem como o restabelecimento dos níveis previamente reduzidos de atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx no plasma e em diferentes órgãos - incluindo o encéfalo - de roedores com DM experimental (Palsamy & Subramanian, 2010; Park & Pezzuto, 2015).

1.3.2 Resveratrol e efeitos neuroprotetores em roedores com diabetes *mellitus* experimental induzido por estreptozotocina

Por ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Baur & Sinclair, 2006), o resveratrol é apontado como possível agente neuroprotetor em disfunções do SNC (Sun et al., 2010; Bastianetto et al., 2015). Por outro lado, ainda são escassas as evidências experimentais que demonstraram a atuação do resveratrol no SNC de roedores com DM semelhante ao tipo 1 induzido por STZ.

Um dos primeiros estudos que cita a ação do resveratrol no SNC neste modelo experimental é o de Sharma et al. (2007). Nele, o tratamento com resveratrol demonstrou efeitos benéficos, incluindo redução dos níveis de NO nos encéfalos de camundongos diabéticos, e diminuição dos níveis séricos do mediador inflamatório TNF- α (Sharma et al., 2007).

No mesmo ano, Ates et al. (2007) demonstraram que o tratamento com resveratrol foi capaz de atenuar o estresse oxidativo no SNC de ratos com DM induzido por STZ. Esse estudo evidenciou uma diminuição significativa dos altos níveis de malondialdeído, xantina-oxidase e NO no hipocampo, córtex, cerebelo, tronco encefálico e medula espinal de ratos diabéticos, além de um aumento dos níveis previamente reduzidos de glutathiona reduzida (GSH) nas mesmas estruturas, quando comparados aos ratos diabéticos não tratados com resveratrol (Ates et al., 2007).

Ademais, o resveratrol parece modular os sistemas purinérgico e colinérgico no córtex cerebral de ratos com DM induzido por STZ, aumentando os níveis de atividade das enzimas nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (NTPDase) e 5'-nucleotidase em ratos controle e diabéticos tratados com resveratrol, quando comparados aos ratos diabéticos não tratados (Schmatz et al., 2009^b). Sugere-se que a modulação das atividades dessas enzimas pelo resveratrol pode ser importante, no sentido de que o aumento da hidrólise de ATP, ADP e AMP pode contribuir no aumento da produção de adenosina, molécula associada a vias de sinalização que culminam em ações protetoras e regenerativas no SNC (Gomes et al., 2011). Além disso, o resveratrol foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de atividade da enzima acetilcolinesterase nos ratos diabéticos, revertendo as deficiências na neurotransmissão colinérgica observadas no DM experimental (Schmatz et al., 2009^a).

Por fim, estudos adicionais confirmaram a atuação neuroprotetora do resveratrol em ratos com DM induzido por STZ, demonstrada na prevenção de déficits de memória de longa duração (Schmatz et al., 2009^a), na inibição da neurodegeneração, reatividade astrogliar e

inflamação (pela inibição da transcrição gênica do TNF- α e IL-6) no hipocampo (Jing et al., 2013), e na atenuação do estresse oxidativo no hipocampo e córtex frontal, representado pela diminuição dos índices de peroxidação lipídica em ratos diabéticos (Venturini et al., 2010).

As evidências citadas anteriormente indicam que diversos fatores, incluindo a hiperglicemia e a deficiência de insulina no SNC, podem desencadear mecanismos neurotóxicos que prejudicam a plasticidade neural em distintas regiões e núcleos encefálicos, capazes de gerar disfunções motoras e cognitivas no DMT1 e no DMT2. Por outro lado, as ações benéficas à saúde promovidas pelo resveratrol podem ser capazes de estabilizar ou até mesmo atenuar as consequências deletérias do DM sobre o SNC. Nesse sentido, é importante avaliar os efeitos do DM experimental e a ação do resveratrol sobre aspectos comportamentais e em regiões encefálicas envolvidas no controle motor e no processamento de memórias, como a SNPC e o hipocampo, respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da terapia com resveratrol sobre o comportamento motor, a histologia dopaminérgica com possível implicação funcional, a memória aversiva e o estado oxidativo hipocampal em ratos *Wistar* machos adultos com DM semelhante ao tipo 1 induzido por STZ.

2.2 Objetivos específicos

- I) Analisar os efeitos da terapia via oral com resveratrol sobre diferentes parâmetros locomotores, no teste do campo aberto e no teste da barra horizontal, em ratos *Wistar* machos adultos com DM semelhante ao tipo 1 induzido por STZ e seu controle;
- II) Avaliar os efeitos da terapia via oral com resveratrol sobre as densidades neuronal e glial na SNPC, empregando-se o método de Nissl avaliado por morfometria planar, em ratos *Wistar* machos adultos com DM semelhante ao tipo 1 induzido por STZ e seu controle;
- III) Analisar os efeitos da terapia via oral com resveratrol sobre a imunorreatividade para TH na SNPC de ratos *Wistar* machos adultos com DM semelhante ao tipo 1 induzido por STZ e seu controle;
- IV) Avaliar os efeitos da terapia via oral com resveratrol sobre a memória aversiva, empregando-se a tarefa do condicionamento aversivo ao contexto (CAC), em ratos *Wistar* machos adultos com DM semelhante ao tipo 1 induzido por STZ e seu controle;
- V) Avaliar os efeitos da terapia via oral com resveratrol sobre o conteúdo total de espécies reativas e a atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD no hipocampo de ratos *Wistar* machos adultos com DM semelhante ao tipo 1 induzido por STZ e seu controle.

3. MODO DE APRESENTAÇÃO DOS MÉTODOS E RESULTADOS

Os métodos e resultados são constituídos pelos capítulos 1 e 2:

Capítulo 1, no qual consta o primeiro artigo da tese, publicado no periódico *Brain Research* (Fator de Impacto em 2016: 2.56);

Capítulo 2, no qual consta o segundo artigo da tese, submetido ao periódico *Neuroscience Letters* (Fator de Impacto em 2016: 2.10).

3.1 Capítulo 1

Artigo: Resveratrol prevents akinesia and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats.

Brain Research

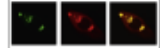
DOI: 10.1016/j.brainres.2014.10.007

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

Resveratrol prevents akinesia and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats



Pamela Brambilla Bagatini^{a,b}, Léder Leal Xavier^c, Laura Tartari Neves^c, Lisiani Saur^c, Sílvia Barbosa^a, Pedro Porto Alegre Baptista^c, Otávio Américo Augustin^a, Priscylla Nunes de Senna^{a,b}, Régis Gemerasca Mestriner^c, André Arigony Souto^d, Matilde Achaval^{a,b,*}

^aLaboratório de Histoфизиologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Sarmiento Leite, 500, 90040-060 Porto Alegre, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Sarmiento Leite, 500, 90040-060 Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^dLaboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química Pura, Faculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 5 October 2014

Available online 22 October 2014

Keywords:

Diabetes

Resveratrol

Akinesia

Immunoreactivity

Tyrosine hydroxylase

Substantia nigra pars compacta

ABSTRACT

This study evaluated the effects of resveratrol on locomotor behaviors, neuronal and glial densities, and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of rats with streptozotocin-induced diabetes. Animals were divided into four groups: non-diabetic rats treated with saline (SAL), non-diabetic rats treated with resveratrol (RSV), diabetic rats treated with saline (DM) and diabetic rats treated with resveratrol (DM+RSV). The animals received oral gavage with resveratrol (20 mg/kg) for 35 days. The open field test and the bar test were performed to evaluate bradykinesia and akinesia, respectively. The Nissl-stained neuronal and glial densities and the dopaminergic neuronal density were estimated using planar morphometry. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity was evaluated using regional and cellular optical densitometry. In relation to the locomotor behaviors, it was observed that the DM group developed akinesia, which was attenuated by resveratrol in the DM+RSV group, while the DM and DM+RSV groups showed bradykinesia. Our main morpho-physiological results demonstrated: a decrease in the cellular tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the DM group, which was attenuated by resveratrol in

*Corresponding author at: Laboratório de Histoфизиologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Sarmiento Leite 500, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Sala 312, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: pamela.bagatini@yahoo.com.br (P.B. Bagatini), lxavier@puccs.br (L.L. Xavier), laura.tartari@hotmail.com (L.T. Neves), lisi_saur@yahoo.com.br (L. Saur), sgentil@hotmail.com (S. Barbosa), pedropoa@gmail.com (P.P.A. Baptista), otavio_aa@yahoo.com.br (O.A. Augustin), priscyllasenna@hotmail.com (P.N. de Senna), regis.mestriner@puccs.br (R.G. Mestriner), arigony@puccs.br (A.A. Souto), machaval@pq.cnpq.br (M. Achaval).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.007>

0006-8993/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

the DM+RSV group; a higher neuronal density in the RSV group, when compared to the DM and DM+RSV groups; an increase in the glial density in the DM group, which was also reversed by resveratrol in the DM+RSV group. Resveratrol treatment prevents akinesia development and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity and glial density in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats, suggesting that this polyphenol could be a potential therapeutic option against diabetes-induced nigrostriatal dysfunctions.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, which is increasingly seen as a public health burden worldwide (American Diabetes Association, 2012; Shaw et al., 2010). Chronic high blood glucose levels are related with the development of long-term dysfunctions and failure of various organs (Fowler, 2008). New evidence has emerged of the damage caused to the central nervous system and the cognitive deficits in diabetic patients with poor glycemic control (Biessels, 2013; Sima, 2010; Van Harten et al., 2006). Electrophysiological, neurochemical and structural brain abnormalities have been described in diabetic experimental models and in patients. Also, behavioral dysfunctions including psychomotor efficiency, motor speed and motor strength, have been observed (Biessels et al., 1994; Reagan, 2013; Roriz-Filho et al., 2009; Sims-Robinson et al., 2010).

In humans, studies suggest that diabetes has a potential impact on the development and/or the progression of Parkinson's disease (PD) (Cereda et al., 2013; Sun et al., 2012; Xu et al., 2011), a neurodegenerative disorder in dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc) which leads to reduced striatal dopamine levels and motor disabilities, such as akinesia, bradykinesia, resting tremor, and gait abnormalities (Dauer and Przedborski, 2003). Tyrosine hydroxylase (TH) is an important enzyme involved in dopamine production, catalyzing the conversion of the amino acid L-tyrosine to L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), which is a rate-limiting step in the biosynthesis of dopamine (Nakashima et al., 2009). Streptozotocin (STZ)-induced diabetes has been shown to impair motor skills in rats, reducing the levels of RNAm for TH, as well as lowering the TH tissue content, mainly in the SNpc (Do Nascimento et al., 2011; Figlewicz et al., 1996).

There is a growing interest in the therapeutic potential of natural products to mitigate the negative effects of diabetes. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a polyphenol found in grapes and red wine, peanuts, different types of berries, and over 70 plant species (Harikumar and Aggarwal, 2008). This compound has been shown to exert pleiotropic effects on the modulation of various cell-signaling molecules and in the regulation of gene expression, which in turn can promote the expression of antioxidant enzymes, suppress the expression of inflammatory biomarkers, and modulate regulatory cell cycle genes (Baur and Sinclair, 2006; Harikumar and Aggarwal, 2008).

Interestingly, in STZ-induced diabetic rats, resveratrol has been shown to trigger beneficial effects in different brain areas by protecting against oxidative stress (Ates et al., 2007; Venturini et al., 2010), by ameliorating neurodegeneration and attenuating the expression of pro-inflammatory mediators and astrocytic activation in the hippocampus (Jing et al., 2013), and by preventing memory deficits (Schmatz et al., 2009). Furthermore, in PD rodent models, it has been demonstrated that treatment with resveratrol reduces motor disabilities and provides neuroprotection in the SNpc (Jin et al., 2008; Khan et al., 2010; Wang et al., 2011).

There is a lack of experimental evidence regarding the locomotor and neurohistological consequences of resveratrol treatment related to TH expression in the SNpc of diabetic rats. Thus, the goal of our study was to investigate the effects of oral treatment with resveratrol on locomotor behaviors, neuronal and glial densities, and regional and cellular TH immunoreactivity in the SNpc of rats with STZ-induced diabetes.

2. Results

A timeline with our experimental design can be seen in Fig. 1.

2.1. Statistical power analysis

The statistical power test is a helpful tool to calculate the minimum number of animals required to ensure reliable results. In the present study, the means and standard deviations from each parameter analyzed were used to estimate the statistical powers.

The findings of the statistical power analysis for body weight, blood glucose, bar test and open field evaluations were 100% for all these parameters. The findings for the density of the Nissl-stained neuronal and glial cells, density of TH immunoreactive neurons, and regional and cellular TH optical densitometries (ODs) were 97.5%, 93.4%, 95.1%, 99.7% and 99.9%, respectively.

The high statistical power values obtained in this evaluation confirms that the number of animals used in our experiments was adequate, and ensures the probability of statistical type II error is reduced. Thus, all the achieved results are reliable.

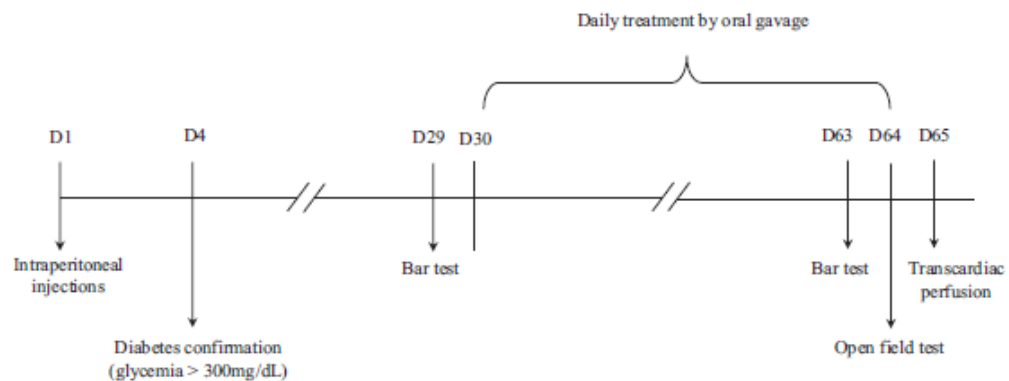


Fig. 1 – Timeline of the experimental design. D = day.

Table 1 – Body weight and blood glucose levels.

Groups	D1		D4		D30		D64	
	Weight (g)	Glycemia (mg/dL)	Weight (g)	Glycemia (mg/dL)	Weight (g)	Glycemia (mg/dL)	Weight (g)	Glycemia (mg/dL)
SAL	375.7±11.4	89.1±4.1	389.5±11.8	88±3.8	422.8±14.6	89.7±3.1	461.7±13.6	84.3±2.1
RSV	381.1±11.7	90.1±2.1	398.8±11.5	91.6±1.6	430.6±13.6	85.6±1.7	466.2±14.7	83.8±1.4
DM	368.2±4.9	86.5±3.2	328.7±6.9 ^a	446.4±30.6 ^{***}	307.8±8.9 ^{***}	510.6±23.7 ^{***}	299.8±7.7 ^{***}	479.1±22.6 ^{***}
DM+RSV	383.4±7.5	94.4±2.6	341.1±5.9 ^b	377.6±21.2 ^{***}	327.1±5.8 ^{***}	501.7±25.2 ^{***}	314.2±9.6 ^{***}	484.9±24.9 ^{***}

SAL: non-diabetic rats treated with saline, RSV: non-diabetic rats treated with resveratrol, DM: diabetic rats treated with saline, DM+RSV: diabetic rats treated with resveratrol. D: day.

^{***} Corresponds to $p < 0.001$ compared to SAL and RSV groups.

^a Corresponds to $p < 0.01$ compared to SAL group.

^b Corresponds to $p < 0.001$ compared to RSV group.

2.2. Body weight and blood glucose

On day 1 (D1), there was no significant difference in body weight between the groups. On D4, the DM group presented a significant decrease in body weight compared to the SAL and RSV groups ($p < 0.001$), likewise, the DM+RSV group presented a decrease when compared to the SAL ($p < 0.01$) and RSV ($p < 0.001$) groups. The body weight of diabetic rats from the DM and DM+RSV groups remained significantly lower on D30 and D64 ($p < 0.001$) (Table 1).

Analysis of the glycemia data showed no differences in blood glucose levels between the groups on D1. From D4 onward, the blood glucose levels of rats from the DM and DM+RSV groups were significantly increased when compared to the SAL and RSV groups ($p < 0.001$) (Table 1).

2.3. Locomotor analyses

2.3.1. Bar test

On D29, the time spent on the bar was not significantly different between the SAL (1.44 ± 0.28), RSV (0.93 ± 0.20), DM (1.67 ± 0.23) and DM+RSV (1.52 ± 0.16) groups (Fig. 2). On D63, rats from the DM group presented a significantly higher degree of akinesia (3.47 ± 0.52) than the SAL (1.75 ± 0.31 ;

$p < 0.05$), RSV (1.64 ± 0.33 ; $p < 0.01$) and DM+RSV (1.83 ± 0.36 ; $p < 0.05$) groups (Fig. 2).

2.3.2. Open field test

Analysis of the number of lines crossed in the open field test revealed that rats from the DM (35.25 ± 4.58) and DM+RSV (35.18 ± 15.23) groups crossed a significantly lower number of lines when compared to rats from the SAL (59.77 ± 4.21 ; $p < 0.05$) and RSV (63.15 ± 7.46 ; $p < 0.01$) groups (Fig. 3a).

The average speed in the DM group (0.02 ± 0.00) was lower than in the SAL (0.03 ± 0.00 ; $p < 0.05$) and RSV (0.03 ± 0.00 ; $p < 0.01$) groups, with no significant difference compared to the DM+RSV group (0.02 ± 0.00) (Fig. 3b).

No significant changes in maximum speed, time mobile and time immobile between groups were observed (data not shown).

2.4. Histological and immunohistochemical analyses

2.4.1. Nissl-stained neuronal and glial density estimation

The neuronal density was significantly reduced in the DM (2.51 ± 0.21 ; $p < 0.01$) and DM+RSV (2.98 ± 0.30 ; $p < 0.05$) groups when compared to the RSV group (5.10 ± 0.69), while no such difference was observed in comparison to the SAL group (3.51 ± 0.34) (Fig. 4a).

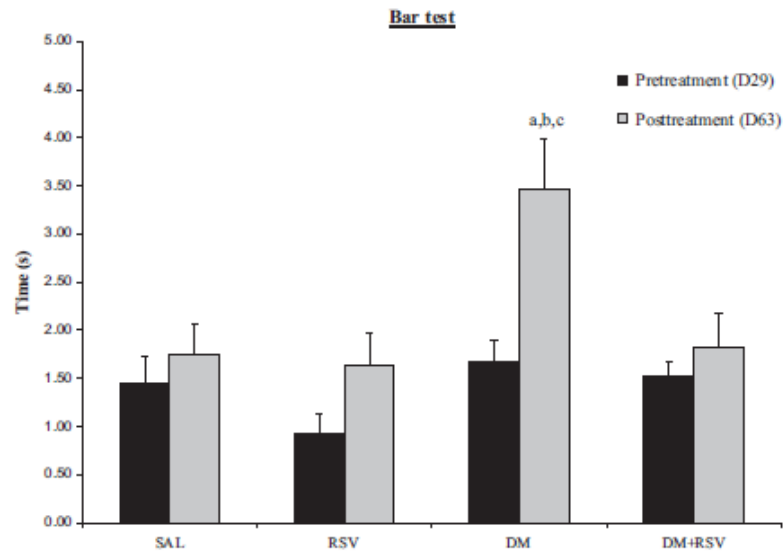


Fig. 2 – Latency to remove both paws from the horizontal bar in the bar test. ^aCorresponds to $p < 0.05$ compared to the SAL group, ^bcorresponds to $p < 0.01$ compared to the RSV group, and ^c corresponds to $p < 0.05$ compared to the DM+RSV group in posttreatment evaluation.

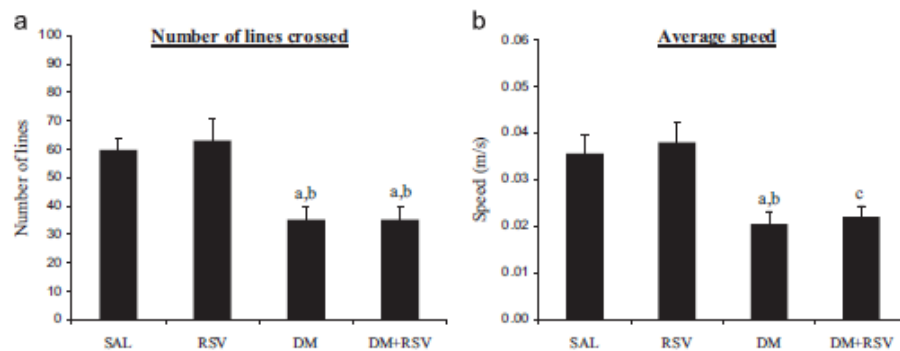


Fig. 3 – (a) Number of lines crossed in the open field test. ^aCorresponds to $p < 0.05$ compared to the SAL group, and ^b corresponds to $p < 0.01$ compared to the RSV group. (b) Average speed in the open field test. ^aCorresponds to $p < 0.05$ compared to the SAL group, ^b corresponds to $p < 0.01$ compared to the RSV group, and ^c corresponds to $p < 0.05$ compared to the RSV group.

The glial density was significantly increased in the DM group (1.98 ± 0.19) compared to the SAL (1.10 ± 0.16) and DM+RSV (1.26 ± 0.12) groups ($p < 0.05$), with no significant difference when compared to the RSV group (1.59 ± 0.13) (Fig. 4b).

Digitized images of Nissl-stained neuronal and glial cells in the SNpc of the experimental groups can be seen in Fig. 5.

2.4.2. TH immunoreactive neuronal density estimation

A significant reduction in TH immunoreactive neuronal density was only observed in the DM group (2.53 ± 0.38) when

compared to the RSV group (4.26 ± 0.22 ; $p < 0.05$), while no such difference was found in comparison with the SAL (3.63 ± 0.30) and DM+RSV (3.33 ± 0.18) groups (Fig. 6a).

2.4.3. Optical densitometry

Evaluation of regional OD demonstrated a reduction in TH immunoreactivity in the DM group (0.07 ± 0.00) when compared to the RSV (0.11 ± 0.00) and DM+RSV (0.11 ± 0.00) groups ($p < 0.05$), however, when compared to the SAL group, no difference was found (0.10 ± 0.00) (Fig. 6b).

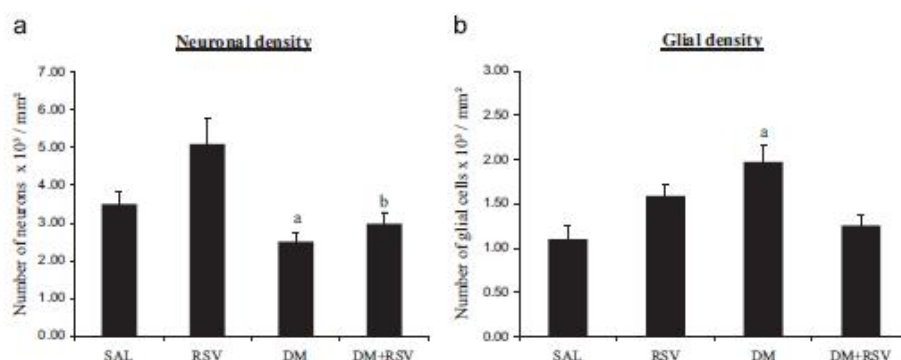


Fig. 4 – (a) Density of the Nissl-stained neurons in the SNpc. ^a corresponds to $p < 0.01$ compared to the RSV group, and ^b corresponds to $p < 0.05$ compared to the RSV group. (b) Density of the Nissl-stained glial cells in the SNpc. ^a corresponds to $p < 0.05$ compared to the SAL and DM+RSV groups.

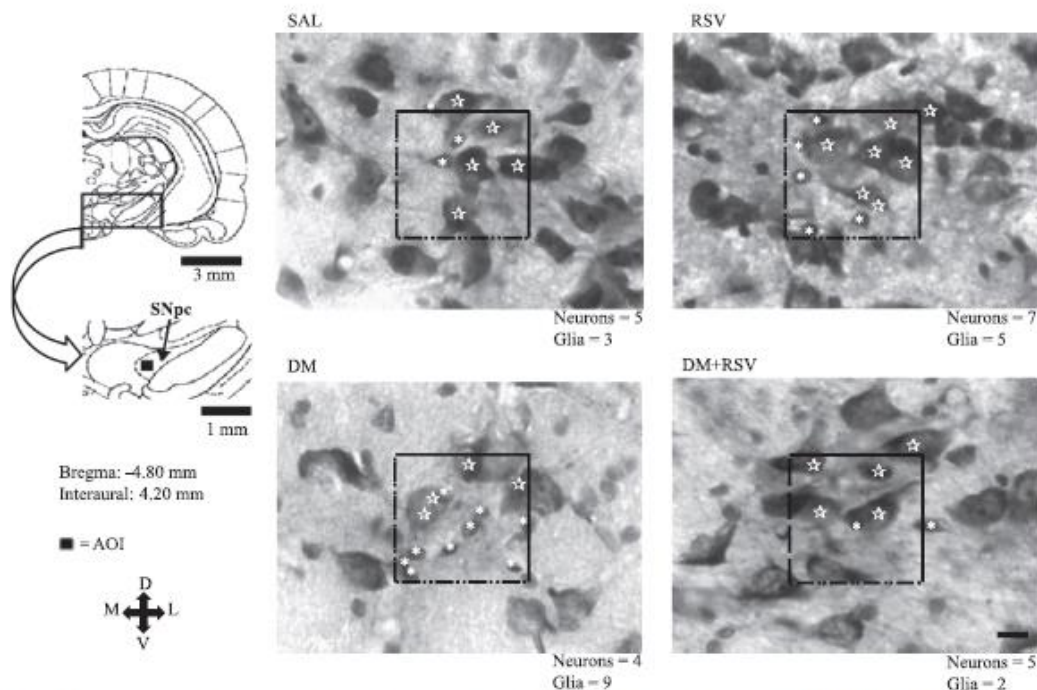


Fig. 5 – Digitized images from coronal mesencephalic sections, showing Nissl-stained neuronal and glial cells in the SNpc in the four experimental groups (SAL, RSV, DM and DM+RSV). Note the relative size of the area of interest (AOI) used to determine neuronal and glial densities. Neurons and glia located inside the AOI, or intersected by the upper and/or right edge of the AOI (continuous lines) were counted; neurons and glia that were intersected by the lower and/or left edge of the AOI (traced lines) were not counted. In the digitalized images, the stars (☆) depict neuronal cells, and the asterisks (∗) depict glial cells; the total number of neurons and glia counted are presented in each image. The schemating drawings were modified from Paxinos and Watson (1998)'s atlas. Scale bar in the SNpc image: 10 μm.

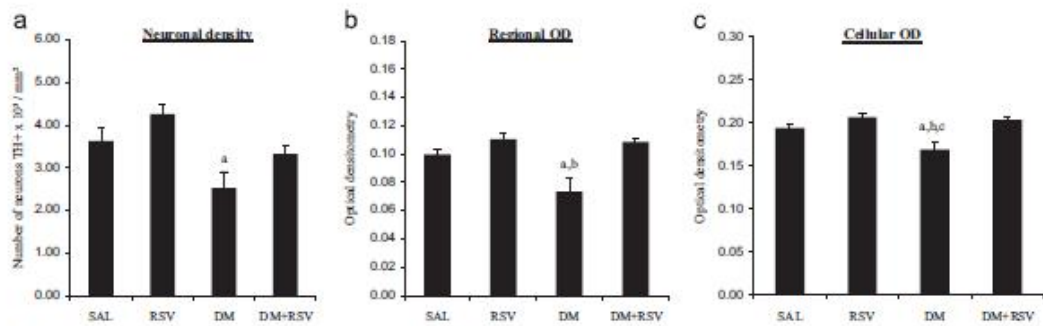


Fig. 6 – (a) Density of TH immunoreactive neurons in the SNpc. ^aCorresponds to $p < 0.05$ compared to the RSV group. (b) Regional OD in the SNpc. ^aCorresponds to $p < 0.05$ compared to the RSV group, and ^b corresponds to $p < 0.05$ compared to the DM+RSV group. (c) Cellular OD in the SNpc. ^aCorresponds to $p < 0.05$ compared to the SAL group, ^b corresponds to $p < 0.01$ compared to the RSV group, and ^c corresponds to $p < 0.01$ compared to the DM+RSV group.

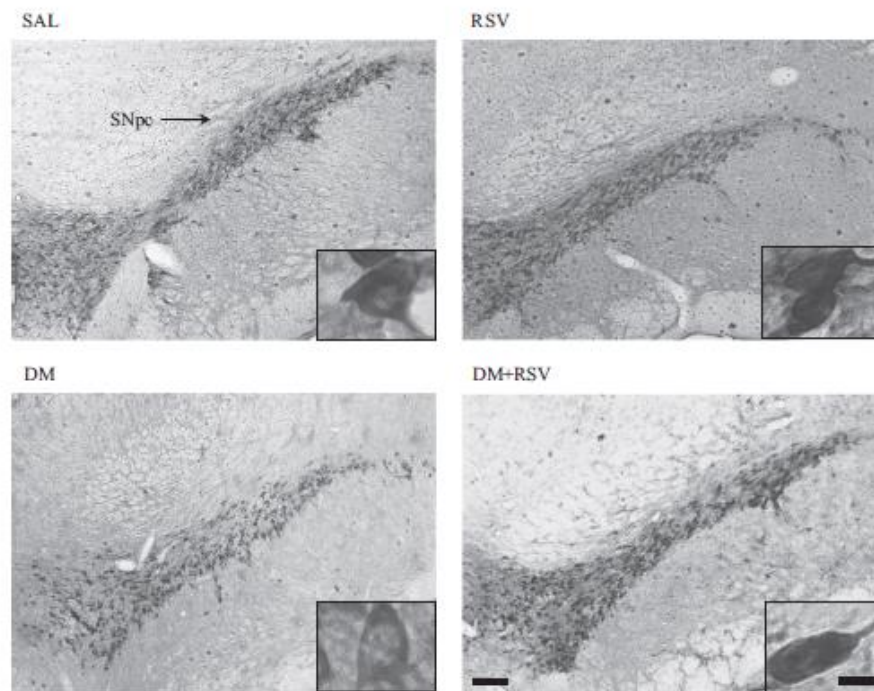


Fig. 7 – Digitized images from coronal mesencephalic sections, showing TH immunoreactivity in the SNpc in the four experimental groups (SAL, RSV, DM and DM+RSV). Images of the TH immunoreactive nigral neurons corresponding to each group are detailed in the lower left corner of the SNpc images. Note the reduced TH immunoreaction in the digitized image of the neuron from the DM group, compared to the SAL, RSV and DM+RSV groups. SNpc scale bar: 160 μm ; neuron scale bar: 10 μm .

In cellular OD data analysis, the DM group presented a lower TH immunoreactivity in neuronal somata (0.17 ± 0.00) when compared to the SAL (0.19 ± 0.00 ; $p < 0.05$), RSV (0.21 ± 0.00 ; $p < 0.01$) and DM+RSV (0.20 ± 0.00 ; $p < 0.01$) groups (Fig. 6c).

Digitized images of TH immunoreactivity in the SNpc of the experimental groups can be seen in Fig. 7.

3. Discussion

In diabetes, the primary cause of hyperglycemia is the deficient action of insulin on target tissues, which generates abnormalities in carbohydrate, lipid and protein metabolism. Uncontrolled high blood glucose levels triggers the classical

clinical symptoms of the disease, including marked polyuria, polydipsia and weight loss (American Diabetes Association, 2012). In the present study, these characteristics were observed in all the animals with STZ-induced diabetes and, as previous studies have shown, treatment with resveratrol was unable to influence the blood glucose levels and body weights of diabetic and non-diabetic rats (Ates et al., 2007; Kumar et al., 2007; Schmatz et al., 2009; Venturini et al., 2010).

Our experimental design demonstrated that STZ-induced diabetes can lead to two locomotor abnormalities which are hallmark symptoms of PD. Diabetic rats from the DM group presented a higher degree of akinesia in the bar test, and diabetic rats from both the DM and DM+RSV groups showed significant bradykinesia in the open field test, as shown by the decreased number of lines crossed and lower average speed. To the best of our knowledge, our study is the first to demonstrate akinesia development in diabetic rodents. Previous experimental evidences have demonstrated bradykinesia in rats with STZ-induced diabetes during the open field test (De Senna et al., 2011; Do Nascimento et al., 2011; Grzeda et al., 2007; Haider et al., 2013). In diabetic patients, psychomotor efficiency and motor speed are cognitive processes that can be negatively affected (Sims-Robinson et al., 2010), and the onset of diabetes prior to the development of PD is considered a risk factor for more severe Parkinsonian clinical symptoms (Cereda et al., 2012), suggesting that diabetes has a negative impact on nigrostriatal physiology.

Bradykinetic behaviors were not ameliorated by oral treatment with resveratrol. However, resveratrol was able to protect against akinesia development during the time course of the diabetes. This result demonstrates an unprecedented positive effect of resveratrol on this locomotor deficit, possibly due to its capability to attenuate some pathological mechanisms in brain regions responsible for motor control, such as the basal ganglia and cerebellum (Ates et al., 2007; Biessels et al., 1994; Cheema et al., 2011; Huang et al., 2012; Sima, 2010; Venturini et al., 2010).

Moreover, we demonstrated that diabetes leads to an increase in the density of Nissl-stained glial cells in the SNpc. The study by Wang et al. (2014) showed an increase in the number of microglial cells in the SNpc of diabetic mice. Therefore, the increased density of glial cells observed in our study may be the result of microglial reactivity.

On the other hand, the density of Nissl-stained neurons and TH immunoreactive neurons remained unaltered in the diabetic animals, when compared to the SAL group. Comparable to our findings, Wang et al. (2014) also showed no difference in the number of TH immunoreactive neurons in the SNpc of diabetic mice.

In addition, a decrease in cellular TH immunoreactivity was observed in diabetic rats, supporting the findings of the study from Do Nascimento et al. (2011) that showed a reduction in TH immunoreactivity in the SNpc of diabetic rats accompanied by bradykinesia in the open field test.

All these data suggest that microglia could act as an important factor in the dysfunctions seen in the SNpc of diabetic rodents, instigating inflammatory processes that might contribute to neurochemical impairments, such as the diminished cellular content of TH in nigral neurons (Hirsch and Hunot, 2009; Wang et al., 2014).

For the first time, our study showed that late starting (30 days) oral resveratrol treatment produces beneficial effects in the SNpc of diabetic rats by restoring glial density and cellular TH immunoreactivity. Other positive influences related to resveratrol treatment are that the RSV group presents increased Nissl-stained neuronal density when compared to the DM and DM+RSV groups, and the RSV and DM+RSV groups present increased regional TH immunoreactivity when compared to the DM group.

The SNpc is located in the ventral mesencephalon and is a constituent of the basal ganglia circuit. It receives inputs from the prefrontal cortex - striatum pathway, and projects dopaminergic outputs to the striatum (Dauer and Przedborski, 2003). Earlier studies demonstrated that diabetes is associated with a higher risk of PD development (Sun et al., 2012; Xu et al., 2011). Thus, the reduced TH neuronal content observed in our study could represent the beginning of a neurodegenerative process anteceded by microglial reactivity in the SNpc, as previously suggested (Halliday and Stevens, 2011; Wang et al., 2014). As well, the reduction in neuronal TH might lead to striatal dopamine deficiency and altered basal ganglia physiology, which in turn could lead to voluntary motor control impairment and development of classical PD symptoms in diabetic rats, such as akinesia and bradykinesia (Dauer and Przedborski, 2003).

In addition to the reduced TH content observed in nigral dopaminergic neurons, the alterations in motor behaviors found in the diabetic rats could have been incremented by peripheral neuropathy, low muscle mass and/or poor muscle strength (Andersen, 2012; Kalyani et al., 2014; Zangiabadi et al., 2011). As mentioned above, the open field test revealed dysfunctions in locomotor parameters in our diabetic groups. On the other hand, a cardinal feature of PD is difficulty initiating movement, which is evaluated by the bar test in rodents. Peripheral neuropathy and decreased muscle mass and strength could contribute to the development of akinesia in our diabetic model. However, the evidence from our study suggests the decreased cellular dopaminergic content in the SNpc is one of the main factors responsible for the development of akinesia, because this locomotor dysfunction was absent when this decrease was attenuated by resveratrol treatment in the DM+RSV group. It is important to remember that resveratrol was unable to reverse weight loss, which could have decreased muscle mass and strength in the DM+RSV group. This question might be better answered in future studies designed to assess the isolated effects of peripheral neuropathy, muscle mass and muscle strength in the akinesia degree, using the bar test.

The mechanisms involved in diabetes-induced nigrostriatal impairments are not well recognized. Hyperglycemia exerts neurotoxic effects by increasing the formation of reactive oxygen species (ROS) and advanced glycation end-products (AGEs), which enhance inflammatory responses and contribute to the development of microvascular brain pathology (Biessels, 2013; Roriz-Filho et al., 2009; Tomlinson and Gardiner, 2008). Furthermore, insulin is an important neurotrophic factor that regulates dopamine concentrations in the brain. In PD patients, a reduction was observed in the immunoreactivity and the expression of mRNA for insulin receptor in the substantia nigra, showing that insulin

deficiency possibly impairs neural plasticity in the SNpc (Craft and Watson, 2004; Roriz-Filho et al., 2009; Sima, 2010).

Oxidative stress and neuroinflammation are implicated in the pathophysiology of PD and diabetes-induced brain damages (Hirsch et al., 2012; Jenner, 2003; Sima, 2010; Wright et al., 2009). These mechanisms indicate that PD and diabetes possibly share common pathways that lead to glial changes and neuronal dysfunctions (Santiago and Potashkin, 2013).

Interestingly, the beneficial actions of resveratrol in the SNpc could be associated with multiple mechanisms. In cultured dopaminergic neurons, resveratrol was able to modulate the astroglial production of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), which are essential for neuronal and glial development, maintenance and survival (Zhang et al., 2012). In a model of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mid-brain neuron-glia cultures, resveratrol has been reported to protect dopaminergic neurons by reducing microglial reactivity and the generation of ROS and proinflammatory factors (Zhang et al., 2010). Resveratrol also provide neuroprotection in experimental models of PD and diabetes, by diminishing lipid peroxidation and the production of ROS, restoring the levels of antioxidant enzymes, and decreasing the content of proinflammatory cytokines (Ates et al., 2007; Jin et al., 2008; Jing et al., 2013; Khan et al., 2010; Lofrumento et al., 2014; Venturini et al., 2010).

Thus, the modulation of neurotrophic factors generation and redox status, and the antiinflammatory effects could explain the positive impact of resveratrol treatment on glial density and cellular TH immunoreactivity in the SNpc, and on the prevention of akinesia development in diabetic rats.

3.1. Conclusions

Our study demonstrated that experimental diabetes induced by STZ in rats can generate dysfunctions related to PD pathogenesis, such as akinesia, bradykinesia, increased glial density and reduced cellular TH immunoreactivity in the SNpc. Interestingly, on the 30th day following diabetes induction, beneficial effects were achieved by oral treatment with resveratrol, which was found to protect against akinesia, and to restore the glial density and the cellular TH immunoreactivity in the SNpc. Based on our results, we suggest that resveratrol might represent a relevant therapeutic option against diabetes-induced nigrostriatal dysfunctions. This is a novel finding and further investigation into this subject is required in experimental and clinical trials.

4. Experimental procedures

4.1. Chemicals

Streptozotocin (STZ), monoclonal antibody for tyrosine hydroxylase (TH) raised in mice, anti-mouse antibody conjugated with peroxidase, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and cresyl violet were obtained from Sigma Chemical Co. (USA). Thiopental (sodium thiopental) was purchased from Cristalia (Brazil), and bovine serum albumin (BSA) from Inlab (Brazil).

Isopentane and Entellan were obtained from Merck (Germany). *Trans-resveratrol* (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene, extracted from *Polygonum cuspidatum*) was purchased from Chengdu Hawk Bio-Engineering (Beijing, China), and presented >99% of purity (confirmed by high performance liquid chromatography), as previously described (Souto et al., 2001). All other chemicals used were of analytical reagent grade.

4.2. Animals

Forty nine male Wistar rats obtained from the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS), aged 12 weeks at the start of the experiment were used. Rats were housed in groups of three animals per cage. They were maintained under standard laboratory conditions, with free access to rat chow and water and a 12:12 light/dark cycle (lights on from 08:00 to 20:00 h). The experiments were conducted in accordance with the University guidelines, and were previously approved by the animal ethics committee of the University.

4.3. Experimental design

The animals were randomly divided into four groups, as follows: non-diabetic rats treated with saline (SAL), non-diabetic rats treated with resveratrol (RSV), diabetic rats treated with saline (DM) and diabetic rats treated with resveratrol (DM+RSV). For the bar test, 12 rats from the SAL group, 12 rats from the RSV group, 11 rats from the DM group and 9 rats from the DM+RSV group were analyzed. In the open field test, 13 rats from the SAL group, 13 rats from the RSV group, 12 rats from the DM group and 11 rats from the DM+RSV group were analyzed. Five rats per group were selected for histological and immunohistochemical procedures and analyses.

4.4. Experimental induction of diabetes

After an overnight fasting period (6 h), diabetes was induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of STZ (65 mg/kg of body weight) diluted in 0.1 M sodium-citrate buffer, pH 4.5. The non-diabetic rats received an equivalent amount of sodium-citrate buffer. 72 h after injections, blood glucose levels were measured in blood collected from the rat tail using a portable glucometer (On Call Plus, ACON Laboratories, USA). Only animals with blood glucose levels >300 mg/dL and symptoms of polyuria and polydipsia were considered diabetic and selected for the present study. During the experiment, the blood glucose levels of all the animals were verified at four moments: D1 (before i.p. injections of STZ and/or vehicle), D4 (72 h after i.p. injections), D30 and D64.

4.5. Oral treatment

From D30 to D64, oral treatment was provided to all groups once a day, between 10:00 and 11:00 a.m., totaling 35 days of treatment. Resveratrol was freshly dispersed in 0.9% saline solution and promptly administered via oral gavage to animals belonging to the RSV and DM+RSV groups, at a dose of

20 mg/kg of body weight, based on previous studies (Jin et al., 2008; Venturini et al., 2010; Wang et al., 2011). Animals from the SAL and DM groups received equal volumes of 0.9% saline solution alone. Resveratrol was stored at 5 °C in an amber flask, protected from light. The body weights of the animals were verified on D1, D4 and D30 and, in order to better control the resveratrol dose, from D30 to D64, they were verified twice a week (on Mondays and Thursdays).

4.6. Locomotor analyses

4.6.1. Bar test

The bar test was performed one day before the beginning of the treatment (D29) and one day before the last day of treatment (D63) to estimate the degree of akinesia at different time points of our experimental design. Akinesia was evaluated by gently placing both forelimbs on a 9 cm high horizontal bar, and the latency to remove both paws from the bar was measured in seconds. A cut-off time of 120 s was used as a maximum score (Amalric et al., 1986; Baptista et al., 2013).

4.6.2. Open field test

On D64, each rat were gently placed in a predetermined corner of a 50 cm × 40 cm × 60 cm box, in which the floor was divided into 12 equal squares, and the behavior was recorded for 3 min with a digital videocamera (DCR-SR47, Sony, Japan) (Carrera et al., 1998; Do Nascimento et al., 2011). ANY-maze software (version 4.70, Stoelting) was used to provide an automated analysis of distinct locomotor parameters: number of lines crossed, average speed, maximum speed, time mobile and time immobile.

The animals were submitted to a single open field test to avoid habituation to the open field apparatus, which could lead to decreased exploration and locomotion in response to repeated exposure to the task apparatus (Baptista et al., 2013; Leussis and Bolivar, 2006).

4.7. Histological and immunohistochemical procedures

At D65, the rats were anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg of body weight, i.p.) and perfused transcardially with 0.9% saline solution, followed by 4% paraformaldehyde (PF) in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. The brains were quickly removed from the skulls, postfixed in the 4% PF solution for 4 h at room temperature, and cryoprotected by immersion in a 15% and 30% sucrose solution in 0.1 M PB at 4 °C, until they sank. Finally, the brains were rapidly frozen in isopentane previously cooled in liquid nitrogen, and kept in a –80 °C freezer for further procedures.

The mesencephalic area that comprises the SNpc was identified between the following coordinates: interaural 4.2 mm, bregma –4.8 mm, and interaural 2.7 mm, bregma –6.3 mm (Paxinos and Watson, 1998). Coronal sections (30 μm thickness) from the SNpc were obtained from each brain using a cryostat (CM1850, Leica, Germany) at –20 °C and collected in PB saline (PBS), pH 7.4. Serial sections were selected to the Nissl staining method or TH immunohistochemistry.

4.7.1. Nissl staining

For the Nissl (cresyl violet) staining method, sections were mounted on gelatin-coated slides and air-dried. Thereafter, sections were rehydrated and stained with 0.02% cresyl violet in acetate buffer.

4.7.2. TH immunohistochemistry

The free-floating sections were pre-treated with 3% hydrogen peroxide in PBS for 30 min at room temperature, washed with PBS and blocked with 2% BSA in PBS containing 0.4% Triton X-100 (PBS-Tx) for 30 min. Thereafter, the sections were incubated with monoclonal TH antibody raised in mice, diluted 1:3000 in PBS-Tx for 48 h at 4 °C.

Subsequently, sections were washed in PBS-Tx and incubated with anti-mouse antibody conjugated with peroxidase diluted 1:500 in PBS-Tx for 2 h at room temperature. Sections were washed in PBS, and immunoreactivity was visualized by incubation in DAB and hydrogen peroxide.

Control sections were prepared by omitting the primary antibody and replacing it with PBS-Tx. In our study, all brains were fixed and post-fixed for the same time in identical solutions, carefully processed at the same time, and incubated in the same immunostaining medium for the same period of time. These precautions were performed to avoid overreaction, differences in chromogen reaction, saturation of OD or changes in background staining levels.

4.8. Histological and immunohistochemical analyses

4.8.1. Nissl-stained neuronal and glial density estimation

The number of neurons and glial cells per mm² of the SNpc was estimated by planar morphometry. The images were acquired using an Olympus BX50 optic microscope (Olympus, Japan) coupled to a digital camera (Opton, Brazil) and Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics, USA).

To estimate the neuronal and glial densities, five sections were selected from each rat. Six digitized images (40x) from medial, intermediary and lateral SNpc regions were obtained from each section (three images from the left and three images from the right brain hemispheres). Then, 30 images of the SNpc were analyzed per animal.

A square area of interest (AOI) measuring 597 μm² was overlaid on each image. Neurons and glial cells located inside the AOI, or intersected by the upper and/or right edge of the AOI were counted. Neurons and glial cells that were intersected by the lower and/or left edge of the AOI were not counted (Ferraz et al., 2008; Xavier et al., 2005).

The neurons were identified by their large and pale (euchromatic) nuclei surrounded by a violet stained cytoplasm. Glial cells were identified by the small and dark (heterochromatic) nuclei, and by the absence of stained cytoplasm. The nucleoli of neuronal cells and the nuclei of glial cells were considered as the counting markers for neurons and glia, respectively.

4.8.2. TH immunoreactive neuronal density estimation

The number of TH immunoreactive neurons per mm² of SNpc was estimated by planar morphometry. The images were acquired using an Axio Imager A1 optic microscope

(Zeiss, Germany) coupled to an AxioCam HRC camera (Zeiss, Germany), and Image Pro Plus 6.0 software.

For estimation of the TH immunoreactive neuronal density, five sections from each rat were selected. Six digitized images (40x) from medial, intermediary and lateral SNpc regions were obtained from each section (three images from the left and three images from the right brain hemispheres). Then, 30 images of the SNpc were analyzed per animal.

A square AOI measuring $784\mu\text{m}^2$ was overlaid on each image. The somata of the TH immunoreactive neurons located inside the AOI, or intersected by the upper and/or right edge of the AOI were counted. The somata that were intersected by the lower and/or left edge of the AOI were not counted (Ferraz et al., 2008; Xavier et al., 2005).

4.8.3. Optical densitometry

Semi-quantitative densitometric analyses were used to measure the intensity of TH immunoreactivity in the SNpc (Do Nascimento et al., 2011; Ferraz et al., 2008; Xavier et al., 2005). For these analyses, the same images and software from the TH immunoreactive neuronal density estimation section were used.

For the regional OD analysis, the digitized images were converted to an 8-bit gray scale (0–255 Gy levels) and an AOI measuring $784\mu\text{m}^2$ was overlaid on each image. Six OD measurements from each medial, intermediary and lateral SNpc regions were acquired per section, totalizing 30 OD measurements per animal.

For cellular OD analysis, the digitized images were also converted to an 8-bit gray scale (0–255 Gy levels), and one AOI measuring $3.7\mu\text{m}^2$ was placed over two different neuronal somata (avoiding the nucleus) in each image. Two somata OD measurements from each medial, intermediary and lateral SNpc regions were acquired per section, totalizing 60 OD measurements per animal.

All lighting conditions and magnifications were kept constant during the process of capturing the images. Background staining subtraction and correction were done in accordance with our previous published protocol (Xavier et al., 2005).

The OD was calculated using the following formula:

$$\text{OD}(x,y) = -\log \left[\frac{(\text{INT}(x,y) - \text{BL})}{(\text{INC} - \text{BL})} \right]$$

where "OD(x,y)" is the optical density at pixel(x,y), "INT(x,y)" or intensity is the intensity at pixel(x,y), "BL" or black is the intensity generated when no light goes through the material, and "INC" is the intensity of the incidental light.

4.9. Statistical analyses

The statistical analyses were carried out using SPSS 11.0 (Statistical Package for the Social Sciences, USA), and the G*Power 3 software (Institut Für Experimentelle Psychologie, Heinrich Heine Universität, Germany) was used to calculate the statistical power (Faul et al., 2007). Data normality distribution was checked using the Kolmogorov-Smirnov test. Blood glucose, body weight and bar test data were analyzed using repeated measures analysis of variance (ANOVA), and differences between the groups were assessed using the Tukey post hoc test. Data from the open field test were

analyzed using multivariate two-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. Histological and immunohistochemical data were analyzed using univariate two-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. Results are expressed as mean \pm standard error of mean. $p < 0.05$ was considered significant.

Acknowledgments

This research was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Pamela Brambilla Bagatini was supported by a Ph. D. scholarship from CAPES. André Arigony Souto, Léder Leal Xavier and Matilde Achaval are CNPq investigators.

REFERENCES

- Amalric, M., Blasco, T.A., Smith, N.T., Lee, D.E., Swerdlow, N.R., Koob, G.F., 1986. "Catatonia" produced by alfenitil is reversed by methylaloxonium microinjections into the brain. *Brain Res.* 386 (1–2), 287–295, [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90165-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(86)90165-4).
- American Diabetes Association, 2012. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35 (Suppl. 1), S64–S71, <http://dx.doi.org/10.2337/dc12-s064>.
- Andersen, H., 2012. Motor dysfunction in diabetes. *Diabetes/Metab. Res. Rev.* 28 (Suppl. 1), 89–92, <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.2257> (November 2011).
- Ates, O., Cayli, S.R., Yucel, N., Altinoz, E., Kocak, A., Durak, M.A., Turkoz, Y., Yologlu, S., 2007. Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Clin. Neurosci: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 14 (3), 256–260, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2005.12.010>.
- Baptista, P.P.A., de Senna, P.N., Paim, M.F., Saur, L., Blank, M., do Nascimento, P., Ilha, J., Vianna, M.R.M., Mestriner, R., Xavier, L.L., 2013. Physical exercise down-regulated locomotor side effects induced by haloperidol treatment in Wistar rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 104, 113–118, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2012.12.020>.
- Baur, J.A., Sinclair, D.A., 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discovery* 5 (6), 493–506, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2060>.
- Biessels, G.J., 2013. Sweet memories: 20 years of progress in research on cognitive functioning in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 719 (1–3), 153–160, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.055>.
- Biessels, G.J., Kappelle, A.C., Bravenboer, B., Erkelens, D.W., Gispen, W.H., 1994. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia* 37, 643–650.
- Carrera, M.P., Brunhara, F.C., Schwarting, R.K.W., Tomaz, C., 1998. Drug conditioning induced by intrastriatal apomorphine administration. *Brain Res.* 790 (1–2), 60, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00047-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00047-X) (6).
- Cereda, E., Barichella, M., Cassari, E., Caccialanza, R., Pezzoli, G., 2012. Clinical features of Parkinson disease when onset of diabetes came first: a case-control study. *Neurology* 78 (19), 1507–1511, <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182553cc9>.
- Cereda, E., Barichella, M., Pedrolli, C., Klersy, C., Cassani, E., Caccialanza, R., Pezzoli, G., 2013. Diabetes and risk of Parkinson's disease. *Mov. Disorders: Official Journal of the*

- Movement Disorder Society 28 (2), 257, <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25211>.
- Cheema, H., Federman, D., Kam, A., 2011. Hemichorea-hemiballismus in non-ketotic hyperglycaemia. *J. Clin. Neurosci.*: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia 18 (2), 293–294, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2010.04.036>.
- Craft, S., Watson, G.S., 2004. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Neurology* 3, 169–178.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909, [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3).
- De Senna, P.N., Ilha, J., Baptista, P.P.A., do Nascimento, P.S., Leite, M.C., Paim, M.F., Gonçalves, C.A., Achaval, M., Xavier, L.L., 2011. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab. Brain Dis.* 26 (4), 269–279, <http://dx.doi.org/10.1007/s11011-011-9252-x>.
- Do Nascimento, P.S., Lovatel, G.A., Barbosa, S., Ilha, J., Centenaro, L.A., Malysz, T., Xavier, L.L., Schaan, B.D., Achaval, M., 2011. Treadmill training improves motor skills and increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta in diabetic rats. *Brain Res.* 1382, 173–180, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.063>.
- Paul, F., Erdfelder, E., Lang, A., Buchner, A., 2007. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods* 39, 177–191, <http://dx.doi.org/10.3758/BF03193146>.
- Feraz, A.C., Matheussi, F., Szawka, R.E., Rizelio, V., Delattre, A.M., Rigon, P., Hermel, E.E.S., Xavier, L.L., Achaval, M., Anselmo-Franci, J.A., 2008. Evaluation of estrogen neuroprotective effect on nigrostriatal dopaminergic neurons following 6-hydroxydopamine injection into the substantia nigra pars compacta or the medial forebrain bundle. *Neurochem. Res.* 33 (7), 1238–1246, <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-007-9575-7>.
- Figlewicz, D., Brot, M., McCall, A., Szot, P., 1996. Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res.* 736, 54–60.
- Fowler, M.J., 2008. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin. Diabetes* 26 (2), 77–82, <http://dx.doi.org/10.2337/diaclin.26.2.77>.
- Grzeda, E., Wiśniewska, R.J., Wiśniewski, K., 2007. Effect of an NMDA receptor agonist on T-maze and passive avoidance test in 12-week streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol. Rep.* 59 (6), 656–663 (Retrieved from) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18195454>).
- Haider, S., Ahmed, S., Tabassum, S., Menon, Z., Ikram, M., Haleem, D.J., 2013. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. *Acta Neurol. Belg.* 113 (1), 35–41, <http://dx.doi.org/10.1007/s13760-012-0121-2>.
- Halliday, G.M., Stevens, C.H., 2011. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov. Disorders* 26 (1), 6–17, <http://dx.doi.org/10.1002/23455>.
- Harikumar, K.B., Aggarwal, B.B., 2008. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 7, 1020–1035, <http://dx.doi.org/10.4161/cc.7.8.5740> (April).
- Hirsch, E.C., Hunot, S., 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. *Lancet Neurol.* 8 (4), 382–397, [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70062-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70062-6).
- Hirsch, E.C., Vyas, S., Hunot, S., 2012. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disorders* 18 (Suppl 1), S210, [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(11\)70065-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70065-7) (2).
- Huang, M., Gao, L., Yang, L., Lin, F., Lei, H., 2012. Abnormalities in the brain of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats revealed by diffusion tensor imaging. *NeuroImage Clin.* 1 (1), 57–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nicl.2012.09.004>.
- Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53 (Suppl. 3) <http://dx.doi.org/10.1002/ana.10483> (S26–36; discussion S36–8).
- Jin, F., Wu, Q., Lu, Y.-F., Gong, Q.-H., Shi, J.-S., 2008. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 600 (1–3), 78–82, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.005>.
- Jing, Y.-H., Chen, K.-H., Kuo, P.-C., Pao, C.-C., Chen, J.-K., 2013. Neurodegeneration in streptozotocin-induced diabetic rats is attenuated by treatment with resveratrol. *Neuroendocrinology* 98 (2), 116–127, <http://dx.doi.org/10.1159/000350435>.
- Kalyani, R.R., Corriere, M., Ferrucci, L., 2014. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2 (10), 819–829, [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70034-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70034-8).
- Khan, M.M., Ahmad, A., Ishrat, T., Khan, M.B., Hoda, M.N., Khuwaja, G., Raza, S.S., Khan, A., Javed, H., Vaibhav, K., Islam, F., 2010. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1328, 139–151, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.031>.
- Kumar, A., Kaundal, R.K., Iyer, S., Sharma, S.S., 2007. Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci.* 80 (13), 1236–1244, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.12.036>.
- Leussis, M.P., Bolívar, V.J., 2006. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30 (7), 1045–1064, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.03.006>.
- Lofrumento, D.D., Nicolardi, G., Cianciulli, A., De Nuccio, F., La Pesa, V., Carofoglio, V., Dragone, T., Calvello, R., Panaro, M.A., 2014. Neuroprotective effects of resveratrol in an MPTP mouse model of Parkinson's-like disease: Possible role of SOCS-1 in reducing pro-inflammatory responses. *Innate Imm.* 20 (3), 249–260, <http://dx.doi.org/10.1177/1753425913488429>.
- Nakashima, A., Hayashi, N., Kaneko, Y.S., Mori, K., Sabban, E.L., Nagatsu, T., Ota, A., 2009. Role of N-terminus of tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of catecholamines. *J. Neural Transm. (Vienna, Austria)* 116 (11), 1355–1362, <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-009-0227-8>.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Reagan, L.P., 2013. Diabetes as a chronic metabolic stressor: causes, consequences and clinical complications. *Exp. Neurol.* 233 (1), 68–78, <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.02.004>. DIABETES.
- Roriz-Filho, J., Sá-Roriz, T.M., Rosset, I., Camozzato, A.L., Santos, A.C., Chaves, M.L.F., Moriguti, J.C., Roriz-Cruz, M., 2009. (Pre) diabetes, brain aging, and cognition. *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (5), 432–443, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.12.003>.
- Santiago, J.A., Potashkin, J.A., 2013. Shared dysregulated pathways lead to Parkinson's disease and diabetes. *Trends Mol. Med.* 19 (3), 176–186, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2013.01.002>.
- Schmatz, R., Mazzanti, C.M., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierrez, J., Corrêa, M., da Rosa, M.M., Rubin, M.A., Schetinger, M., R., C. Morsch, V.M., 2009. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 610 (1–3), 42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.032> (8).
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z., 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87 (1), 4–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>.

- Sima, A.A.F., 2010. Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol* 47 (4), 279–293, <http://dx.doi.org/10.1007/s00592-010-0218-0>.
- Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A., Feldman, E.L., 2010. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nat. Rev. Neurol* 6 (10), 551–559, <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2010.130>.
- Souto, A.A., Carneiro, M.C., Seferin, M., Senna, M.J.H., Conz, A., Gobbi, K., 2001. Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC. *J. Food Compos. Anal.* 14 (4), 441–445, <http://dx.doi.org/10.1006/jfca.2000.0970>.
- Sun, Y., Chang, Y.-H., Chen, H.-F., Su, Y.-H., Su, H.-F., Li, C.-Y., 2012. Risk of Parkinson disease onset in patients with diabetes: a 9-year population-based cohort study with age and sex stratifications. *Diabetes Care* 35 (5), 1047–1049, <http://dx.doi.org/10.2337/dc11-1511>.
- Tomlinson, D.R., Gardiner, N.J., 2008. Glucose neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (1), 36–45, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2294>.
- Van Harten, B., de Leeuw, F., Weinstein, H., Scheltens, P., Biessels, G., 2006. Brain imaging in patients with diabetes. *Diabetes Care* 29 (11), 2539–2548, <http://dx.doi.org/10.2337/dc-06-1637>.
- Venturini, C.D., Merlo, S., Souto, A.A., Fernandes, M.D.C., Gomez, R., Rhoden, C.R., 2010. Resveratrol and red wine function as antioxidants in the nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. *Oxidative Med. Cell Longevity* 3 (6), 434–441, <http://dx.doi.org/10.4161/oxim.3.6.14741>.
- Wang, L., Zhai, Y.-Q., Xu, L.-L., Qiao, C., Sun, X.-L., Ding, J.-H., Lu, M., Hu, G., 2014. Metabolic inflammation exacerbates dopaminergic neuronal degeneration in response to acute MPTP challenge in type 2 diabetes mice. *Exp. Neurol.* 251, 22–29, <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.11.001>.
- Wang, Y., Xu, H., Fu, Q., Ma, R., Xiang, J., 2011. Protective effect of resveratrol derived from *Polygonum cuspidatum* and its liposomal form on nigral cells in parkinsonian rats. *J. Neurosci.* 304 (1–2), 29–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2011.02.025>.
- Wrighten, S.A., Piroli, G.G., Grillo, C.A., Reagan, L.P., 2009. A look inside the diabetic brain: contributors to diabetes-induced brain aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (5), 444–453, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.013>.
- Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Da Cunha, C., Deonizio, J.M.D., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 16 (1–3), 58–64, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresprot.2005.10.002>.
- Xu, Q., Park, Y., Huang, X., Hollenbeck, A., Blair, A., Schatzkin, A., Chen, H., 2011. Diabetes and risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care* 34 (4), 910–915, <http://dx.doi.org/10.2337/dc10-1922>.
- Zangiabadi, N., Asadi-Shekaari, M., Sheibani, V., Jafari, M., Shabani, M., Asadi, A.R., Tajadini, H., Jarahi, M., 2011. Date fruit extract is a neuroprotective agent in diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats: a multimodal analysis. *Oxidative Med. Cell. Longevity* 2011, 976948, <http://dx.doi.org/10.1155/2011/976948>.
- Zhang, F., Shi, J.-S., Zhou, H., Wilson, B., Hong, J.-S., Gao, H.-M., 2010. Resveratrol protects dopamine neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity through its anti-inflammatory actions. *Mol. Pharmacol.* 78 (3), 466–477, <http://dx.doi.org/10.1124/mol.110.064535>.
- Zhang, F., Wang, Y.-Y., Liu, H., Lu, Y.-F., Wu, Q., Liu, J., Shi, J.-S., 2012. Resveratrol produces neurotrophic effects on cultured dopaminergic neurons through prompting astroglial BDNF and GDNF release. Evidence-Based Complement. Altern. Med.: eCAM 2012, 937605, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/937605>.

3.2 Capítulo 2

Artigo submetido ao periódico *Neuroscience Letters*.

Manuscript Number:

Title: An evaluation of aversive memory and hippocampal oxidative status in streptozotocin-induced diabetic rats treated with resveratrol

Article Type: SI: Metabolism in neuroscience

Keywords: Diabetes; Resveratrol; Aversive memory; Free radical content; Antioxidant activity.

Corresponding Author: Miss. Pamela Brambilla Bagatini, MSc

Corresponding Author's Institution: UFRGS

First Author: Pamela Brambilla Bagatini, MSc

Order of Authors: Pamela Brambilla Bagatini, MSc; Leder L Xavier, PhD; Karine Bertoldi, MSc; Felipe Moysés, PhD; Gisele Lovatel, PhD; Laura T Neves; Silvia Barbosa, MSc; Lisiani Saur, MSc; Priscylla N De Senna, PhD; Andre A Souto, PhD; Ionara R Siqueira, PhD; Achaval Matilde, PhD

Abstract: The present study evaluated the effects of streptozotocin (STZ)-induced diabetes on aversive memory, free radical content and enzymatic antioxidant activity in the hippocampus of adult Wistar rats submitted to oral treatment with resveratrol. Animals were divided into eight groups: non-diabetic rats treated with saline (ND SAL), non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose 5 mg/kg (ND RSV 5), non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose 10 mg/kg (ND RSV 10), non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose 20 mg/kg (ND RSV 20), diabetic rats treated with saline (D SAL), diabetic rats treated with resveratrol at a dose 5 mg/kg (D RSV 5), diabetic rats treated with resveratrol at a dose 10 mg/kg (D RSV 10) and diabetic rats treated with resveratrol at a dose 20 mg/kg (D RSV 20). The animals received oral gavage for 35 days. The contextual fear conditioning task was performed to evaluate aversive-based learning and memory. The oxidative status was evaluated in the hippocampus, by measuring the free radical content - using a 2',7'-dichlorofluorescein diacetate probe - and enzymatic antioxidant activities, such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase. Our main behavioral results demonstrated that rats from the D RSV 10 and D RSV 20 groups showed an increase in freezing behavior when compared, respectively, to the ND RSV 10 ($p < 0.01$) and ND RSV 20 ($p < 0.05$). Oxidative stress parameters remained unchanged in the hippocampus of all the experimental groups. In contrast to previous experimental findings, our study was unable to detect either cognitive impairments or oxidative stress in the hippocampus of the diabetic rats. We suggest additional long-term investigations be conducted into the temporal pattern of STZ-induced diabetic disruption in memory and hippocampal oxidative status, as well as the effects of resveratrol on these parameters, in a time and dose-dependent manner.

Porto Alegre, July 1st, 2016.

S.G. Waxman
Editor-in-chief
Neuroscience Letters

Dear Dr Waxman

On behalf of all the authors, I would like to express my appreciation of the opportunity to submit an original article entitled "An evaluation of aversive memory and hippocampal oxidative status in streptozotocin-induced diabetic rats treated with resveratrol" for consideration in Neuroscience Letters-Special Issue-Metabolism in Neuroscience.

We believe that this manuscript would be of interest to the readers of the Neuroscience Letters-Special Issue-Metabolism in Neuroscience, because it offers new insights about the effects of streptozotocin-induced diabetes and resveratrol oral treatment in fear conditioning and hippocampal oxidative status.

The authors of this study are Pamela Brambilla Bagatini, Léder Leal Xavier, Karine Bertoldi, Felipe Moysés, Gisele Lovatel, Laura Tartari Neves, Sílvia Barbosa, Lisiani Saur, Priscylla Nunes de Senna, André Arigony Souto, Ionara Rodrigues Siqueira and Matilde Achaval. All the authors have read, approved the manuscript, and agreed to have their names listed as authors and have no conflicts to disclose. This research has not been previously published, nor is it under consideration by another journal.

We are grateful for your attention and look forward to hearing from you.

Sincerely yours,

Pamela Brambilla Bagatini
Laboratório de Histoфизиologia Comparada
Departamento de Ciências Morfológicas
UFRGS
Porto Alegre, RS, Brasil
E-mail: pamela.bagatini@yahoo.com.br

An evaluation of aversive memory and hippocampal oxidative status in streptozotocin-induced diabetic rats treated with resveratrol

Pamela Brambilla Bagatini^{ab}, Léder Leal Xavier^c, Karine Bertoldi^d, Felipe Moysés^d, Gisele Lovatel^d, Laura Tartari Neves^c, Sílvia Barbosa^a, Lisiani Saur^c, Priscylla Nunes de Senna^b, André Arigony Souto^e, Ionara Rodrigues Siqueira^d, Matilde Achaval^{ab*}.

^aLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Sarmiento Leite, 500, 90040-060, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Neurociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Sarmiento Leite, 500, 90040-060, Porto Alegre, RS, Brasil.

^cLaboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

^dPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Sarmiento Leite, 500, 90040-060, Porto Alegre, RS, Brasil.

^eLaboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química Pura, Faculdade de Química. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Corresponding author: Pamela Brambilla Bagatini, MSc

E-mail address: pamela.bagatini@yahoo.com.br

Phone: 55 51 99750276

Address: Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Avenida Sarmiento Leite 500, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Sala 312. CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

ABSTRACT

The present study evaluated the effects of streptozotocin (STZ)-induced diabetes on aversive memory, free radical content and enzymatic antioxidant activity in the hippocampus of adult *Wistar* rats submitted to oral treatment with resveratrol. Animals were divided into eight groups: non-diabetic rats treated with saline (ND SAL), non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose 5 mg/kg (ND RSV 5), non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose 10 mg/kg (ND RSV 10), non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose 20 mg/kg (ND RSV 20), diabetic rats treated with saline (D SAL), diabetic rats treated with resveratrol at a dose 5 mg/kg (D RSV 5), diabetic rats treated with resveratrol at a dose 10 mg/kg (D RSV 10) and diabetic rats treated with resveratrol at a dose 20 mg/kg (D RSV 20). The animals received oral gavage for 35 days. The contextual fear conditioning task was performed to evaluate aversive-based learning and memory. The oxidative status was evaluated in the hippocampus, by measuring the free radical content - using a 2',7'-dichlorofluorescein diacetate probe - and enzymatic antioxidant activities, such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase. Our main behavioral results demonstrated that rats from the D RSV 10 and D RSV 20 groups showed an increase in freezing behavior when compared, respectively, to the ND RSV 10 ($p < 0.01$) and ND RSV 20 ($p < 0.05$). Oxidative stress parameters remained unchanged in the hippocampus of all the experimental groups. In contrast to previous experimental findings, our study was unable to detect either cognitive impairments or oxidative stress in the hippocampus of the diabetic rats. We suggest additional long-term investigations be conducted into the temporal pattern of STZ-induced diabetic disruption in memory and hippocampal oxidative status, as well as the effects of resveratrol on these parameters, in a time and dose-dependent manner.

Keywords: Diabetes; Resveratrol; Aversive memory; Free radical content; Antioxidant activity.

1. INTRODUCTION

Diabetes mellitus comprises a group of metabolic disorders characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion and/or insulin insensitivity [1]. Recent clinical studies have confirmed that diabetes is associated with cortical atrophy, white matter lesions and the development of cognitive dysfunctions, which include impaired attention, intelligence, psychomotor speed and psychomotor efficiency [2], [3]. However, learning and memory deficits were not observed in all clinical studies [4]–[6]. Therefore, it has been suggested that such clinically relevant cognitive deficits might be related to the beginning of diabetes in two specific periods in life: during brain development in childhood, and when the brain undergoes neurodegenerative changes associated with ageing [7].

Despite differences between clinical data, deficient insulin signaling in the brain and hyperglycemia are considered potential contributors to the development of neurological complications in diabetes [3], [8], [9]. It has been reported that insulin participates in the regulation of apoptosis and oxidative status in the central nervous system (CNS), which could explain the link between disruption in insulin activity and neuronal and oligodendroglial degeneration in the diabetic brain [8], [10]. Hyperglycemia could raise free radical formation in the CNS through different mechanisms, including increased glycolysis, activation of the polyol pathway and increased formation of advanced glycation end-products (AGEs) [11], [12]. Moreover, reduced antioxidant activity has been observed in diabetic rodents, which together with the above-mentioned evidence may contribute to oxidative stress and to the development of cognitive dysfunctions in diabetes [3], [8], [13]. Nevertheless, some studies present contrasting findings, with no significant indications of learning and memory deficits, nor significant alterations in some parameters related to oxidative stress in the diabetic rodent brain, especially in the hippocampus [14]–[16].

Resveratrol, a polyphenolic compound found in peanuts, some berries, grapes and wine, is known to have beneficial health effects [17]. This compound presents antioxidant activities in the CNS, demonstrated by the ability to scavenge free radicals and up-regulate antioxidant enzymes [18]. Additionally, studies have suggested resveratrol produces benefits in the CNS of diabetic rodents, protecting them from memory

impairment, reducing the release of pro-inflammatory factors and reestablishing normal antioxidant enzyme levels [19], [20].

The aim of this study was to verify the effects of streptozotocin (STZ)-induced diabetes on aversive memory, free radical content and enzymatic antioxidant activity in the hippocampus of adult *Wistar* rats, and evaluate the influence of oral treatment with resveratrol on these parameters.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals

All procedures were conducted in accordance with the University guidelines, and were previously approved by the animal ethics committee of the University. Sixty-two male *Wistar* rats obtained from the *Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório* (CREAL, *Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS*), aged 12 weeks at the start of the experiment, were used. They were maintained under standard laboratory conditions, with free access to rat chow and water and a 12:12 light/dark cycle (lights on from 08:00 to 20:00 h). The animals were randomly divided into eight groups, as follows: non-diabetic rats treated with saline (ND SAL), non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 5 mg/kg body weight (ND RSV 5), non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 10 mg/kg body weight (ND RSV 10), non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 20 mg/kg body weight (ND RSV 20), diabetic rats treated with saline (D SAL), diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 5 mg/kg body weight (D RSV 5), diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 10 mg/kg body weight (D RSV 10) and diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 20 mg/kg body weight (D RSV 20). For the behavioral task, 7 to 8 rats per group were analyzed. For the biochemical analyses, 5 to 6 rats per group were used. A timeline with our experimental design can be seen in Fig. 1.

2.2 Diabetes induction

After an overnight fasting period, diabetes was induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of STZ (65 mg/kg of body weight) diluted in 0.1 M sodium-citrate buffer, pH

4.5. The non-diabetic rats received an equivalent amount of sodium-citrate buffer. 72 hours after i.p. injections, blood glucose levels were measured in blood collected from the rat tail using a portable glucometer (On Call Plus, ACON Laboratories, USA). Only animals with blood glucose levels > 300 mg/dL and symptoms of polyuria and polydipsia were considered diabetic and selected for the present study. During the experiment, the blood glucose levels of all the animals were verified at four moments: D1 (before i.p. injections of STZ and/or vehicle), D4 (72 h after i.p. injections), D30 and D64.

2.3 Oral gavage

From D30 to D64, oral treatment was provided to all groups once a day, between 10:00 and 11:00 a.m., totaling 35 days of treatment. Resveratrol was freshly dispersed in 0.9% saline solution and promptly administered via oral gavage to animals belonging to the ND RSV groups and the D RSV groups, in their respective doses, based on previous studies [14], [21]. Animals from the ND SAL and D SAL groups received equal volumes of 0.9% saline solution alone. Resveratrol was stored at 5° C in an amber flask, protected from light. The body weights of all the animals were verified on D1, D4 and D30 and, in order to better control the resveratrol dose, from D30 to D64, they were verified twice a week (on Mondays and Thursdays).

2.4 Contextual fear conditioning (CFC)

At D63, each rat was placed in a chamber (25.0 x 25.0 cm grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars, spaced 1.0 cm apart). In the training session, rats were placed in the chamber during 3 min for habituation, and after received two 2-second foot-shocks of 0.7 mA, separated by an interval of 30 seconds. After the last foot shock, animals were kept in the conditioning chamber an additional minute, and then returned to their home cages. At D64 (24 hours later), the rats were placed in the same context (without foot-shocks) for the testing session, and the freezing behavior of the animals were clocked during 5 minutes [22].

2.5 Biochemical analysis

At D65, the rats were killed by decapitation. Brains were removed from the skulls, hippocampi of animals were rapidly dissected out on ice and frozen in liquid nitrogen. They were stored at -80°C until the biochemical measurements were taken. On the day of analysis, the hippocampi were homogenized in ice-cold phosphate buffer (0.02 M, pH 7.4) containing EDTA (0.002 M) and phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF, 0.1 M) in a Teflon-glass homogenizer. Afterward, the homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min at 4°C , and the supernatant was used.

2.5.1 Reactive species levels

Reactive species levels were quantified using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe [23]. The oxidized fluorescent derivative (DCF) formation was monitored at excitation (488 nm) and emission (525 nm) wavelengths using fluorescence spectrophotometer. The reactive species content was measured using a DCF standard curve and results were expressed as nmol DCF formed per mg of protein. All procedures were performed in the dark, while the blanks containing DCFH-DA (no homogenate) were processed for auto fluorescence measurement [24], [25].

2.5.2 Superoxide dismutase (SOD) activity

The SOD activity was evaluated using a specific kit following the manufacturer's instructions (RANSOD kit, Randox Labs, USA). This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate a superoxide anion radical that reacts with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) to form a red formazan dye, which is measured at 37°C using a spectrophotometer reader (505 nm). The inhibition of chromogen production is proportional to the SOD sample activity and the data were expressed as unit of SOD per mg of protein.

2.5.3 Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was determined according to Wendel (1981) [26]. The reaction was carried out at 25°C in 600 μl of solution containing 100 mM pH 7.7 potassium phosphate

buffer, 1 mM EDTA, 0.4 mM sodium azide, 2 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.62 U of GSH reductase. The activity of selenium-dependent GPx was measured taking tert-butyl-hydroperoxide as the substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation was subtracted from the overall reaction rate. GPx activity was expressed as nmol NADPH oxidized per minute per mg of protein.

2.5.4 Protein determination

The total protein content of the tissue homogenates was measured by means of the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard, according to [27].

2.6 Data analysis

Body weight and blood glucose data were analyzed using repeated measures analysis of variance (ANOVA). The CFC and biochemical data were analyzed using two-way ANOVA. The Tukey's post-hoc test was used in these two ANOVAs. The results are shown as mean \pm standard error. In all the statistical tests, significance was set at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Body weight and blood glucose

On day 1 (D1), there was no significant difference in body weight between the groups. However, on D4, the diabetic groups D SAL, D RSV 5, D RSV 10 and D RSV 20 presented a significant weight loss compared to the non-diabetic groups ND SAL, ND RSV 5, ND RSV 10 and ND RSV 20 ($p < 0.001$). The body weight of the diabetic groups remained significantly lower in relation to the non-diabetic rats on D30 and D64 ($p < 0.001$) (Table 1).

Analysis of the glycaemia data showed no differences in blood glucose levels between the groups on D1. However, from D4 onward, the blood glucose levels of rats from the diabetic groups D SAL, D RSV 5, D RSV 10 and D RSV 20 were significantly

increased when compared to the non-diabetic groups ND SAL, ND RSV 5, ND RSV 10 and ND RSV 20 ($p < 0.001$) (Table 1).

3.2. Contextual fear conditioning (CFC)

Fig. 2 shows the freezing behavior exhibited during the test session, 24 hours after the training session. No significant differences in the pattern of freezing behavior were observed between the ND SAL and D SAL groups ($p > 0.05$). Our main behavioral results demonstrated that rats from the D RSV 10 and D RSV 20 groups showed an increase in freezing behavior when compared, respectively, to the ND RSV 10 ($p < 0.01$) and ND RSV 20 ($p < 0.05$).

3.3. Oxidative stress parameters

There were no significant differences in the hippocampal free radical content ($p = 0.20$), SOD activity ($p = 0.59$) and GPx activity ($p = 0.74$) between the experimental groups (Fig. 3).

4. DISCUSSION

Experimental STZ-induced diabetes is a widely used method for analysis of CNS dysfunctions, caused by impaired insulin signaling and hyperglycemia [3], [28]. STZ-diabetic rodents are hypoinsulinemic, but do not require insulin treatment to survive [28]. The consequent high blood glucose levels lead to marked polyuria, polydipsia, and weight loss. In the present study, all these features were observed in the diabetic rats, and treatment with resveratrol was unable to influence the blood glucose levels or body weight of the diabetic and non-diabetic rats, as previous studies have shown [14], [19], [21].

In spite of the endocrine and metabolic changes caused by STZ-induced diabetes, our experimental design demonstrated that diabetes did not affect the behavioral performance in the CFC task or hippocampal oxidative status in adult *Wistar* rats.

The CFC task is employed to evaluate fear/emotional learning and memory in rats, which are amygdala and hippocampus-dependent memory processes [29]. We observed no significant differences in memory measurements assessed approximately 9 weeks

after experimental diabetes induction. While studies suggest that learning and memory deficits are observed in diabetic rodents submitted to contextual fear and other hippocampal-dependent tasks [30]–[32], it is important to note that some studies, similarly to the present study, failed to replicate these behavioral findings [15], [16], [33]. These contrasting findings could be explained by differences in the experimental design used in each study, such as: the diabetic model selected (diabetes induction by STZ or other diabetogenic drugs, or by specific diet, or by the choice of transgenic rodent model); route of administration and dose of the diabetogenic drug; age at the time of diabetes induction; the length of time the animal has diabetes prior to the behavioral analysis; the memory task employed; protocol characteristics. Additionally, our main relevant results revealed that resveratrol oral treatment, at doses of 10 and 20 mg/kg, was able to improve memory in diabetic rats, but only when compared to the respective non-diabetic groups, treated with the same doses of resveratrol. These findings suggest that resveratrol exerts a positive influence on hippocampal plasticity, which is probably more pronounced in diabetic rodents than in healthy animals. To our knowledge, this is the first study to analyze the effects of the oral consumption of resveratrol in diabetic rats submitted to a CFC test. For a better understanding of our results, the development of more studies are necessary, focusing on the detailed circumstances in which resveratrol could produce beneficial effects in healthy and diabetic rodents submitted to CFC and other hippocampal-dependent tasks.

In line with our behavioral findings, the present study found that oxidative status in the hippocampus, as assessed by determination of the free radical content and SOD and GPx activities, was unaffected in rats approximately 9 weeks after STZ-induced diabetes. Our results are in contrast with experimental evidence that suggests hyperglycemia and deficient insulin signaling in the brain contribute to disruption in the balance between pro-oxidant and antioxidant cascades, thus promoting oxidative damage and impaired hippocampal plasticity [3], [9]. It is well known that, during hyperglycemia, glucose is diverted to metabolic pathways that may result in neurotoxicity. One of which is the polyol pathway, which compromises the glutathione cycle by consuming the proton donor NADPH, thus decreasing the capacity of the GPx enzyme to metabolize hydrogen peroxide (H_2O_2) to water (H_2O), and increasing the production of superhydroxyl radicals through the passage of H_2O_2 into the Fenton reaction. In addition, with the flow of glucose through the tricarboxylic acid cycle, superoxide is produced in the mitochondrial electron-transport chain and the SOD

enzyme catalyzes the dismutation of radical superoxide in H_2O_2 and H_2O [11]. On the other hand, there are some studies in accordance with our findings, which have failed to demonstrate alterations in oxidative stress markers and/or enzymatic antioxidant activity in the hippocampus of diabetic rats [14], [34], probably because hyperglycemia modulates these processes in a time and region-specific manner in the rat hippocampus [35]. These could be interesting topics for future investigations.

Furthermore, resveratrol oral consumption did not have any significant effect on the free radical content, SOD or GPx activities in the hippocampus of any of the experimental groups. Venturini et al. (2010) showed that oral daily treatment with resveratrol at a dose of 20 mg/kg during three weeks significantly decreased the lipid peroxidation in the hippocampus of STZ-induced diabetic rats [14]. However, similarly to the present study, they observed no significant differences in enzymatic antioxidant activity in the hippocampus of diabetic rats treated with resveratrol, in comparison with all the other experimental groups [14]. Resveratrol has well-known health promoting effects supported by several mechanisms, including modulation of cellular redox status in the CNS [18], [36]. The neuroprotective mechanisms initiated by resveratrol may be dependent on, and more pronounced after, significant disruptions in oxidative and inflammatory status of neural cells. This could explain the absence of resveratrol effects in the present study, since the hippocampal oxidative status was unaltered in our experimental groups. In order to provide more accurate information, we suggest the development of additional studies focusing on long-term investigations into the temporal pattern of STZ-induced diabetic disruption in memory and hippocampal oxidative status, and the effects of the daily intake of resveratrol on these parameters, in a time and dose-dependent manner.

CONCLUSIONS

STZ-induced diabetes during 9 weeks has no effects on aversive memory or oxidative status in the hippocampus of adult rats. Resveratrol oral consumption was unable to promote significant changes in these parameters, both in healthy and diabetic animals.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from *Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq)*, *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* and *Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)*. Pamela Brambilla Bagatini was supported by a Ph.D. scholarship from CAPES. André Arigony Souto, Ionara Rodrigues Siqueira, Léder Leal Xavier and Matilde Achaval are CNPq investigators.

REFERENCES

- [1] American Diabetes Association, "Diagnosis and classification of diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 35 Suppl 1, pp. S64–71, Jan. 2012.
- [2] C. Sims-Robinson, B. Kim, A. Rosko, and E. L. Feldman, "How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology?," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 6, no. 10, pp. 551–9, Oct. 2010.
- [3] L. P. Reagan, "Diabetes as a chronic metabolic stressor: causes, consequences and clinical complications," *Exp. Neurol.*, vol. 233, no. 1, pp. 68–78, 2012.
- [4] A. M. A. Brands, G. J. Biessels, E. H. F. de Haan, L. J. Kappelle, and R. P. C. Kessels, "The Effects of Type 1 Diabetes on Cognitive Performance," *Diabetes Care*, vol. 28, no. December 2004, pp. 726–735, 2005.
- [5] R. J. McCrimmon, C. M. Ryan, and B. M. Frier, "Diabetes and cognitive dysfunction," *Lancet*, vol. 379, no. 9833, pp. 2291–2299, 2012.
- [6] DCCT/EDIC Study Research Group, "Long-Term Effect of Diabetes and Its Treatment on Cognitive Function," *N. Engl. J. Med.*, vol. 356, pp. 1842–1852, 2007.
- [7] G. J. Biessels, I. J. Deary, and C. M. Ryan, "Cognition and diabetes : a lifespan perspective," *Lancet. Neurol.*, vol. 7, no. February, pp. 184–190, 2008.
- [8] A. A. F. Sima, "Encephalopathies: the emerging diabetic complications.," *Acta Diabetol.*, vol. 47, no. 4, pp. 279–93, Dec. 2010.
- [9] S. A. Wrighten, G. G. Piroli, C. A. Grillo, and L. P. Reagan, "A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1792, no. 5, pp. 444–53, May 2009.
- [10] E. Blázquez, E. Velázquez, and V. Hurtado-cameiro, "Insulin in the brain : its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance , type 2 diabetes and alzheimer ' s disease," *Front. Endocrinol. (Lausanne).*, vol. 5, no. October, pp. 1–21, 2014.
- [11] D. R. Tomlinson and N. J. Gardiner, "Glucose neurotoxicity.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 9, pp. 36–45, Jan. 2008.
- [12] P. C. Chikezie, O. A. Ojiako, and A. C. Ogbuji, "Oxidative Stress in Diabetes Mellitus," *Int. J. Biol. Chem.*, vol. 9, pp. 92–109, 2015.

- [13] L. P. Reagan, C. A. Grillo, and G. G. Piroli, "The As and Ds of stress : Metabolic , morphological and behavioral consequences," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 585, pp. 64–75, 2008.
- [14] C. D. Venturini, S. Merlo, A. A. Souto, M. D. C. Fernandes, R. Gomez, and C. R. Rhoden, "Resveratrol and Red Wine Function as Antioxidants in the Nervous System without Cellular Proliferative Effects during Experimental Diabetes," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 3, no. 6, pp. 434–441, 2010.
- [15] E. C. Mcnay and R. S. Sherwin, "Effect of Recurrent Hypoglycemia on Spatial Cognition and Cognitive Metabolism in Normal and Diabetic Rats," *Diabetes*, vol. 53, no. February, pp. 418–425, 2004.
- [16] A. Bélanger, N. Lavoie, F. Trudeau, G. Massicotte, and G. Sylvain, "Preserved LTP and water maze learning in hyperglycaemic – hyperinsulinemic ZDF rats," *Physiol. Behav.*, vol. 83, pp. 483–494, 2004.
- [17] K. B. Harikumar and B. B. Aggarwal, "Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases," *Cell Cycle*, vol. 7, no. April, pp. 1020–1035, 2008.
- [18] S. Bastianetto, C. Ménard, and R. Quirion, "Neuroprotective action of resveratrol," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1852, no. 6, pp. 1195–1201, 2015.
- [19] R. Schmatz, C. M. Mazzanti, R. Spanevello, N. Stefanello, J. Gutierrez, M. Corrêa, M. M. da Rosa, M. a Rubin, M. R. Chitolina Schetinger, and V. M. Morsch, "Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 610, no. 1–3, pp. 42–8, May 2009.
- [20] E. Park and J. M. Pezzuto, "Biochimica et Biophysica Acta The pharmacology of resveratrol in animals and humans ☆," *BBA - Mol. Basis Dis.*, vol. 1852, no. 6, pp. 1071–1113, 2015.
- [21] P. B. Bagatini, L. L. Xavier, L. Neves, L. Saur, S. Barbosa, P. P. A. Baptista, O. A. Augustin, P. Nunes de Senna, R. G. Mestriner, A. A. Souto, and M. Achaval, "Resveratrol prevents akinesia and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats.," *Brain Res.*, vol. 1592, pp. 101–12, Dec. 2014.
- [22] B. P. Genro, L. D. O. Alvares, and J. A. Quillfeldt, "Role of TRPV1 in consolidation of fear memories depends on the averseness of the conditioning procedure," *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 97, no. 4, pp. 355–360, 2012.
- [23] C. LeBel, H. Ischiropoulos, and S. Bondy, "Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 5, pp. 227–231, 1992.
- [24] S. Moysés, K. Bertoldi, C. Spindler, E. Farias, V. Rostirola, M. Antonio, S. Rodrigues, and I. Rodrigues, "Physiology & Behavior Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats," *Physiol. Behav.*, vol. 129, pp. 160–166, 2014.
- [25] K. Bertoldi, C. Spindler, S. Moysé, G. A. Lovatel, V. R. Elsner, M. Antˆ, and I. Rodrigues, "Effect of landfill leachate on oxidative stress of brain structures and

- liver from rodents: modulation by photoelectrooxidation process," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 84, pp. 319–324, 2012.
- [26] A. Wendel, "Glutathione peroxidase," *Methods Enzymol.*, vol. 77, pp. 325–333, 1981.
- [27] M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding," *Anal. Biochem.*, vol. 254, pp. 248–254, 1976.
- [28] G. J. Biessels, "Sweet memories: 20 years of progress in research on cognitive functioning in diabetes," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 719, no. 1–3, pp. 153–60, Nov. 2013.
- [29] I. B. Zovkic and J. D. Sweatt, "Epigenetic Mechanisms in Learned Fear : Implications for PTSD," *Neuropsychopharmacology*, vol. 38, no. 1, pp. 77–93, 2013.
- [30] C. Wang, Z. Cai, Z. You, H.-S. Guo, D.-J. Shang, X.-L. Wang, L. Zhang, L.-J. Ma, J. Ta, W.-D. Le, and S. Li, "Free Radical Scavenging Activity and Neuroprotective Potentials of D138 , One Cu (II) / Zn (II) Schiff-Base Complex Derived propanediamine," *Neurochem. Res.*, vol. 39, pp. 1834–1844, 2014.
- [31] N. Calgaroto, G. Thomé, P. da Costa, J. Baldisseri, F. Hussein, R. Schmatz, N. Rubin, and C. Signor, "Effect of vitamin D3 on behavioural and biochemical parameters in diabetes type 1-induced rats.," *Cell Biochem. Funct.*, vol. 32, pp. 502–510, 2014.
- [32] H. Kalalian-Moghaddam, T. Baluchnejadmojarad, and M. Roghani, "Hippocampal synaptic plasticity restoration and anti-apoptotic effect underlie berberine improvement of learning and memory in streptozotocin-diabetic rats," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 698, no. 1–3, pp. 259–266, 2013.
- [33] E. Hayashi-Park, B. N. Ozment, C. M. Griffith, H. Zhang, P. R. Patrylo, and G. M. Rose, "Experimentally induced diabetes worsens neuropathology, but not learning and memory, in middle aged 3xTg mice," *Behav. Brain Res.*, 2016.
- [34] S. Cardoso, M. S. Santos, R. Seiça, and P. I. Moreira, "Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and / or insulin-induced hypoglycemia," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1802, no. 11, pp. 942–951, 2010.
- [35] C. A. Grillo, G. G. Piroli, and D. R. Rosell, "Region specific increases in oxidative stress and superoxide dismutase in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress," *Neuroscience*, vol. 121, pp. 133–140, 2003.
- [36] M. G. Novelle, D. Wahl, C. Diéguez, M. Bernier, and R. De Cabo, "Resveratrol supplementation : Where are we now and where should we go ?," *Ageing Res. Rev.*, vol. 21, pp. 1–15, 2015.

LEGENDS

Fig. 1 - Timeline of the experimental design. D = day, CFC = contextual fear conditioning.

Fig. 2 - Percentage (%) of freezing behavior measured in the test session. ** corresponds to $p < 0.01$ compared to the ND RSV 10, and * corresponds to $p < 0.05$ compared to the ND RSV 20.

Fig. 3 - Measurement of free radical content using DCFH-DA as a probe (a), and enzymatic antioxidant activity of SOD (b) and GPx (c) in the hippocampi of rats from all experimental groups.

Fig. 1

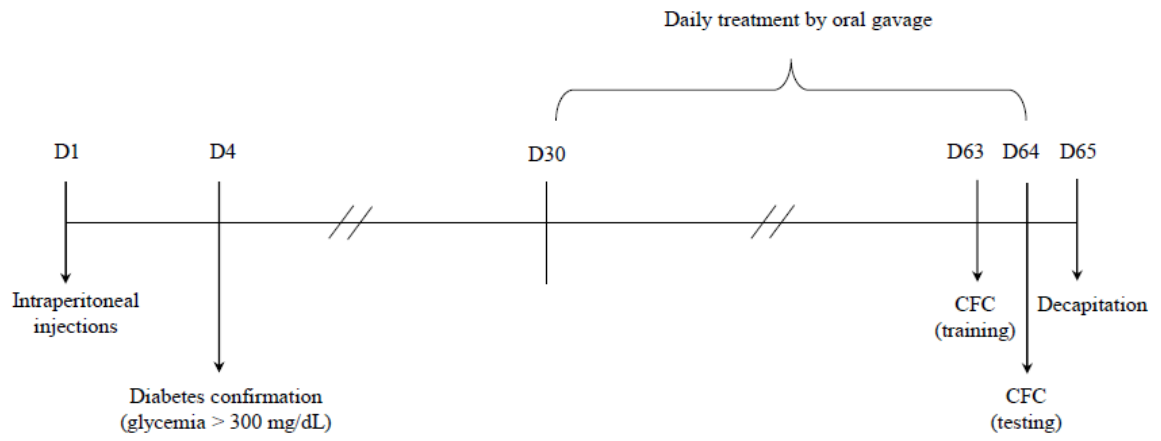


Fig. 2

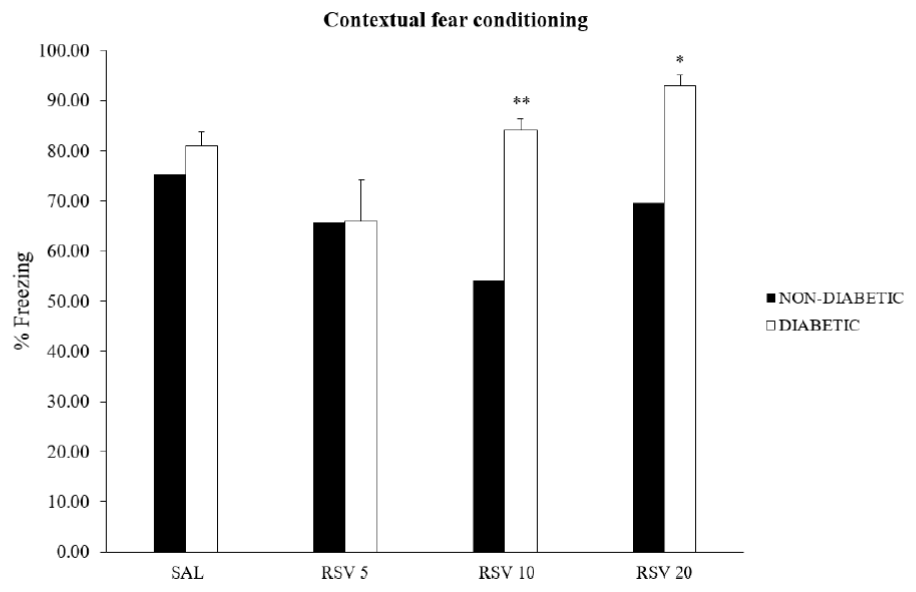
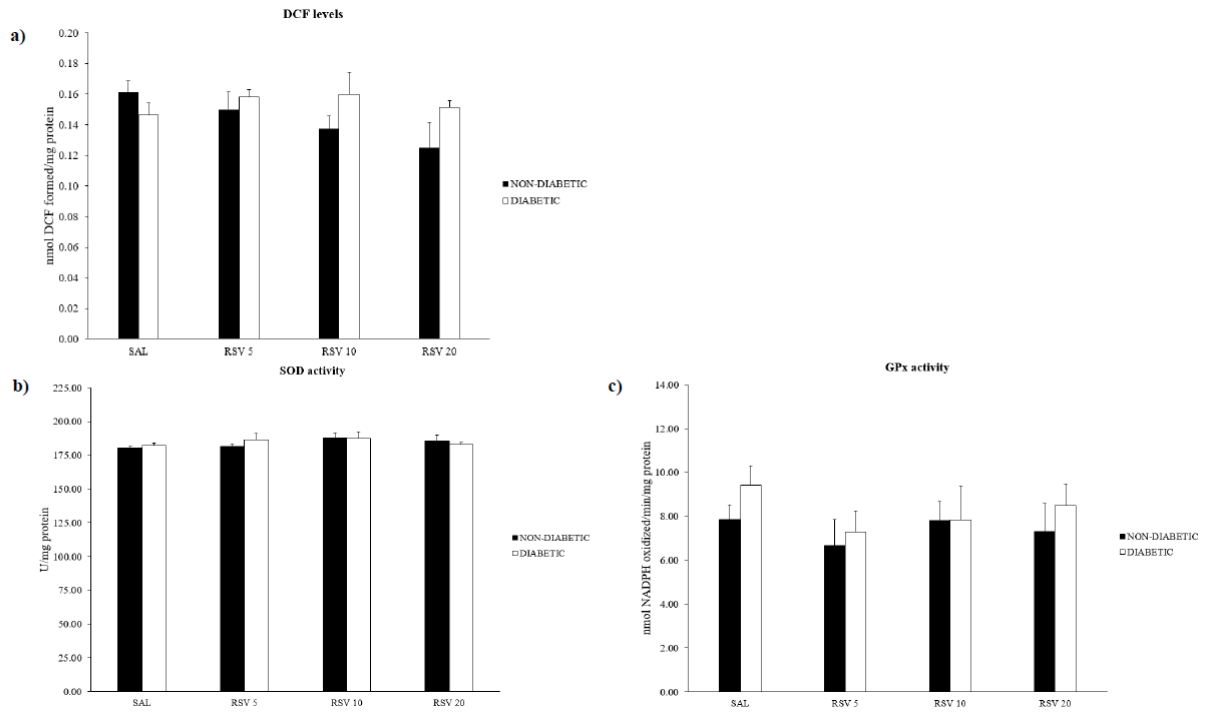


Figure 3



Table

Table 1 - Body weight and blood glucose levels.								
Groups	D1		D4		D30		D64	
	Weight (g)	Glycemia (mg/dL)	Weight (g)	Glycemia (mg/dL)	Weight (g)	Glycemia (mg/dL)	Weight (g)	Glycemia (mg/dL)
ND SAL	366.00±9.76	91.62±5.27	383.25±11.92	86.00±5.54	409.25±13.95	86.25±2.89	455.25±34.66	85.63±2.59
ND RSV 5	382.00±13.05	87.25±4.66	396.75±12.84	91.88±3.47	433.25±16.57	88.25±2.43	471.75±15.95	80.75±3.00
NDM RSV 10	372.75±7.93	87.37±3.16	393.75±8.82	92.63±3.54	426.50±13.49	85.75±3.49	471.75±14.17	89.63±5.82
ND RSV 20	388.00±4.93	88.75±2.70	403.00±7.75	92.13±2.93	418.00±14.88	88.50±4.22	475.00±10.71	89.25±4.72
D SAL	369.14±7.96	81.00±3.18	329.71±11.80***	367.29±14.13***	301.71±13.45***	469.71±25.40***	294.28±11.77***	434.14±20.48***
D RSV 5	393.75±9.18	82.25±3.04	345.75±9.91***	351.13±23.52***	317.25±9.43***	498.13±26.79***	311.50±16.43***	513.88±27.12***
D RSV 10	372.50±9.16	87.88±3.18	337.75±9.51***	360.63±18.07***	310.50±9.71***	458.13±32.15***	297.25±12.23***	517.13±22.07***
D RSV 20	375.71±11.04	82.29±3.27	329.14±12.43***	332.71±8.13***	300.57±12.86***	428.29±28.76***	288.85±15.39***	474.00±15.71***

ND SAL: non-diabetic rats treated with saline, ND RSV 5: non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 5 mg/kg, ND RSV 10: non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 10 mg/kg, ND RSV 20: non-diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 20 mg/kg, D SAL: diabetic rats treated with saline, D RSV 5: diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 5 mg/kg, D RSV 10: diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 10 mg/kg, D RSV 20: diabetic rats treated with resveratrol at a dose of 20 mg/kg. D1: day 1, D4: day 4, D30: day 30, D64: day 64.
 *** corresponds to p<0.001 compared to ND SAL, ND RSV 5, ND RSV 10 and ND RSV 20 groups.

4. DISCUSSÃO

Os principais achados da presente tese indicam que o resveratrol é capaz de atuar benéficamente sobre disfunções nigroestriatais causadas pelo DM semelhante ao tipo 1 induzido por STZ, revertendo a acinesia e atenuando o aumento da densidade glial e a diminuição do conteúdo celular de TH na SNPC. Em contrapartida, o modelo de DM experimental empregado neste trabalho não alterou de forma significativa a memória aversiva e o estado oxidativo hipocampal, sugerindo que determinados núcleos encefálicos possivelmente apresentam maior suscetibilidade aos mecanismos neurotóxicos desencadeados pelo estado diabético.

É notável a necessidade de avaliação dos efeitos do DM sobre o SNC, bem como possíveis alternativas terapêuticas - incluindo o tratamento com resveratrol - visto que, com o crescimento da expectativa de vida da população, aproximadamente 47% dos indivíduos acima dos 60 anos apresentam algum distúrbio metabólico, aumentando essa prevalência para mais de 50% após os 65 anos; isso significa que, em um futuro próximo, haverá um aumento significativo na prevalência de obesidade, doenças cardiovasculares e DM na população global (Kalyani et al., 2014; Sepúlveda & Murray, 2014; Aguilar et al., 2015; Hinnouho et al., 2015).

4.1 Implicações metodológicas

A hiperglicemia desencadeada pelos déficits na produção e/ou ação da insulina nos tecidos induz as principais características fisiológicas do DM: a poliúria, a polifagia, a polidipsia e a perda de peso (Funk, 2007; American Diabetes Association, 2012). No presente trabalho, essas características clássicas do DM foram observadas após a administração de STZ via intraperitoneal, indicando a eficiência do protocolo de mimetização do DM em ratos, como aceito há décadas na literatura (Biessels et al., 1994, 1998; Gispen & Biessels, 2000). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, com o mesmo modelo de DM experimental, utilizaram doses menores de STZ, administradas por via intravenosa (de Senna et al., 2011, 2015; do Nascimento et al., 2011). Nesta tese, o modelo experimental de DM via injeção intraperitoneal de STZ foi induzido com base em protocolos previamente publicados (Malone et al., 2006; Ates et al., 2007; Alvarez et al., 2009; Schmatz et al., 2009^{a,b}; Yi et al., 2011) e o sucesso da indução do DM experimental no presente estudo foi semelhante aos obtidos nos trabalhos que relataram a utilização da via

de administração intravenosa (de Senna et al., 2011, 2015; do Nascimento et al., 2011; Jing et al., 2013). Um ponto importante a ser ressaltado é que o DM induzido no protocolo experimental deste trabalho é frequentemente descrito como modelo de DMT1, uma vez que a administração sistêmica de STZ causa primariamente uma destruição significativa das células β -pancreáticas e a diminuição da produção de insulina pelo pâncreas, não causando uma hiporesponsividade dos receptores de insulina (Radenković et al., 2016). Contudo, não se trata de uma ablação insulínica total, que tornaria o animal insulino-dependente, uma característica comum do DMT1. Deste modo, alguns pesquisadores optam por classificar o modelo experimental como DMT1 induzido por STZ ou, simplesmente, como DM induzido por STZ (Gispén & Biessels, 2000; Biessels, 2013).

Em relação ao peso e glicemia dos animais, ambos estudos apresentados nesta tese demonstraram que o protocolo de indução do DM por STZ foi capaz de diminuir o peso corporal e de promover hiperglicemia, e que a administração de resveratrol via oral não foi capaz de reverter ou atenuar essas mudanças metabólicas. Esses resultados corroboram com os achados de estudos prévios, que utilizaram protocolos experimentais similares (Ates et al., 2007; Schmatz et al., 2009^{a,b}; Venturini et al., 2010).

O DM está associado a atrofia cortical, lesões na substância branca e desenvolvimento de disfunções cognitivas e motoras (Sims-Robinson et al., 2010; McCrimmon et al., 2012). Entretanto, estudos clínicos ainda são controversos em relação às deficiências de aprendizado e memória, visto que alguns trabalhos relataram que pacientes com DMT1 raramente apresentam déficits nesses domínios cognitivos, diferente dos pacientes com DMT2 (McCrimmon et al., 2012; Koekkoek et al., 2015). Desta forma, a presença de co-morbidades associadas ao DMT2, como HAS, obesidade e doenças cerebrovasculares, são importantes para o desenvolvimento de disfunções na plasticidade neural, as quais podem causar atrofia no hipocampo e levar ao declínio cognitivo (Brands et al., 2005; DCCT/EDIC Study Research Group, 2007; Kamiyama et al., 2010; McCrimmon et al., 2012; Koekkoek et al., 2015). Além disso, há trabalhos prévios que demonstraram uma correlação entre doenças metabólicas, incluindo o DM, e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a DP, um dos focos principais deste trabalho (Anthony et al., 2006; Whitmer et al., 2008; Ahiluoto et al., 2010).

A DP ou paralisia agitante, inicialmente descrita por James Parkinson em 1817 em seu trabalho “*An Essay on the Shaking Palsy*”, apresenta as seguintes características patofisiológicas: perda de neurônios dopaminérgicos na SNPC; perda de neurônios em regiões extra-nigrais, como a área tegmental ventral, o campo retrorubral, os núcleos motores

dorsais do IX e X pares cranianos, subnúcleos da formação reticular, núcleos da rafe, complexo cerúleo-subcerúleo, núcleo magnocelular do prosencéfalo, subnúcleos talâmicos, complexo amigdalóide e, com a progressão da doença, perda de neurônios do córtex cerebral; perda de inervação simpática do miocárdio (cerca de 35% dos pacientes com DP apresentam algum grau de desnervação simpática cardíaca); presença de aglomerados de alfa-sinucleína no soma (corpos de Lewy) e nos prolongamentos (neuritos de Lewy) de neurônios secretores de peptídeo intestinal vasoativo (neurônios VIPérgicos) nos plexos submucoso de Meissner e mioentérico de Auerbach, bem como perda de neurônios dopaminérgicos e VIPérgicos presentes nessas regiões (Jellinger, 1991; Edwards et al., 1992; Braak et al., 1994; Singaram et al., 1995; Braak & Braak, 2000; Del Tredici et al., 2002; Orimo, 2002; Braak et al., 2006; Ziemssen & Reichmann, 2007; Ziemssen, 2010; Kalia & Lang, 2015).

De fato, estudos clínicos apontam que a SNPC não é o sítio de indução da neurodegeneração na DP, visto que, no estágio inicial da doença, foi evidenciada a presença de corpos e neuritos de Lewy na porção inferior do tronco encefálico (núcleos motores dorsais do IX e X pares cranianos), no núcleo olfatório anterior, no bulbo olfatório, e no sistema nervoso entérico, em neurônios dos plexos de Meissner e de Auerbach (Wakabayashi et al., 1988; Braak et al., 2003; Ziemssen, 2010). Ainda não foi possível estabelecer qual o foco primário da agregação de alfa-sinucleína na DP, entretanto, estudos indicam que a formação de corpos e neuritos de Lewy progride em um curso ascendente, partindo do sistema nervoso entérico até o núcleo motor dorsal do X par craniano, onde posteriormente alcançam núcleos da porção superior do tronco encefálico e, em estágios mais avançados, atingem o córtex cerebral (Braak et al., 2003, 2006; Brettschneider et al., 2015).

Os mecanismos patofisiológicos da DP levam ao aparecimento de uma série de sinais e sintomas da doença, que incluem: tremor de repouso; movimento de contar dinheiro; acinesia; bradicinesia; alteração da marcha; alteração de tônus muscular e postura ereta; suscetibilidade a quedas; diminuição da expressão facial emocional, chegando a faces amílicas; sinais clínicos de degeneração da circuitaria do tronco encefálico, incluindo o sinal de Myerson (ausência de acomodação após evocação contínua do reflexo glabellar, que tem como vias aferentes e eferentes o nervo facial) e sialorréia (aumento do débito salivar); constipação; bradicardia, hipotensão ortostática e até insuficiência cardíaca de baixo débito nos estágios mais avançados da doença; disfunção erétil; disfunção urinária; disfunções cognitivas; apatia, ansiedade e depressão (Angel et al., 1970; Edwards et al., 1992; Singaram

et al., 1995; Orimo, 2002; Braak et al., 2006; Yogev et al., 2007; Ziemssen & Reichmann, 2007; Ziemssen, 2010; Rahman et al., 2011; Cilia et al., 2015).

Muitas das características da DP em humanos não são passíveis de serem reproduzidas integralmente em modelos animais, uma vez que os modelos da DP em roedores são, em sua maioria, restritos a lesões na via nigroestriatal, não sendo sucedidas por neurodegeneração em outras regiões - como o córtex cerebral - ao contrário do que ocorre em seres humanos, nos estágios mais avançados da doença (Braak et al., 2003). Contudo, algumas características podem ser facilmente observadas e avaliadas em diferentes modelos animais, incluindo-se roedores. Nesse sentido, o protocolo para indução de DM experimental empregado nesta tese levou ao desenvolvimento não só das características clássicas relacionadas à hiperglicemia, mas também foi capaz de induzir duas deficiências locomotoras características da DP: a acinesia, demonstrada pela latência aumentada para remoção de ambas as patas no teste da barra horizontal, e a bradicinesia, caracterizada pela redução da distância percorrida e redução da velocidade média no teste do campo aberto.

Embora os termos “acinesia” e “bradicinesia” sejam descritos de forma equivalente em alguns estudos, nesta tese eles foram utilizados para se referir à dificuldade (ou atraso) para iniciar movimentos voluntários e à lentidão dos movimentos voluntários, respectivamente, com base na literatura e pelo fato de que esses sintomas clínicos podem não apresentar completa correlação em pacientes parkinsonianos (Everts et al., 1981; Fahn, 2003; Mazzoni et al., 2012).

Estudos prévios, que também avaliaram roedores no teste do campo aberto, apresentaram resultados similares aos achados do presente trabalho, em relação à bradicinesia (Grzeda et al., 2007; de Senna et al., 2011; do Nascimento et al., 2011; Haider et al., 2013). Em camundongos *knockout* para o receptor de insulina (linhagem NIRKO), demonstrou-se que esses animais apresentaram uma diminuição da atividade exploratória e um aumento na latência para o começo da atividade no teste do campo aberto, além de comportamento depressivo e aumento da ansiedade (Kleinridders et al., 2015). Este estudo também observou alterações na função mitocondrial, estresse oxidativo e aumento na atividade de enzimas que degradam a dopamina, como a monoamina oxidase (MAO) A e B, causando um aumento do *turnover* de dopamina no sistema mesolímbico e, conseqüentemente, uma diminuição da sinalização dopaminérgica (Kleinridders et al., 2015). O aumento da atividade da MAO parece ser um dos componentes neuroquímicos do comportamento depressivo e da redução do comportamento exploratório, visto que esses

comportamentos foram revertidos com o uso de inibidores da MAO (Kleinridders et al., 2015).

Há, no entanto, que levar em consideração como modelo animal, que ratos e camundongos apresentam distintas histórias evolutivas e diferenças anatômicas e fisiológicas, o que pode dificultar a comparação entre comportamentos dessas duas espécies (Branchi & Ricceri, 2004). Ademais, a ausência de receptores de insulina nos camundongos NIRKO gera um modelo que mimetiza a resistência à insulina presente no DMT2, enquanto que o emprego da STZ determina um modelo experimental com fisiopatologia semelhante a do DMT1, embora tenha que se ter cuidado na comparação com um modelo que não expressa genes dos receptores de insulina em nenhuma fase da vida (Kleinridders et al., 2015). De fato, em um modelo ocorre diminuição significativa na síntese de insulina gerada por uma droga diabetogênica administrada em idade adulta (Bagatini et al., 2014), e os camundongos NIRKO possivelmente apresentam déficits comportamentais desde o início do desenvolvimento, assim como estratégias fisiológicas de compensação.

Mesmo com atenção às limitações de comparação do presente estudo com o estudo realizado em camundongos transgênicos da linhagem NIRKO, o trabalho de Kleinridders et al. (2015) é interessante pois traz informações sobre a patofisiologia celular do DM. Desta forma, sugere-se que a ausência dos receptores de insulina diminui a função mitocondrial de duas maneiras: diminuindo a expressão de proteínas ligadas à cadeia de transporte de elétrons, e alterando a morfologia mitocondrial do tecido nervoso, gerando mitocôndrias menores. É plausível que a diminuição da atividade da insulina no DM experimental seja capaz de alterar a expressão do RNA mensageiro da mitofusina 2 no hipotálamo, uma enzima chave na fusão mitocondrial, alterando assim a morfologia da referida organela (Schneeberger et al., 2013).

É possível que o comportamento bradicinético evidenciado nos animais diabéticos deste trabalho esteja relacionado ao aumento na atividade da MAO, diminuição na produção de ATP e alterações mitocondriais. Além disso, é provável que essas mudanças não sejam revertidas com o tratamento com resveratrol. Esse polifenol, apesar de apresentar atividades protetoras contra o estresse oxidativo, tem a capacidade de reduzir a geração de ERO associada à inibição do complexo III da cadeia de transporte de elétrons por competição com a coenzima Q (ubiquinona), reduzindo ainda mais a produção de ATP (Zini et al., 1999; Harikumar & Aggarwal, 2008; Bastianetto et al., 2015; Park & Pezzuto, 2015).

A hipótese de que o tratamento com resveratrol causa uma redução adicional na formação de ATP auxilia na explicação relacionada a sua ineficiência para a recuperação da

bradicinesia, apresentada no primeiro artigo desta tese. Além das mudanças dopaminérgicas, outros fatores relevantes para o desenvolvimento de bradicinesia são a neuropatia periférica e a perda de massa muscular causadas pelo DM, as quais não foram avaliadas neste trabalho, mas que possivelmente contribuem para o comportamento bradicinético dos animais diabéticos (Zangiabadi et al., 2011; Andersen, 2012; Kalyani et al., 2014).

Em relação à acinesia evidenciada nos ratos com DM, é provável que ela esteja associada principalmente à redução do conteúdo dopaminérgico da SNPC, uma vez que essa disfunção locomotora não foi observada nos animais diabéticos tratados com resveratrol, os quais, inclusive, apresentaram reversão da depleção dopaminérgica.

Com isso, estudos futuros que avaliem os efeitos do DM induzido por STZ e do tratamento com resveratrol sobre as atividades da MAO, assim como a realização de avaliações semi-quantitativas da atividade mitocondrial (por exemplo, uso de marcador histoquímico da fosforilação oxidativa, como a enzima citocromo c oxidase, analisada por densitometria óptica regional, ou uma análise ultra-estrutural, também quantitativa, das mitocôndrias encefálicas por microscopia eletrônica de transmissão), associada a uma avaliação da densidade de superfície e à análise morfológica da inervação periférica e de massa muscular em ratos, possivelmente irão aprimorar o conhecimento relativo a essa temática (Howard & Reed, 1998; Partata et al., 1999; Xavier et al., 2005; Inuwa et al., 2009; Saueressig et al., 2012).

Outro aspecto comportamental observado no segundo artigo desta tese foi que os animais diabéticos submetidos à tarefa do CAC não apresentaram alterações significativas no tempo de *freezing* - resposta condicionada, caracterizada por imobilidade generalizada causada por uma resposta tônica da musculatura esquelética dos animais, exceto da musculatura utilizada na respiração (Izquierdo et al., 2016) - em relação aos ratos não-diabéticos. Esse resultado indica que o protocolo de indução do DM semelhante ao tipo 1 e o desenho experimental desenvolvido no estudo não promoveram alterações significativas neste tipo de memória em ratos diabéticos.

Assim como descrito previamente em estudos clínicos, também existem controvérsias em relação aos efeitos do DM experimental sobre o aprendizado e a memória em roedores. Alguns estudos demonstraram que o DM experimental induzido por STZ pode prejudicar o desempenho de ratos em tarefas de memória dependentes do hipocampo, incluindo tarefas que envolvem condicionamento aversivo, como o CAC (Calgaroto et al., 2014) e a esQUIVA INIBITÓRIA (Schmatz et al., 2009^a), e em tarefas que avaliam memória espacial, como o teste de reconhecimento do objeto reposicionado (de Senna et al., 2011;

Piazza et al., 2011), e memória não-espacial, como a tarefa de reconhecimento do objeto novo (de Senna et al., 2015). Por outro lado, há artigos que não evidenciaram déficits de memória espacial em roedores com DM experimental avaliados na tarefa do labirinto aquático de Morris e no labirinto de quatro braços (Bélanger et al., 2004; Mcnay & Sherwin, 2004).

Em camundongos geneticamente modificados da linhagem 3xTg com 12 meses de idade, considerado modelo da doença de Alzheimer, a indução do DM com STZ foi capaz de agravar aspectos neuropatológicos da doença, aumentando a densidade de placas amiloides no *subiculum* (Hayashi-Park et al., 2016). Entretanto, o DM semelhante ao tipo 1 não foi capaz de promover prejuízos de aprendizagem e memória nesses animais - inclusive na tarefa do CAC - de forma semelhante aos achados do presente estudo (Hayashi-Park et al., 2016). Considerando-se que a memória com base na aprendizagem motivada pelo medo no CAC é dependente do hipocampo (Izquierdo et al., 2016), seria plausível que fossem evidenciados prejuízos de memória nos animais diabéticos deste trabalho, uma vez que o DM é capaz de causar disfunções na plasticidade neural no hipocampo, como redução do número de espinhos dendríticos, diminuição da neurogênese, diminuição da sinalização via receptores de insulina, diminuição da LTP, aumento da LTD, diminuição da liberação de serotonina por estresse, diminuição da recaptção de noradrenalina, e déficits de aprendizagem e memória (Li et al., 2002; Alvarez et al., 2009; Wrihten et al., 2009; Sima, 2010; Reagan, 2012).

Os resultados obtidos no estudo de Calgaroto et al. (2014) demonstraram prejuízos na memória de ratos avaliados na tarefa do CAC 30 dias após a indução do DM com STZ (Calgaroto et al., 2014). Não há explicação evidente para as discrepâncias dos resultados obtidos neste trabalho com os obtidos no estudo de Calgaroto et al. (2014), ou a incongruência dos achados comportamentais desta tese com as mudanças na plasticidade neural causadas pelo DMT1 e DMT2 (Reagan, 2012). Diferenças nos modelos experimentais de DM (uso de animais transgênicos ou indução química do DM), dietas específicas, linhagens distintas de roedores e desenhos experimentais - incluindo idade dos animais no momento da indução do DM e o período das análises comportamentais após a indução - podem ser causas aceitáveis para as diferenças encontradas. Deste modo, sugere-se o desenvolvimento de estudos que minimizem essas variabilidades experimentais, para que possam fornecer informações importantes para a compreensão dessas questões.

Com base nos dados do segundo artigo, o resveratrol nas doses de 10 e 20 mg/kg foi capaz de exacerbar a resposta condicionada na tarefa do CAC em animais diabéticos, quando

comparados aos animais não-diabéticos tratados com as mesmas doses de resveratrol. Também não há explicação óbvia para entender o aumento da resposta condicionada dos animais diabéticos em relação aos animais não-diabéticos, mas os resultados indicam que o resveratrol promoveu mudanças comportamentais dependentes da dose administrada. Esse efeito é claramente observado em parâmetros morfológicos e neuroquímicos, em células neuronais e gliais (Zhang et al., 2012).

Ainda no segundo artigo desta tese, foi observado que o estado oxidativo no hipocampo, avaliado pelo conteúdo total de radicais livres e atividades das enzimas antioxidantes SOD e GPx, não sofreu alterações significativas nos ratos diabéticos quando comparados aos animais não-diabéticos. Esses resultados concordam com a ausência de prejuízos de memória nos grupos experimentais avaliados. Todavia, esses achados não estão de acordo com outros trabalhos onde a hiperglicemia e deficiências na atividade da insulina no encéfalo alteram o balanço entre vias pró e antioxidantes, resultando em estresse oxidativo, dano celular e prejuízos na plasticidade hipocampal (Magarinos & McEwen, 2000; Gold et al., 2007; Wrihten et al., 2009; Jing et al., 2013). Todavia, estudos prévios consonantes com os nossos não evidenciaram alterações nos marcadores de estresse oxidativo e/ou na atividade de enzimas antioxidantes no hipocampo de ratos com DM induzido por STZ (Cardoso et al., 2010; Venturini et al., 2010). É possível que a deficiência de insulina e a hiperglicemia modulem a atividade dependendo do tempo e da região estudada, e isso pode ser a principal causa dos resultados discrepantes na literatura (Grillo et al., 2003). Estudos com análises em tempos distintos após a indução do DM experimental, bem como meta-análises com protocolos similares, podem trazer informações importantes para o esclarecimento desses dados divergentes.

A partir do primeiro artigo desta tese, foi evidenciado o aumento da densidade glial na SNPC de ratos diabéticos, sendo este aumento revertido ou prevenido pelo resveratrol. A técnica de Nissl não permite a diferenciação apropriada dos distintos tipos de células gliais do SNC; contudo, achados recentes indicam que esse resultado revela um aumento da população microglial, como descrito na SNPC de camundongos das linhagens ob/ob e db/db utilizados classicamente como modelos experimentais de DMT2 (Wang et al., 2014). É pouco provável que o aumento do número de células gliais esteja associado ao aumento na densidade de oligodendrócitos, uma vez que a perda da atividade da insulina no encéfalo conduz à degeneração oligodendroglial (Wrihten et al., 2009; Sima, 2010; Blázquez et al., 2014). Ademais, o DM parece não alterar a densidade de astrócitos positivos para proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no hipocampo (dados não publicados).

A redução da população glial promovida pelo resveratrol nos ratos diabéticos indica a possível atuação antioxidante e anti-inflamatória do resveratrol, o qual inibe vias de sinalização pró-apoptóticas e pró-inflamatórias (incluindo a inibição do NF- κ B), atenuando a reatividade microglial (Roriz-Filho et al., 2009; Bastianetto et al., 2015).

O uso de técnicas imunoistoquímicas para detecção de GFAP, microglia e oligodendrócitos, assim como análises por microtomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada (micro PET-CT) com uso de isoquinolina marcada com carbono 11, a 11C-(R)-PK11195 (um ligante seletivo para os sítios de ligação dos benzodiazepínicos periféricos, que funciona como traçador de microglia reativa) na SNPC de ratos diabéticos e não-diabéticos, submetidos ou não ao tratamento via oral com resveratrol, pode gerar resultados interessantes para a elucidação das questões relacionadas às alterações na densidade glial (Banati, 2002; Debruyne et al., 2003; de Senna et al., 2011).

Com o uso de técnica imunoistoquímica para TH associada à análise semi-quantitativa por densitometria óptica, demonstramos uma redução na imunorreatividade celular para TH na SNPC, a qual foi revertida pelo tratamento com resveratrol. Os resultados do presente trabalho confirmam e detalham resultados prévios, obtidos em um estudo onde os animais diabéticos apresentaram redução da imunorreatividade regional para TH na SNPC (do Nascimento et al., 2011). A ideia de que a diminuição da atividade da insulina está associada à perda da atividade dopaminérgica na DP é corroborada pelo fato de que, em exames *post-mortem*, os encéfalos de pacientes com DP apresentaram ausência de imunorreatividade para receptores de insulina em áreas encefálicas atingidas pela doença como SNPC, núcleo paranigral, núcleo cuneiforme, subnúcleo cuneiforme e lemnisco medial (Moroo et al., 1994).

A possível reatividade microglial presente na SNPC dos animais diabéticos deste estudo provavelmente está associada à inflamação e estresse oxidativo. Com isso, devem contribuir para a diminuição do conteúdo de TH nos neurônios nigrais, uma vez que a presença de microglia com fenótipo reativo é descrita na literatura, tanto em pacientes com DP como em modelos experimentais da DP (Hirsch & Hunot, 2009; Halliday & Stevens, 2011).

A reatividade microglial, seguida da redução da imunorreatividade neuronal para TH e, conseqüentemente, a redução de dopamina nos neurônios da SNPC dos ratos diabéticos deste estudo, indicam o começo de um processo neurodegenerativo que também é observado em estágios iniciais da DP (Dauer & Przedborski, 2003; Halliday & Stevens, 2011; Xu et al., 2011).

Em relação aos efeitos benéficos do resveratrol na restauração da imunorreatividade celular para TH na SNPC, estes podem envolver diferentes mecanismos. Em cultura de neurônios dopaminérgicos, foi demonstrado que o resveratrol é capaz de aumentar a produção do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), de modo dose e tempo-dependente, apresentando uma curva com início do aumento da produção de BDNF e GDNF em 24 horas de tratamento com resveratrol, com pico de efeito em 36 horas, e uma redução deste em 96 horas, mas com efeito ainda significativo quando comparado ao tempo zero (Zhang et al., 2012). Entretanto, o estudo de Zhang et al. (2012) não apresenta os efeitos do tratamento com resveratrol por mais de 96 horas, o que não permite comparação mais efetiva com o presente trabalho.

Em um modelo de toxicidade *in vitro* de neurônios e células gliais mesencefálicas, foi demonstrado que o resveratrol reduziu a reatividade microglial e atenuou a geração de ERO e de fatores pró-inflamatórios (Zhang et al., 2010). Ademais, o resveratrol promove diminuição dos níveis de lipoperoxidação, aumento dos níveis de atividade de enzimas antioxidantes, e redução na expressão de citocinas inflamatórias no encéfalo de roedores com modelos experimentais de DM e DP (Ates et al., 2007; Jin et al., 2008; Khan et al., 2010; Venturini et al., 2010; Lofrumento et al., 2014). Todos esses mecanismos podem ter contribuído para a manutenção da imunorreatividade neuronal para TH na SNPC dos ratos diabéticos tratados com resveratrol.

Outro ponto que não deve ser desconsiderado em relação às propriedades benéficas do resveratrol são suas interações com a microbiota e os possíveis efeitos dessa interação no SNC (Cryan & Dinan, 2012). Com espectrometria de massas e PCR em tempo real, foi observado que o resveratrol é capaz de aumentar a quantidade da bactéria *Akkermansia muciniphila* no trato gastrointestinal de ratos *Wistar* diabéticos e não-diabéticos (dados não publicados). Essa bactéria está associada a importantes efeitos benéficos na saúde humana, como aumento na responsividade à insulina, diminuição da inflamação no tecido adiposo e redução dos níveis plasmáticos de triglicérides (Shin et al., 2014; Anhê et al., 2015). Estudos futuros que avaliem os efeitos do DM e de seus tratamentos em outras populações bacterianas da microbiota intestinal certamente serão de extrema valia para um melhor entendimento das relações entre doenças metabólicas e neurodegenerativas.

Desta forma, a presente tese demonstrou que o resveratrol é capaz de atuar benéficamente sobre as alterações promovidas pelo modelo experimental de DM semelhante ao tipo 1 na via nigroestriatal de ratos, revertendo a acinesia e atenuando o aumento na densidade de células gliais e a redução de TH nos neurônios da SNPC. Devido à ausência de

mudanças na memória aversiva e no estado oxidativo hipocampal dos ratos diabéticos tratados ou não com resveratrol, os principais achados desta tese sugerem que algumas regiões encefálicas são mais suscetíveis aos eventos neurotóxicos induzidos pelo DM. Sendo assim, é necessário que estudos adicionais investiguem quais os possíveis mecanismos e efeitos do DM induzido por STZ e do tratamento via oral com resveratrol sobre a memória aversiva e sobre o estado oxidativo hipocampal, de maneira tempo e dose-dependentes.

5. CONCLUSÕES

Os principais resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- A indução do DM semelhante ao tipo 1 com STZ em ratos *Wistar* gerou diminuição do peso corporal e hiperglicemia, efeitos esses que não foram revertidos pelo tratamento com resveratrol.
- Os ratos diabéticos apresentaram acinesia e bradicinesia, características clássicas da DP. O tratamento com resveratrol foi capaz de reverter o quadro de acinesia, mas não o comportamento bradicinético dos animais diabéticos.
- Quando avaliados pela técnica de Nissl associada à morfometria planar, os animais diabéticos, tratados ou não com resveratrol, não apresentaram uma diferença significativa na densidade neuronal na SNPC, quando comparados aos animais não-diabéticos.
- Os animais diabéticos apresentaram um aumento da densidade glial na SNPC em relação aos animais tratados ou não com resveratrol.
- O modelo experimental de DM promoveu uma diminuição da densidade óptica celular nos neurônios imunorreativos para TH na SNPC. Essa redução de imunorreatividade foi revertida pelo tratamento com resveratrol.
- Os animais diabéticos não apresentaram prejuízos de memória avaliada na tarefa do CAC, quando comparados aos animais não-diabéticos. Tal achado indica que o DM não gera alterações no aprendizado motivado pelo medo na tarefa estudada.
- O tratamento com resveratrol nas doses de 10 e 20 mg/kg levou a um aumento da resposta condicionada avaliada na tarefa do CAC em animais diabéticos, quando comparados aos animais não-diabéticos.

- Tanto o DM experimental quanto o tratamento com resveratrol não foram capazes de modificar o conteúdo de espécies reativas e os níveis de atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx no hipocampo dos animais.

6. PERSPECTIVAS

De acordo com o contexto regional e nacional atual, as atividades listadas abaixo podem ser realizadas a médio e longo prazo, para obtenção de maiores informações relacionadas à temática desta tese. Para tanto, devem ser utilizados ratos *Wistar*, machos, adultos, com modelo de DM induzido por STZ, tratados ou não com diferentes doses de resveratrol, avaliando-se os seguintes parâmetros adicionais:

- Função mitocondrial - análise semi-quantitativa, por densitometria óptica regional, da técnica histoquímica para detecção de citocromo c oxidase - e morfologia mitocondrial - análise quantitativa das mitocôndrias encefálicas, com uso de microscopia eletrônica de transmissão associada à medida de percentual de superfície.

Sabe-se que deficiências na sinalização da insulina no SNC podem causar disfunções na cadeia de transporte de elétrons e alterações na morfologia das mitocôndrias presentes no tecido nervoso, com possíveis implicações na plasticidade neural e no comportamento dos animais (Schneeberger et al., 2013; Kleinridders et al., 2015). Desta forma, a avaliação das mitocôndrias no encéfalo de animais com DM possibilitará aumentar a compreensão acerca dos mecanismos neurotóxicos relacionados ao estado diabético, e sobre a atuação do resveratrol nas funções exercidas pela referida organela.

- Inervação periférica e trofismo muscular esquelético - análise da inervação periférica e da massa muscular por morfometria planar e técnicas estereológicas.

É relevante identificar se há presença de neuropatia periférica e perda de massa muscular nos animais diabéticos, visto que essas condições são consequências associadas ao DM, e possivelmente conduzem a disfunções motoras, incluindo bradicinesia, evidenciada no primeiro artigo desta tese.

- Atividade glial - avaliação da imunorreatividade para GFAP, microglia e oligodendrócitos - e atividade microglial *in vivo* - análise da atividade microglial por micro-tomografia por emissão de pósitrons, associada à tomografia computadorizada (micro PET-CT), com o uso do radio-traçador ^{11}C -(R)-PK11195.

O primeiro artigo desta tese mostrou que há um aumento da densidade glial na SNPC, o qual foi revertido pelo tratamento com resveratrol. Sendo assim, é importante avaliar e caracterizar a atividade da população glial envolvida na patogênese do DM, bem como a relação dessas células com os efeitos benéficos atribuídos ao resveratrol, especialmente na SNPC.

7. REFERÊNCIAS

Aguilar, M., Bhuket, T., Torres, S., Liu, B., & Wong, R. (2015). Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. *JAMA*, *313*(19), 1973–1974.

Ahtiluoto, S., Polvikoski, T., Peltonen, M., Solomon, A., Tuomilehto, J., Winblad, B., ... Kivipelto, M. (2010). Diabetes, Alzheimer disease, and vascular dementia: a population-based neuropathologic study. *Neurology*, *75*(13), 1195–1202.

Alvarez, E. O., Beauquis, J., Revsin, Y., Banzan, A. M., Roig, P., De Nicola, A. F., & Saravia, F. (2009). Cognitive dysfunction and hippocampal changes in experimental type 1 diabetes. *Behavioural Brain Research*, *198*(1), 224–230.
<http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.001>

American Diabetes Association. (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, *35 Suppl 1*, S64-71. <http://doi.org/10.2337/dc12-s064>

American Diabetes Association. (2016). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, *39*, S13–S22.

Andersen, H. (2012). Motor dysfunction in diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *28 Suppl 1*(November 2011), 89–92.
<http://doi.org/10.1002/dmrr.2257>

Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Liss, T., & O'Keefe, J. (Eds.). (2007). *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press.

Angel, R., Alston, W., & Higgins, J. (1970). Control of movement in Parkinson's disease. *Brain*, *93*(1), 1–14.

Anhê, F. F., Roy, D., Pilon, G., Dudonné, Stephanie Matamoros, Sebastien Varin, T. V, Garofalo, C., Moine, Quentin Desjardins, Y., ... Marette, A. (2015). A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*, *64*, 872–883.

Anthony, K., Reed, L., Dunn, J., Bingham, E., Hopkins, D., Marsden, P., & Amiel, S. (2006). Attenuation of insulin-evoked responses in brain networks controlling appetite and reward in insulin resistance: the cerebral basis for impaired control of food intake in metabolic syndrome? *Diabetes*, *55*(11), 2986–2992.

Arvanitakis, Z., Wilson, R. S., Bienias, J. L., & Bennett, D. a. (2007). Diabetes and parkinsonian signs in older persons. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, *21*(2), 144–9. <http://doi.org/10.1097/WAD.0b013e31805ba768>

Ates, O., Cayli, S. R., Yucel, N., Altinoz, E., Kocak, A., Durak, M. A., ... Yologlu, S. (2007). Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, *14*(3), 256–60. <http://doi.org/10.1016/j.jocn.2005.12.010>

Bagatini, P. B., Xavier, L. L., Neves, L., Saur, L., Barbosa, S., Baptista, P. P. A., ... Achaval, M. (2014). Resveratrol prevents akinesia and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats. *Brain Research*, *1592*, 101–12. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.007>

Banati, R. B. (2002). Visualising microglial activation in vivo. *Glia*, *40*(2), 206–217. <http://doi.org/10.1002/glia.10144>

Banks, W. A., Owen, J. B., & Erickson, M. A. (2012). Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacology and Therapeutics*, *136*(1), 82–93. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.07.006>

Barnham, K., Masters, C., & Bush, A. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(3), 205–214.

<http://doi.org/10.1038/nrd1330>

Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., & Brooks, H. L. (2014). Controle da postura e do movimento. Em K. E. Barrett, S. M. Barman, S. Boitano, & H. L. Brooks (Eds.), *Fisiologia Médica de Ganong* (24 ed., p. 241–296). Porto Alegre: AMGH.

Bastianetto, S., Ménard, C., & Quirion, R. (2015). Neuroprotective action of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(6), 1195–1201.

<http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.09.011>

Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(6), 493–506.

<http://doi.org/10.1038/nrd2060>

Bélanger, A., Lavoie, N., Trudeau, F., Massicotte, G., & Sylvain, G. (2004). Preserved LTP and water maze learning in hyperglycaemic – hyperinsulinemic ZDF rats. *Physiology and Behavior*, 83, 483–494.

<http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.08.031>

Biessels, G. J. (2013). Sweet memories: 20 years of progress in research on cognitive functioning in diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 719(1–3), 153–60.

<http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.055>

Biessels, G. J., Deary, I. J., & Ryan, C. M. (2008). Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *The Lancet. Neurology*, 7(February), 184–190.

Biessels, G. J., Kappelle, A. C., Bravenboer, B., Erkelens, D. W., & Gispen, W. H. (1994). Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 37, 643–650.

Biessels, G. J., van der Heide, L. P., Kamal, A., Bleys, R. L. A. ., & Gispen, W. H. (2002). Ageing and diabetes: implications for brain function. *European Journal of Pharmacology*, *441*(1), 1–14. [http://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01486-3](http://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01486-3)

Biessels, G.J., Strachan, M., Visseren, F., Kappelle, L., & Whitmer, R. (2014). Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, *2*(3), 246–255.

Biessels, G.J., Kamal, A., Geert M Urban Ivan, J. R., Spruijt, B., Erkelens, W., & Gispen, W. H. (1994). Place Learning and Hippocampal Synaptic Plasticity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Diabetes*, *45*(9), 1259–1266.

Biessels, G.J., Kamal, A., Urban, I. J. ., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W., & Gispen, W. H. (1998). Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Research*, *800*(1), 125–135. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00510-1](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00510-1)

Blázquez, E., Velázquez, E., & Hurtado-carneiro, V. (2014). Insulin in the brain : its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer’s disease. *Frontiers in Endocrinology*, *5*(October), 1–21. <http://doi.org/10.3389/fendo.2014.00161>

Bond, M. R., & Hanover, J. A. (2015). A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *The Journal of Cell Biology*, *208*(7), 869–80. <http://doi.org/10.1083/jcb.201501101>

Braak, H., & Braak, E. (2000). Pathoanatomy of Parkinson’s disease. *Journal of Neurology*, *247*(Suppl II), II3-10.

Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R., Jansen, E., Bohl, J., & Jellinger, K. (1994). Amygdala pathology in Parkinson’s disease. *Acta Neuropathologica*, *88*(6), 493–500.

Braak, H., de Vos, R. A. I., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2006). Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience Letters* (Vol. 396).

Braak, H., Tredici, K. Del, Rüb, U., de Vos, R. A. ., Jansen Steur, E. N. ., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 197–211. [http://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](http://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)

Branchi, I., & Ricceri, L. (2004). Refining learning and memory assessment in laboratory rodents. An ethological perspective. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita*, 40(2), 231–236.

Brands, A. M. A., Biessels, G. J., de Han, E. H. F., Kappelle, L. J., & Kessels, R. P. C. (2005). The Effects of Type 1 Diabetes on Cognitive Performance. *Diabetes Care*, 28(December 2004), 726–735.

Brettschneider, J., Tredici, K. Del, Lee, V. M.-Y. Y., & Trojanowski, J. Q. (2015). Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(2), 109–20. <http://doi.org/10.1038/nrn3887>

Bruehl, H., Wolf, O. T., Sweat, V., Tirsi, A., Richardson, S., & Convit, A. (2009). Modifiers of cognitive function and brain structure in middle-aged and elderly individuals with type 2 diabetes mellitus. *Brain Research*, 1280, 186–194. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.032>

Cade, W. T. (2008). Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. *Physical Therapy*, 88(11), 1322–1335.

Calgaroto, N. S., Thomé, G. R., da Costa, P., Baldissareli, J., Hussein, F. A., Schmatz, R., ... Schetinger, M. R. C. (2014). Effect of vitamin D3 on behavioural and biochemical parameters in diabetes type 1-induced rats. *Cell Biochemistry and Function*, 32(6), 502–510. <http://doi.org/10.1002/cbf.3044>

Callaghan, B. C., Cheng, H. T., Stables, C. L., Smith, A. L., & Feldman, E. L. (2012). Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *The Lancet Neurology*, *11*(6), 521–534. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70065-0](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70065-0)

Camins, A., Sureda, F. X., Junyent, F., Verdaguer, E., Folch, J., Pelegri, C., ... Pallàs, M. (2010). Sirtuin activators: Designing molecules to extend life span. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1799*(10), 740–749. <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.06.005>

Cardoso, S., Santos, M. S., Seça, R., & Moreira, P. I. (2010). Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and / or insulin-induced hypoglycemia. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1802*(11), 942–951. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.07.001>

Cereda, E., Barichella, M., Cassani, E., Caccialanza, R., & Pezzoli, G. (2012). Clinical features of Parkinson disease when onset of diabetes came first: a case-control study. *Neurology*, *78*(19), 1507–11. <http://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182553cc9>

Cheng, H. C., Ulane, C. M., & Burke, R. E. (2010). Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Annals of Neurology*, *67*(6), 715–725. <http://doi.org/10.1002/ana.21995>

Chi, T.-C., Chen, W.-P., Chi, T.-L., Kuo, T.-F., Lee, S.-S., Cheng, J.-T., & Su, M.-J. (2007). Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, *80*(18), 1713–1720. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.02.002>

Cilia, R., Cereda, E., Klersy, C., Canesi, M., Zecchinelli, A. L., Mariani, C. B., ... Pezzoli, G. (2015). Parkinson's disease beyond 20 years. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *86*, 849–855. <http://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308786>

Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*(10), 701–712. <http://doi.org/10.1038/nrn3346>

Dali-Youcef, N., Lagouge, M., Froelich, S., Koehl, C., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2007). Sirtuins: the “magnificent seven”, function, metabolism and longevity. *Annals of Medicine*, *39*(5), 335–45. <http://doi.org/10.1080/07853890701408194>

Damasceno, D. C., Netto, A. O., Iessi, I. L., Gallego, F. Q., Corvino, S. B., Dallaqua, B., ... Rudge, M. V. C. (2014). Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *BioMed Research International*, *2014*, 1–11. <http://doi.org/10.1155/2014/819065>

Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson’s disease: mechanisms and models. *Neuron*, *39*, 889–909. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3)

DCCT/EDIC Study Research Group. (2007). Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *New England Journal of Medicine*, *356*, 1842–1852.

de Senna, P. N., Ilha, J., Baptista, P. P. A., do Nascimento, P. S., Leite, M. C., Paim, M. F., ... Xavier, L. L. (2011). Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metabolic Brain Disease*, *26*(4), 269–79. <http://doi.org/10.1007/s11011-011-9262-x>

de Senna, P. N., Xavier, L. L., Bagatini, P. B., Saur, L., Galland, F., Zanotto, C., ... Achaval, M. (2015). Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the blood brain barrier in diabetic rats. *Brain Research*, *1618*, 75–82. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.05.026>

Debruyne, J., Versijpt, J., Van Laere, K., De Vos, F., Keppens, J., Strijckmans, K., ... De Reuck, J. (2003). PET visualization of microglia in multiple sclerosis patients using [¹¹C]PK11195. *European Journal of Neurology*, *10*(3), 257–264.

Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A. I., Bohl, J. R. E., & Braak, H. (2002). Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *61*(5), 413–426. <http://doi.org/10.1007/978-3-211-92660-4>

Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews. Neuroscience*, *11*(5), 339–50. <http://doi.org/10.1038/nrn2822>

Denu, J. M. (2005). The Sir2 family of protein deacetylases. *Current Opinion in Chemical Biology*, *9*(5), 431–440. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.08.010>

do Nascimento, P. S., Lovatel, G. A., Barbosa, S., Ilha, J., Centenaro, L. A., Malysz, T., ... Achaval, M. (2011). Treadmill training improves motor skills and increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta in diabetic rats. *Brain Research*, *1382*, 173–80. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.01.063>

Edwards, L., Quigley, E., & Pfeiffer, R. (1992). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease: frequency and pathophysiology. *Neurology*, *42*(2), 726–732.

Evarts, E. V, Teravainen, H., & Calne, D. B. (1981). Reaction time in Parkinson's Disease. *Brain*, *104*, 167–186.

Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *991*, 1–14.

Figlewicz, D., Brot, M., McCall, A., & Szot, P. (1996). Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat : a molecular study. *Brain Research*, *736*, 54–60.

Fowler, M. J. (2008). Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*, *26*(2), 77–82. <http://doi.org/10.2337/diaclin.26.2.77>

Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66(8), 663–673. [http://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00410-5](http://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00410-5)

Frye, R. A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(2), 793–798. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3000>

Funk, J. (2007). Distúrbios do pâncreas endócrino. Em S. McPhee & W. Ganong (Eds.), *Fisiopatologia da doença: uma introdução à medicina clínica* (5 ed., p. 642). São Paulo: McGraw-Hill Interamericana do Brasil.

Gaspar, J., Baptista, F., Macedo, M., & Ambrósio, A. (2016). Inside the diabetic brain: role of different players involved in cognitive decline. *ACS Chemical Neuroscience*, 7, 131–142. <http://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00240>

Gaudieri, P., Chen, R., Greer, T., & Holmes, C. (2008). Cognitive function in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 31, 1892–1897. <http://doi.org/10.2337/dc07-2132>.

Gershanik, O. S. (2010). Akinetic-Rigid Syndrome. Em K. Katie & L. V. Metman (Eds.), *The Encyclopedia of Movement Disorders* (1 ed., p. 20–22). Oxford: Elsevier.

Gispén, W. H., & Biessels, G.-J. (2000). Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends in Neurosciences*, 23(11), 542–549. [http://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01656-8](http://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01656-8)

Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. (2015). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 386, 743–800.

Gold, S. M., Dziobek, I., Sweat, V., Tirsi, A., Rogers, K., Bruhel, H., ... Convit, A. (2007). Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia*, *50*, 711–719.
<http://doi.org/10.1007/s00125-007-0602-7>

Gomes, C. V., Kaster, M. P., Tomé, A. R., Agostinho, P. M., & Cunha, R. A. (2011). Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1808*(5), 1380–1399. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.12.001>

Grillo, C. A., Piroli, G. G., & Rosell, D. R. (2003). Region specific increases in oxidative stress and superoxide dismutase in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Neuroscience*, *121*, 133–140. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00343-9](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00343-9)

Grzęda, E., & Wiśniewska, R. J. (2008). Differentiations of the effect of NMDA on the spatial learning of rats with 4 and 12 week diabetes mellitus. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *68*(3), 398–406.

Grzeda, E., Wiśniewska, R. J., & Wiśniewski, K. (2007). Effect of an NMDA receptor agonist on T-maze and passive avoidance test in 12-week streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Reports*, *59*(6), 656–663.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18195454>

Haider, S., Ahmed, S., Tabassum, S., Memon, Z., Ikram, M., & Haleem, D. J. (2013). Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. *Acta Neurologica Belgica*, *113*(1), 35–41.
<http://doi.org/10.1007/s13760-012-0121-2>

Halliday, G. M., & Stevens, C. H. (2011). Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *26*(1), 6–17.
<http://doi.org/10.1002/23455>

Harikumar, K. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*, 7(April), 1020–1035.

<http://doi.org/10.4161/cc.7.8.5740>

Harten, B. Van, Oosterman, J., Muslimovic, D., Loon, B. Van, Scheltens, P., & Weinstein, H. (2007). Cognitive impairment and MRI correlates in the elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *Age and Ageing*, 36, 164–170.

<http://doi.org/10.1093/ageing/afl180>

Hayashi-Park, E., Ozment, B. N., Griffith, C. M., Zhang, H., Patrylo, P. R., & Rose, G. M. (2016). Experimentally induced diabetes worsens neuropathology, but not learning and memory, in middle aged 3xTg mice. *Behavioural Brain Research*.

<http://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.020>

Hinnouho, G., Czernichow, S., Dugravot, A., Nabi, H., Brunner, E., Kivimaki, M., & Singh-Manoux, A. (2015). Metabolically healthy obesity and the risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes: the Whitehall II cohort study. *European Heart Journal*, 36(9), 551–559.

Hirsch, E. C., & Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurology*, 8(4), 382–97.

[http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70062-6](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70062-6)

Howard, C., & Reed, M. (1998). *Unbiased Stereology*. New York: Springer.

Huang, M., Gao, L., Yang, L., Lin, F., & Lei, H. (2012). Abnormalities in the brain of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats revealed by diffusion tensor imaging. *NeuroImage: Clinical*, 1(1), 57–65. <http://doi.org/10.1016/j.nicl.2012.09.004>

Hubbard, B. P., & Sinclair, D. A. (2014). Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(3), 146–154. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.004>

Hwang, I. K., Choi, J. H., Nam, S. M., Park, O. K., Yoo, D. Y., Kim, W., ... Yoon, Y. S. (2014). Activation of microglia and induction of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus of type 2 diabetic rats. *Neurological Research*, *36*(9), 824–32. <http://doi.org/10.1179/1743132814Y.0000000330>

Inuwa, I. M., Peet, M., & Williams, M. A. (2009). QSAR modeling and transmission electron microscopy stereology of altered mitochondrial ultrastructure of white blood cells in patients diagnosed as schizophrenic and treated with antipsychotic drugs. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, *80*(3–4), 133–7. <http://doi.org/10.1080/10520290500303349>

Izquierdo, I. (2011). *Memória* (2 ed.). Porto Alegre: Artmed.

Izquierdo, I., Furini, C. R. G., & Myskiw, J. C. (2016). Fear memory. *Physiological Reviews*, *96*(2), 695–750. <http://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>

Jakobsen, J., Sidenius, P., Gundersen, H., & Østerby, R. (1987). Quantitative changes of cerebral neocortical structure in insulin-treated long-term streptozocin-induced diabetes in rats. *Diabetes*, *36*(5), 597–601.

Jellinger, K. (1991). Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Molecular and Chemical Neuropathology*, *14*(3), 153–197.

Jin, F., Wu, Q., Lu, Y.-F., Gong, Q.-H., & Shi, J.-S. (2008). Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *European Journal of Pharmacology*, *600*(1–3), 78–82. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.005>

Jing, Y.-H., Chen, K.-H., Kuo, P.-C., Pao, C.-C., & Chen, J.-K. (2013). Neurodegeneration in streptozotocin-induced diabetic rats is attenuated by treatment with resveratrol. *Neuroendocrinology*, *98*(2), 116–27. <http://doi.org/10.1159/000350435>

Kahn, S. E., Cooper, M. E., & Prato, S. Del. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*, 383(9922), 1068–1083. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6)

Kalalian-Moghaddam, H., Baluchnejadmojarad, T., & Roghani, M. (2013). Hippocampal synaptic plasticity restoration and anti-apoptotic effect underlie berberine improvement of learning and memory in streptozotocin-diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 698(1–3), 259–266. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.020>

Kalia, L. V, & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), 896–912. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)

Kalyani, R., Corriere, M., & Ferrucci, L. (2014). Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(10), 819–829.

Kamal, A., Biessels, G. J., Duis, S. E., & Gispen, W. H. (2000). Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia*, 43(4), 500–6. <http://doi.org/10.1007/s001250051335>

Kamiyama, K., Wada, A., Sugihara, M., Kurioka, S., Hayashi, K., Hayashi, T., ... Kitagaki, H. (2010). Potential hippocampal region atrophy in diabetes mellitus type 2: a voxel-based morphometry VSRAD study. *Japanese Journal of Radiology*, 28(4), 266–272. <http://doi.org/10.1007/s11604-009-0416-2>

Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. *Cell*, 157(1), 163–186. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>

Khan, M. M., Ahmad, A., Ishrat, T., Khan, M. B., Hoda, M. N., Khuwaja, G., ... Islam, F. (2010). Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Research, 1328*, 139–51. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.031>

Kleinridders, A., Cai, W., Cappellucci, L., Ghazarian, A., Collins, W. R., Vienberg, S. G., ... Kahn, C. R. (2015). Insulin resistance in brain alters dopamine turnover and causes behavioral disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112*(11), 3463–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.1500877112>

Koekkoek, P. S., Kappelle, L. J., Berg, E. V. D., Rutten, G. E. H. M., & Biessels, G. J. (2015). Cognitive function in patients with diabetes mellitus: guidance for daily care. *The Lancet Neurology, 14*(3), 329–340. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70249-2](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70249-2)

Korchounov, A., Meyer, M. F., & Krasnianski, M. (2010). Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation. *Journal of Neural Transmission, 117*(12), 1359–1369. <http://doi.org/10.1007/s00702-010-0454-z>

Kovacic, P., & Somanathan, R. (2010). Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: focus on antioxidant action, cell signaling and safety. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 3*(2), 86–100.

Kulkarni, S. S., & Cantó, C. (2015). The molecular targets of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta, 1852*(6), 1114–1123. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.005>

Kumagai, A. K. (1999). Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 15*(July), 261–273.

- Lanciego, L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), 1–20. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a009621>
- Langcake, P., Cornford, C. A., & Pryce, R. J. (1979). Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry*, 18, 1025–1027.
- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9, 77–86.
- Larner, A. J. (2010). *A Dictionary of Neurological Signs* (3 ed.). New York: Springer New York.
- Li, Z.-G., Zhang, W., Grunberger, G., & Sima, A. A. (2002). Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Research*, 946(2), 221–231. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02887-1](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02887-1)
- Lofrumento, D. D., Nicolardi, G., Cianciulli, A., De Nuccio, F., La Pesa, V., Carofiglio, V., ... Panaro, M. A. (2014). Neuroprotective effects of resveratrol in an MPTP mouse model of Parkinson's-like disease: possible role of SOCS-1 in reducing pro-inflammatory responses. *Innate Immunity*, 20(3), 249–60. <http://doi.org/10.1177/1753425913488429>
- Magarinos, A. M., & McEwen, B. S. (2000). Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 11056–11061. <http://doi.org/10.1073/pnas.97.20.11056>
- Malone, J. I., Hanna, S. K., & Saporta, S. (2006). Hyperglycemic brain injury in the rat. *Brain Research*, 1076(1), 9–15. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.12.072>

Mazzoni, P., Shabbott, B., & Cortés, J. C. (2012). Motor control abnormalities in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(6), 1–17. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a009282>

McCrimmon, R. J., Ryan, C. M., & Frier, B. M. (2012). Diabetes and cognitive dysfunction. *The Lancet*, 379(9833), 2291–2299. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60360-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60360-2)

McNay, E. C., & Sherwin, R. S. (2004). Effect of recurrent hypoglycemia on spatial cognition and cognitive metabolism in normal and diabetic rats. *Diabetes*, 53(February), 418–425.

Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in Neuroscience*, 36(10), 587–597. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001>. Sugar

Messing, R. O. (2007). Distúrbios do sistema nervoso. Em S. J. McPhee & W. F. Ganong (Eds.), *Fisiopatologia da doença: uma introdução à medicina clínica* (5 ed., p. 642). São Paulo: McGraw-Hill Interamericana do Brasil.

Miles, W., & Root, H. (1922). Psychologic tests applied to diabetic patients. *Arch Intern Med*, 30, 767–777.

Moghaddam, H. K., Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., Khaksari, M., Norouzi, P., Ahoie, M., & Mahboobi, F. (2014). Berberine ameliorate oxidative stress and astrogliosis in the hippocampus of STZ-induced diabetic rats. *Molecular Neurobiology*, 49(2), 820–826. <http://doi.org/10.1007/s12035-013-8559-7>

Moheet, A., Mangia, S., & Seaquist, E. R. (2015). Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1353, 60–71. <http://doi.org/10.1111/nyas.12807>

Mooradian, A. D. (1997). Central nervous system complications of diabetes mellitus - a perspective from the blood–brain barrier. *Brain Research Reviews*, 23(3), 210–218. [http://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00003-9](http://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00003-9)

Moroo, I., Yamada, T., Makino, H., Tooyama, I., McGeer, P., McGeer, E., & Hirayama, K. (1994). Loss of insulin receptor immunoreactivity from the substantia nigra pars compacta neurons in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 87(4), 343–348.

NCD-RisC. (2016). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4 · 4 million participants. *The Lancet*, 6736(16), 1–18. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00618-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8)

Nonomura, S., Kanagawa, H., & Makimoto, A. (1963). Chemical constituents of polygonaceous plants. i. studies on the components of ko-jo-kon. (*Polygonum cuspidatum* sieb. et zucc.). *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 83, 988–990.

Novelle, M. G., Wahl, D., Diéguez, C., Bernier, M., & Cabo, R. De. (2015). Resveratrol supplementation: where are we now and where should we go? *Ageing Research Reviews*, 21, 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.002>

Orimo, S. (2002). Sympathetic cardiac denervation in Parkinson's disease and pure autonomic failure but not in multiple system atrophy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 73(6), 776–776. <http://doi.org/10.1136/jnnp.73.6.776>

Palsamy, P., & Subramanian, S. (2008). Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(9), 598–605. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.06.037>

Palsamy, P., & Subramanian, S. (2009). Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin–nicotinamide-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 179(2), 356–362. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.11.008>

Palsamy, P., & Subramanian, S. (2010). Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic b-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Journal of Cellular Physiology*, 224, 423–432.

Palsamy, P., & Subramanian, S. (2011). Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2–Keap1 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812(7), 719–731. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.008>

Park, E., & Pezzuto, J. M. (2015). The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(6), 1071–1113. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.01.014>

Partata, W. A., Krepsky, A. M. R., Xavier, L. L., Marques, M., & Achaval, M. (1999). Distribution of glycogen phosphorylase and cytochrome oxidase in the central nervous system of the turtle *Trachemys dorbigni*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 124(2), 113–122. [http://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00100-2](http://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00100-2)

Patiño-Fernández, A., Delamater, A., Applegate, E., Brady, E., Eidson, M., Nemery, R., & Gonzalez-Mendoza, L Richton, S. (2010). Neurocognitive functioning in preschool-age children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes*, 11(6), 424–430.

Penumathsa, S. V., Thirunavukkarasu, M., Zhan, L., Maulik, G., Menon, V. P., Bagchi, D., & Maulik, N. (2008). Resveratrol enhances GLUT-4 translocation to the caveolar lipid raft fractions through AMPK/Akt/eNOS signalling pathway in diabetic myocardium. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *12*(6A), 2350–2361. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00251.x>

Piazza, F. V., Pinto, G. V., Trott, G., Marcuzzo, S., Gomez, R., & Fernandes, M. da C. (2011). Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behavioural Brain Research*, *217*(1), 16–20. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.09.017>

Pirot, P., Cardozo, A., & Eizirik, D. (2008). Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, *52*(1), 156–165.

Prabhakar, O. (2013). Cerebroprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory effects in diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *386*(8), 705–10. <http://doi.org/10.1007/s00210-013-0871-2>

Price, N. L., Gomes, A. P., Ling, A. J. Y., Duarte, F. V., Martin-Montalvo, A., North, B. J., ... Sinclair, D. A. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metabolism*, *15*(5), 675–690. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.003>

Radenković, M., Stojanović, M., & Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: the current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *78*, 13–31. <http://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>

Rahman, S., Griffin, H. J., Quinn, N. P., & Jahanshahi, M. (2011). On the nature of fear of falling in Parkinson's disease. *Behavioural Neurology*, *24*(3), 219–228. <http://doi.org/10.3233/BEN-2011-0330>

Reagan, L. P. (2012). Diabetes as a chronic metabolic stressor: causes, consequences and clinical complications. *Experimental Neurology*, 233(1), 68–78. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.02.004>.DIABETES

Reagan, L. P., Grillo, C. A., & Piroli, G. G. (2008). The As and Ds of stress: metabolic , morphological and behavioral consequences. *European Journal of Pharmacology*, 585, 64–75. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.050>

Rege, S. D., Geetha, T., Griffin, G. D., Broderick, T. L., & Babu, J. R. (2014). Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 1–12. <http://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00218>

Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339(8808), 1523–1526. [http://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-F](http://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-F)

Revsin, Y., Rekers, N. V, Louwe, M. C., Saravia, F. E., Nicola, A. F. De, Kloet, E. R. De, & Oitzl, M. S. (2009). Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology*, 34, 747–758. <http://doi.org/10.1038/npp.2008.136>

Roriz-Filho, J., Sá-Roriz, T. M., Rosset, I., Camozzato, A. L., Santos, A. C., Chaves, M. L. F., ... Roriz-Cruz, M. (2009). (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(5), 432–43. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.12.003>

Saueressig, F., Xavier, L. L., Bagatini, P. B., Nique, P. S., DaCosta, J. C., Gomes, I., & Cherubini, K. (2012). Morphofunctional analysis of sciatic nerve and motor performance of rats after cryotherapy with liquid nitrogen. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 113(3), 319–326. <http://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.03.023>

^aSchmatz, R., Mazzanti, C. M., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierrez, J., Corrêa, M., ... Morsch, V. M. (2009). Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, *610*(1–3), 42–8.

<http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.032>

^bSchmatz, R., Mazzanti, C. M., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierrez, J., Maldonado, P., ... Morsch, V. M. (2009). Ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats and treated with resveratrol. *Brain Research Bulletin*, *80*(6), 371–376. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.08.019>

Schneeberger, M., Dietrich, M. O., Sebastián, D., Imbernón, M., Castaño, C., Garcia, A., ... Claret, M. (2013). Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell*, *155*(1), 172–187.

<http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.003>

Sepúlveda, J., & Murray, C. (2014). The state of global health in 2014. *Science*, *345*(6202), 1275–1278.

Sharma, S., Kulkarni, S., & Chopra, K. (2007). Effect of resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, on thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *21*(1), 89–94.

Shin, N., Lee, J., Lee, H., Kim, M., Whon, T., Lee, M., & Bae, J. (2014). An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, *63*(5), 727–735.

Shisodia, S., & Aggarwal, B. (2006). Resveratrol: a polyphenol for all seasons. Em B. Aggarwal & S. Shisodia (Eds.), *Resveratrol in health and disease* (p. 1–16). New York: CRC Press.

Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, *4*, 180–183. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>

Sima, A. A. F. (2010). Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetologica*, 47(4), 279–93. <http://doi.org/10.1007/s00592-010-0218-0>

Sima, A. A. F., Zhang, W., Kreipke, C. W., Rafols, J. A., & Hoffman, W. H. (2009). Inflammation in diabetic encephalopathy is prevented by C-peptide. *Review of Diabetic Studies*, 6(1), 37–42. <http://doi.org/10.1900/RDS.2009.6.37>

Simões, R., & Litvan, I. (2010). Bradykinesia. Em K. Katie & L. V. Metman (Eds.), *The Encyclopedia of Movement Disorders* (1 ed., p. 158–161). Oxford: Elsevier.

Sims-Robinson, C., Kim, B., Rosko, A., & Feldman, E. L. (2010). How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? *Nature Reviews. Neurology*, 6(10), 551–9. <http://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.130>

Singaram, C., Gaumnitz, E., Torbey, C., Ashraf, W., Quigley, E. M., Sengupta, A., & Pfeiffer, R. (1995). Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *The Lancet*, 346(8979), 861–864. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92707-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92707-7)

Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, 30(2), 91–113. [http://doi.org/10.1016/S0009-9120\(96\)00155-5](http://doi.org/10.1016/S0009-9120(96)00155-5)

Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S., & Moser, E. I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), 655–669. <http://doi.org/10.1038/nrn3785>

Su, H.-C., Hung, L.-M., & Chen, J.-K. (2006). Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 290(6), E1339-46. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00487.2005>

Sun, A. Y., Wang, Q., Simonyi, A., & Sun, G. Y. (2010). Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Molecular Neurobiology*, 41(2–3), 375–83. <http://doi.org/10.1007/s12035-010-8111-y>

Szkudelska, K., & Szkudelski, T. (2010). Resveratrol, obesity and diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 635(1–3), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.02.054>

The Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration. (2014). Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardiometabolic risk factors from 1980 to 2010: a comparative risk assessment. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(8), 634–647. [http://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70102-0](http://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70102-0)

Tomlinson, D. R., & Gardiner, N. J. (2008). Glucose neurotoxicity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9, 36–45. <http://doi.org/10.1038/nrn2294>

Venturini, C. D., Merlo, S., Souto, A. A., Fernandes, M. D. C., Gomez, R., & Rhoden, C. R. (2010). Resveratrol and red wine function as antioxidants in the nervous system without cellular proliferative effects during experimental diabetes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(6), 434–441. <http://doi.org/10.4161/oxim.3.6.14741>

Villalba, R. M., Mathai, A., & Smith, Y. (2015). Morphological changes of glutamatergic synapses in animal models of Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(September), 117. <http://doi.org/10.3389/fnana.2015.00117>

Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., & Ikuta, F. (1988). Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathologica*, 76(3), 217–221.

Wang, L., Zhai, Y.-Q., Xu, L.-L., Qiao, C., Sun, X.-L., Ding, J.-H., ... Hu, G. (2014). Metabolic inflammation exacerbates dopaminergic neuronal degeneration in response to acute MPTP challenge in type 2 diabetes mice. *Experimental Neurology*, 251, 22–9. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.11.001>

Werner, H., & LeRoith, D. (2014). Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: physiological and pathological aspects. *European Neuropsychopharmacology*, 24(12), 1947–1953. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.01.020>

Whitmer, R., Gustafson, D., Barrett-Connor, E., Haan, M., Gunderson, E., & Yaffe, K. (2008). Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology*, 71(14), 1057–1064.

World Health Organization (2016). *Global Report On Diabetes* (p. 1-86). Geneva.

Wolfgang, J., Ferber, S., Johnson, J., & Newgard, C. (1994). STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*, 43(11), 1326–1333.

Wrighten, S. A., Piroli, G. G., Grillo, C. A., & Reagan, L. P. (2009). A look inside the diabetic brain: contributors to diabetes-induced brain aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(5), 444–53. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.013>

Xavier, L. L., Viola, G. G., Ferraz, A. C., Da Cunha, C., Deonizio, J. M. D., Netto, C. A., & Achaval, M. (2005). A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Research. Brain Research Protocols*, 16(1–3), 58–64. <http://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2005.10.002>

Xu, Q., Park, Y., Huang, X., Hollenbeck, A., Blair, A., Schatzkin, A., & Chen, H. (2011). Diabetes and risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care*, 34(4), 910–5. <http://doi.org/10.2337/dc10-1922>

Yassa, M. A., & Stark, C. E. L. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends in Neurosciences*, *34*(10), 515–525.

<http://doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.006>

Yi, S. S., Hwang, K., Won, D., Jae, K., & Shin, H. (2011). The chronological characteristics of SOD1 activity and inflammatory response in the hippocampi of STZ-induced type 1 diabetic rats. *Neurochemical Research*, *36*, 117–128.

<http://doi.org/10.1007/s11064-010-0280-6>

Yogev, G., Plotnik, M., Peretz, C., Giladi, N., & Hausdorff, J. M. (2007). Gait asymmetry in patients with Parkinson's disease and elderly fallers: when does the bilateral coordination of gait require attention? *Experimental Brain Research*, *177*(3), 336–346.

<http://doi.org/10.1007/s00221-006-0676-3>

Zangiabadi, N., Asadi-Shekaari, M., Sheibani, V., Jafari, M., Shabani, M., Asadi, A. R., ... Jarahi, M. (2011). Date fruit extract is a neuroprotective agent in diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats: a multimodal analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2011*, 976948.

<http://doi.org/10.1155/2011/976948>

Zhang, F., Shi, J.-S., Zhou, H., Wilson, B., Hong, J.-S., & Gao, H.-M. (2010). Resveratrol protects dopamine neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity through its anti-inflammatory actions. *Molecular Pharmacology*, *78*(3), 466–77.

<http://doi.org/10.1124/mol.110.064535>

Zhang, F., Wang, Y.-Y., Liu, H., Lu, Y.-F., Wu, Q., Liu, J., & Shi, J.-S. (2012). resveratrol produces neurotrophic effects on cultured dopaminergic neurons through prompting astroglial BDNF and GDNF release. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, *2012*, 937605.

<http://doi.org/10.1155/2012/937605>



Ziemssen, T. (2010). Cardiovascular autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, *289*(1), 74–80.

<http://doi.org/10.1016/j.jns.2009.08.031>

Ziemssen, T., & Reichmann, H. (2007). Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 13(6), 323–332.
<http://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2006.12.014>

Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A., & Tillement, J. (1999). Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 25(2–3), 87–97.

8. ANEXO

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 21878
Título: Efeitos do tratamento com resveratrol sobre o comportamento motor, memória de longo prazo e histofisiologia dopaminérgica e glutamatérgica em ratos diabéticos

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:


MATILDE ACHAVAL ELENA - coordenador de 01/03/2012 até 28/02/2015
Priscylla Nunes de Senna - pesquisador de 01/03/2012 até 28/02/2015
Pamela Brambilla Bagatini - pesquisador de 01/03/2012 até 28/02/2015

Equipe Externa:

Léder Leal Xavier - pesquisador de 01/03/2012 até 28/02/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 07/11/2011 - Sala de Reuniões do 2º andar no Prédio da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 240 ratos machos adultos da linhagem Wistar, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 18 de Novembro de 2011



Prfa. Dra. Steia M.K. Rates
Mica Presidente da CEUA/UFRGS

p/ FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética