



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

**EFEITO BENÉFICO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE O DÉFICIT DE
MEMÓRIA E A PLASTICIDADE CELULAR HIPOCAMPAL EM RATOS
DIABÉTICOS TIPO 1**

Dissertação de Mestrado

Francele Valente Piazza

Porto Alegre

2012

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

**EFEITO BENÉFICO DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE O DÉFICIT DE
MEMÓRIA E A PLASTICIDADE CELULAR HIPOCAMPAL EM RATOS
DIABÉTICOS TIPO 1**

Francele Valente Piazza

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Simone Marcuzzo

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Matilde Achaval

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Angelo Piazza e Roseli Valente Piazza.

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, professora doutora Simone Marcuzzo, pelo acolhimento e oportunidade que me proporcionou na UFRGS, pela confiança, pela paciência e pelas horas despendidas com a orientação.
- À minha co-orientadora, professora doutora Matilde Achaval, pelo prestimoso apoio científico e financeiro, meus sinceros agradecimentos.
- À estrutura do Laboratório de Histofisiologia Comparada pela qual foi possível o desenvolvimento experimental deste trabalho.
- À Lígia Centenaro pela amizade, incentivo e parceria incondicionais, por ter chorado e/ou vibrado comigo a cada imuno, e por não ter me deixado perder a fé nos momentos mais difíceis.
- À Ethiane Segabinazi, minha aluna de iniciação científica preferida, pela dedicação, interesse, responsabilidade e empenho durante todo o trabalho.
- À Priscilla Senna e Patrícia Severo do Nascimento pelos auxílios, conversas, troca de experiências, de materiais e de conhecimento.
- À Gisele Lovatel pela troca de conhecimentos, carinho e amizade.
- À Núbia Broetto, Camilla Lazzaretti e Adolfo Reis pelo excelente trabalho em grupo na realização do II e III Curso de Neurociências da UFRGS e pela amizade.
- Aos meus colegas de mestrado Jaqueline Carletti e Ramiro Diaz, pela amizade e incentivo.

- Aos demais colegas do Laboratório de Histofisiologia Comparada pela ajuda e amizade.
- Ao técnico de microscopia eletrônica Henrique B. Biehl, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, pela assistência na microscopia confocal.
- Aos meus pais pelo suporte nos estudos e na vida, e pelo amor incondicional.
- Ao meu irmão Thiago Valente Piazza pela compreensão, paciência, parceria e carinho.
- À família Valente e aos meus amigos queridos pelo carinho e compreensão nos momentos de ausência.
- À Iuri de Oliveira Mariano, pela importância que sempre terá em minha vida. Agradeço pelos preciosos ensinamentos, pelo constante incentivo nos estudos e por ter sido um dos expectadores principais da minha formação acadêmica até aqui. Obrigada pela compreensão, parceria, amor e carinho durante o tempo em que estivemos juntos.
- Aos professores da banca avaliadora pela disponibilidade e pelas contribuições.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFRGS pela oportunidade de mestrado.
- Ao CNPq pela bolsa de estudos e pelo apoio financeiro.
- À FAPERGS pelo apoio financeiro.

“A coisa mais bela que o homem pode
experimentar é o mistério. É essa
emoção fundamental que está na raiz
de toda ciência e toda arte.”

Albert Einstein

RESUMO

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1) tem sido associado com complicações a longo prazo no sistema nervoso central, além dos efeitos periféricos comuns relacionados à doença, causando disfunções cognitivas no encéfalo. Por outro lado, o enriquecimento ambiental (EA) induz mecanismos de plasticidade dependentes da experiência, especialmente no hipocampo, melhorando o desempenho dos animais em testes de aprendizado e memória. Assim, nosso objetivo foi avaliar a influência do EA sobre o déficit de memória, a atividade locomotora, os níveis de corticosterona, a imunorreatividade da proteína sinaptofisina, e a densidade e a ativação de astrócitos e microglia no giro denteado (GD) do hipocampo de ratos diabéticos tipo 1. Para isso, ratos Wistar machos com 21 dias de idade, foram expostos ao EA ou mantidos em caixa-moradia padrão (controles, C) por 3 meses. Quando adultos, os animais tanto C quanto EA foram randomicamente divididos e induziu-se diabetes através de injeção de estreptozotocina em metade dos animais de cada grupo, sendo mantidas as respectivas condições ambientais para cada um dos grupos. A memória espacial dependente de hipocampo foi avaliada em todos os grupos através do teste de reconhecimento de objeto reposicionado, no 41^o dia após a indução do diabetes, bem como a locomoção geral dos animais no campo aberto durante o mesmo teste. Os níveis séricos de corticosterona foram medidos ao final do experimento, a imunorreatividade da sinaptofisina foi avaliada por imunoistoquímica, e a densidade e a ativação de astrócitos e da microglia por imunofluorescência no hilo do GD do hipocampo. Nossos resultados mostraram que o EA foi capaz de prevenir ou atrasar o desenvolvimento do déficit de memória causado pelo diabetes em ratos, porém não reverteu o déficit motor observado nos animais diabéticos. Não houve diferença significativa na imunorreatividade da sinaptofisina entre os grupos. Além disso, embora o EA não tenha modificado a densidade e a ativação dos astrócitos nos animais

diabéticos, o enriquecimento atenuou os efeitos prejudiciais da hiperglicemia sobre a ativação microglial, bem como reduziu os níveis séricos de corticosterona nos ratos diabéticos adultos. Assim, o EA ajudou a amenizar as comorbidades cognitivas associadas ao diabetes, possivelmente por atenuar a hiperatividade do eixo HPA e a ativação microglial nos animais diabéticos.

Palavras-chave: Encefalopatia diabética, Enriquecimento ambiental, Hipocampo, Memória, Corticosterona, Sinaptofisina, Astrócitos, Microglia, Imunoistoquímica.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) has been associated with long-term complications in central nervous system, besides peripheral common adverse effects, causing neurocognitive dysfunction in the brain. On the other hand, enriched environment (EE) induces mechanisms of experience-dependent plasticity especially in hippocampus, improving the performance of animals in learning and memory tasks. Thus, our objective was to investigate the influence of the EE on memory deficits, locomotion, corticosterone levels, synaptophysin protein immunoreactivity, and density and activation of astrocytes and microglia in the hippocampal dentate gyrus (DG) of type 1 diabetic rats. For this, male Wistar rats, 21 days old, were exposed to the EE or maintained in standard housing (controls, C) for 3 months. At adulthood, C and EE animals were randomly divided and half of them induced to diabetes by streptozotocin, being maintained the respective environmental conditions for each animal groups. Hippocampus-dependent spatial memory was evaluated in all groups in the novel object-placement recognition task, on 41th day after diabetes induction, as well as the general locomotion in the open field at the same test. Serum corticosterone levels were measured in the end of the experiment, contents of synaptophysin was evaluated by immunohistochemistry, and density and activation of both astrocytes and microglia by immunofluorescence in the hilus of the DG in hippocampus. Our results showed that EE was able to prevent or delay the development of memory deficits caused by diabetes in rats, however did not revert the motor impairment observed in group diabetic. There was no significant difference in synaptophysin immunoreactivity among the groups. Furthermore, although the EE did not modify the density and activation of astrocytes in diabetic animals, it attenuated the injurious effect of hyperglycemia over microglial activation, as well as decreased the serum level of corticosterone in diabetic adult rats. Thus, the EE has helped to ameliorate cognitive

comorbidities associated with T1DM, possibly by reducing the hyperactivity of HPA axis and the microglial activation in diabetic animals.

Keywords: Diabetic encephalopathy, Enriched environment, Hippocampus, Memory, Corticosterone, Synaptophysin, Astrocytes, Microglia, Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	Produtos finais de glicação avançada
anti-GAD	Anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico
BBB	Barreira hematoencefálica
BDNF.....	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
C	Controles
CA	Corno de Ammon
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMT1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Enriquecimento ambiental
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos-2
GD	Giro denteado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GR	Receptor do tipo glicocorticóide
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
Iba-1	<i>Ionized calcium binding adapter molecule-1</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IGF- I	Fator de crescimento semelhante à insulina - 1
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração

MR	Receptor do tipo mineralocorticóide
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOPR	Teste de reconhecimento do objeto reposicionado
PKC	Proteína quinase C
RAGE	Receptores para produtos finais de glicação avançada
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SNAP-25	Proteína associada a sinaptossoma com 25 kDa, proteína do complexo SNARE
SNARE	Receptor para SNAP
STZ	Estreptozotocina
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VGluT-1	Transportador vesicular de glutamato-1

ARTIGO

AGE	Advanced glycosylation end products
ANOVA	Analysis of variance
AOI	Area of interest
BSA	Bovine serum albumin
C	Control
CNS	Central nervous system

DAB	3,3-diaminobenzidine
DC	Diabetic rats previously exposed to standard housing
DEE	Diabetic rats previously exposed to enriched environment
DG	Dentate gyrus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EE	Enriched environment
GFAP	Glial fibrillary acid protein
HPA	Hypothalamic–pituitary–adrenal
Iba-1	Ionized calcium binding adapter molecule 1
LTP	Long-term potentiation
NDC	Non-diabetic rats previously exposed to standard housing
NDEE	Non-diabetic rats previously exposed to an enriched environment
NOPR	Novel Object-Placement Recognition Task
OD	Optical densitometry
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-Tx	PBS containing 0.1% Triton X-100
PNS	Peripheral nervous system
RIA	Radio Immuno Assay
SEM	Standard error of mean
STZ	Streptozotocin
SYP	Synaptophysin
T1DM	Type 1 diabetes mellitus

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1. Locomotion in the different groups..... 65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema que resume os possíveis mecanismos envolvidos na encefalopatia do diabetes tipo 1; RAGE = receptores para produtos finais de glicação avançada 7
- Figura 2. Esquema mostrando os possíveis mecanismos de destruição das células- β pancreáticas pela STZ: (I) por metilação do DNA e (II) por modificação do DNA induzido por espécies reativas de oxigênio e/ou NO. O_2^- = radical superóxido 9
- Figura 3. Desenho esquemático mostrando a estrutura e as principais conexões do hipocampo. CA = Corno de Ammon; GD = giro denteado 11
- Figura 4. Desenho esquemático mostrando os dois subtipos de astrócitos: protoplasmático e fibroso, ambos fazendo contato com vasos sanguíneos através dos pés-terminais 17
- Figura 5. Imagens digitalizadas mostrando as diferentes formas de microglia marcadas com Isolectina-B4: (A) microglia de repouso ou ramificada, (B) microglia ativada ou hipertrófica e (C) microglia reativa ou amebóide 22
- Figura 6. Enriquecimento ambiental e seus possíveis efeitos de estimulação sensorial, visual, cognitiva e motora em diferentes áreas do encéfalo de roedores..... 25

ARTIGO

- Figure 1. Schematic representation of the experimental design..... 66
- Figure 2. Percentage of preference for the relocated object during the test trial in different

groups..... 66

Fig. 3. Effects of diabetes and EE on SYP in the hippocampus. (A) Digital images of coronal sections of the dentate gyrus stained for SYP. (B) Optical density (OD) measurement of SYP immunoreactivity in the hilus of the DG of the hippocampus in different groups..... 67

Fig. 4. Effects of diabetes and EE on quantification of GFAP+ astrocytes in the hippocampus. (A) Digital images of coronal sections of the dentate gyrus stained for GFAP immunofluorescence. (B) Density (number of astrocytes/mm³). (C) % of area occupied by astrocytes in the hilus of the DG of the hippocampus in different groups..... 68

Fig. 5. Effects of diabetes and EE on quantification of Iba-1+ microglia in the hippocampus. (A) Digital images of coronal sections of the dentate gyrus stained for Iba-1 immunofluorescence. (B) Density (number of microglia/mm³) (*p<0.01 vs. NDC and NDEE, #p<0.05 compared to NDC). (C) % of area occupied by microglia (*p<0.05 compared to NDC, #p<0.05 vs. DEE) in the hilus of the DG of the hippocampus in different groups..... 69

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Diabetes	1
1.1.1 Encefalopatia diabética	4
1.1.2 Modelos experimentais de diabetes	8
1.2 Hipocampo e Memória	10
1.3 Sinaptofisina	14
1.4 Astrócitos	16
1.5 Microglia	21
1.6 Enriquecimento Ambiental	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27

2.2 Objetivos específicos	27
3. MÉTODOS E RESULTADOS	29
3.1 Artigo: Enriched environment induces beneficial effects in memory deficits and hippocampus cellular plasticity in type 1 diabetic rats	30
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	70
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes

O diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas comum em humanos e de incidência crescente. Caracteriza-se por hiperglicemia decorrente de deficiência na secreção de insulina pelas células β do pâncreas, ou de resistência na ação da insulina, ou ambos (GISPEN; BIESSELS, 2000; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003).

Segundo a classificação etiológica, os tipos de diabetes mais frequentes são o diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1), anteriormente conhecido como diabetes juvenil ou insulino-dependente, que compreende cerca de 10% do total de casos, e o diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2), anteriormente conhecido como diabetes do adulto ou não-insulino-dependente, que compreende cerca de 90% do total de casos. Outro tipo de diabetes encontrado com maior frequência e cuja etiologia ainda não está esclarecida é o diabetes gestacional, que, em geral, é um estágio pré-clínico de diabetes, detectado no rastreamento pré-natal (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Outros tipos específicos de diabetes menos frequentes podem resultar de defeitos genéticos da função das células beta, defeitos genéticos da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, efeito colateral de medicamentos, infecções e outras síndromes genéticas associadas ao diabetes (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003; 2011).

O DMT1 é caracterizado pela destruição das células β pancreáticas mediada por auto-imunidade, levando à deficiência absoluta na secreção de insulina. Auto-anticorpos circulantes como anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD), anti-ilhotas e anti-insulina são detectados no soro em 85-90% dos pacientes no momento do diagnóstico. Algumas vezes, o

desenvolvimento do DMT1 está associado a outras doenças auto-imunes como a tireoidite de Hashimoto, a doença de Addison e a miastenia gravis. Em menor proporção, a causa da falência das células beta é desconhecida (tipo 1 idiopático). Conseqüentemente, os pacientes requerem tratamento com insulina para sobreviverem, e a ausência do mesmo acarreta em cetoacidose, coma e até ao óbito (GISPEN; BIESSELS, 2000; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003; 2011).

O desenvolvimento do DMT1, que acompanha a taxa de destruição das células β , ocorre em 90% dos casos na infância (com pico de incidência entre 10 e 14 anos), sendo os demais 5 a 10% dos casos diagnosticados em adultos com menos de 20 anos de idade (JAHROMI; EISENBARTH, 2007; MAAHS *et al.*, 2010). Sabe-se que o desencadeamento do processo auto-imune é atribuído a uma complexa interação entre predisposição genética (principalmente o complexo antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II presente no cromossomo 6) e fatores ambientais (agentes infecciosos virais, baixa ingestão de vitamina D, consumo de leite bovino, estresse psicológico), uma vez que os determinantes genéticos contribuem em apenas 50% para o desenvolvimento do DMT1 (PENG; HAGOPIAN, 2006; MAAHS *et al.*, 2010).

O DMT2 é caracterizado pela resistência insulínica (envolvendo déficits no receptor de insulina e na sua via de sinalização intracelular) com relativa deficiência na secreção de insulina, em resposta à constante hiperglicemia. Geralmente é diagnosticado na vida adulta e está associada com obesidade, sedentarismo e hábitos de vida pouco saudáveis, em conjunto com predisposição genética. Tratamentos como dieta adequada, prática de exercício físico e terapia medicamentosa visam reduzir essa resistência insulínica e aumentar a secreção de insulina endógena. Eventualmente, terapia com insulina exógena pode se fazer necessário para controle dos níveis glicêmicos (GISPEN; BIESSELS, 2000; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003; 2011).

Os sintomas clássicos de diabetes são: poliúria, polidipsia, polifagia e perda involuntária de peso (os “4 Ps”). Outros sintomas que levam à suspeita clínica são: fadiga, fraqueza, letargia, prurido cutâneo e vulvar, e infecções de repetição. Algumas vezes o diagnóstico é feito a partir de complicações crônicas como neuropatia, retinopatia ou doença cardiovascular aterosclerótica, podendo ser também assintomático em proporção significativa dos casos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Além disso, níveis glicêmicos maiores que 126 mg/dL em jejum, ou maiores que 200 mg/dL a qualquer momento do dia (glicemia casual) ou duas horas após a ingestão de 75g de glicose dissolvida em água (teste de tolerância à glicose), confirmam o diagnóstico (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

A longo prazo, ambas as formas de diabetes estão associadas com numerosas complicações secundárias, acarretando em dano celular e em complicações micro e macrovasculares que afetam vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. O desenvolvimento ou não dessas complicações depende da duração do diabetes e da qualidade do controle glicêmico (GISPEN; BIESSELS, 2000).

O diabetes afeta quase 6% da população mundial e 11% da população brasileira igual ou superior a 40 anos, o que representa cerca de 5,5 milhões de portadores (população estimada pelo IBGE 2005). É uma doença que impõe grande impacto social, uma vez que apresenta alta morbimortalidade, com perda importante na qualidade de vida. Estima-se que ocorram aproximadamente 4 milhões de mortes por ano relativas ao diabetes e suas complicações, o que representa 9% da mortalidade mundial total. O grande impacto econômico ocorre notadamente nos serviços de saúde, como consequência dos crescentes custos do tratamento da doença e suas complicações, como a doença cardiovascular, a diálise por insuficiência renal crônica e as cirurgias para amputações de membros inferiores (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

1.1.1 Encefalopatia diabética

Além das complicações secundárias do diabetes no sistema nervoso periférico (SNP), evidências recentes têm revelado efeitos prejudiciais do DM (tipos 1 e 2) também no sistema nervoso central (SNC), tanto em humanos como em modelos animais da doença (SEAQUIST, 2010; SIMA, 2010; DO NASCIMENTO *et al.*, 2011; PIAZZA *et al.*, 2011). O conjunto dessas alterações cerebrais, lentas e progressivas, e clinicamente significantes relacionadas com o DM tem sido denominado de encefalopatia diabética (SIMA, 2010).

Avaliações neuropsicológicas têm mostrado que pacientes, tanto com DMT1, como com DMT2, apresentam declínio em funções cognitivas, aprendizado e memória, e psicomotoras quando comparados com indivíduos saudáveis, sendo fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (RISTOW *et al.*, 2004; WESSELS *et al.*, 2008; DE LA MONTE, 2009). Porém, recentes estudos indicam que a natureza e os mecanismos pelos quais esses déficits ocorrem parecem diferir nos dois tipos da doença (SIMA, 2010). Nos indivíduos com DMT2, o declínio cognitivo é relacionado à resistência insulínica, à duração da doença, às suas patologias associadas (hipertensão, dislipidemias, obesidade), bem como com as alterações encefálicas afetadas pelo próprio envelhecimento, sendo considerado fator de risco para o desenvolvimento de demências vasculares e doença de Alzheimer (ZHAO *et al.*, 2004; DE LA MONTE, 2009; SIMA, 2010; VALENTE *et al.*, 2010).

O DMT1, no entanto, afeta crianças e jovens ainda em estágio de desenvolvimento neurológico, momento em que o encéfalo é mais suscetível às variações metabólicas associadas à doença (SIMA, 2010). Indivíduos com DMT1 têm demonstrado prejuízo em funções relacionadas à atenção, à velocidade no processamento das informações, às funções executivas, à eficiência psicomotora e de aprendizado e memória (BRANDS *et al.*, 2005; WESSELS *et al.*,

2008) Em crianças, esses déficits resultam em baixo desenvolvimento intelectual e pior desempenho nas habilidades escolares e verbais (ler, soletrar, contar) quando comparado a crianças saudáveis (NORTHAM *et al.*, 2009; HANNONEN *et al.*, 2010).

Pacientes com hiperglicemia crônica, com início precoce da doença e episódios de hipoglicemia severos e recorrentes parecem ter maior risco de desenvolver alterações estruturais e funcionais no SNC (MUSEN *et al.*, 2006; SEAQUIST, 2010). Estudos de imagem mostraram que indivíduos diabéticos do tipo 1, 12 anos após o início da doença, apresentam significativa diminuição no volume de substância branca nos lobos frontal e temporal e no giro para-hipocampal, além de diminuição no volume de substância cinzenta indicando perda neuronal no tálamo, giro para-hipocampal e córtex insular, quando comparado a indivíduos saudáveis (NORTHAM *et al.*, 2009). Corroborando esses achados, Musen e colaboradores (2006), através de medidas morfométricas, mostraram haver diminuição da densidade de substância cinzenta no tálamo, no giro superior e médio temporal e no giro frontal nos pacientes diabéticos tipo 1, 15 a 25 anos após o início da doença. Esses estudos revelam existir uma maior vulnerabilidade de estruturas temporais e frontais límbicas relacionadas à patologia, estando o prejuízo cognitivo associado a déficits de substância cinzenta e branca (SIMA, 2010).

Embora os mecanismos responsáveis por esses danos estruturais e funcionais ainda não estejam bem esclarecidos, estudos apontam que se devem às alterações celulares, moleculares e microvasculares causadas pelo diabetes, as quais levam, dentre outros efeitos, a uma redução do fluxo e do metabolismo cerebral, contribuindo para os déficits cognitivos relacionados à doença (WESSELS *et al.*, 2008; GISPEN; BIESSELS, 2000).

Similarmente ao que ocorre na neuropatia diabética, as alterações celulares, moleculares e microvasculares encefálicas causadas pela hiperglicemia crônica, bem como pela deficiência de insulina, de peptídeo-C e suas sinalizações celulares (SIMA, 2010), são atribuídas a quatro

principais fatores interligados: aumento do fluxo da via do poliol, aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), aumento da ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC), e aumento da atividade da via da hexosaminase (GISPEN; BIESSELS, 2000; BROWNLEE, 2005).

Através da via do poliol, a enzima aldose redutase normalmente tem a função de reduzir aldeídos tóxicos intracelulares a alcoóis inativos. Porém, quando as concentrações de glicose dentro das células se tornam muito altas, a enzima aldose redutase também reduz a glicose em sorbitol e frutose com consumo de NADPH. No entanto, o cofator NADPH é requerido também para a regeneração de glutatona reduzida, um potencial antioxidante intracelular (BROWNLEE, 2005). Assim, o acúmulo de sorbitol intracelular, caracterizado pelo aumento da atividade da via do poliol em resposta a hiperglicemia, causa uma redução nos níveis de glutatona reduzida, tornando a célula suscetível a dano e morte por estresse oxidativo, com formação de produtos de peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e do DNA (ácido desoxirribonucleico) (TUZCU; BAYDAS, 2006).

Esse acúmulo de sorbitol intracelular também leva a um aumento da formação de AGEs, com conseqüente alterações neurotróficas, como redução da expressão gênica do fator de crescimento semelhante à insulina - 1 (IGF- I), bem como alterações neuromodulatórias, como a redução nos níveis de insulina, de seus receptores e seus fatores de transcrição de sinalização intracelular, e estão associados com perda neuronal no hipocampo e no córtex frontal em indivíduos diabéticos tipo 1 (SIMA, 2010). Além disso, o aumento da formação de AGEs e de isoformas da PKC leva a uma maior ativação de fatores pró-inflamatórios, como fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6, que são associados a danos vasculares (BROWNLEE, 2005) e celulares, como a morte de oligodendrócitos na substância branca em animais diabéticos (Figura 1) (SIMA *et al.*, 2009).

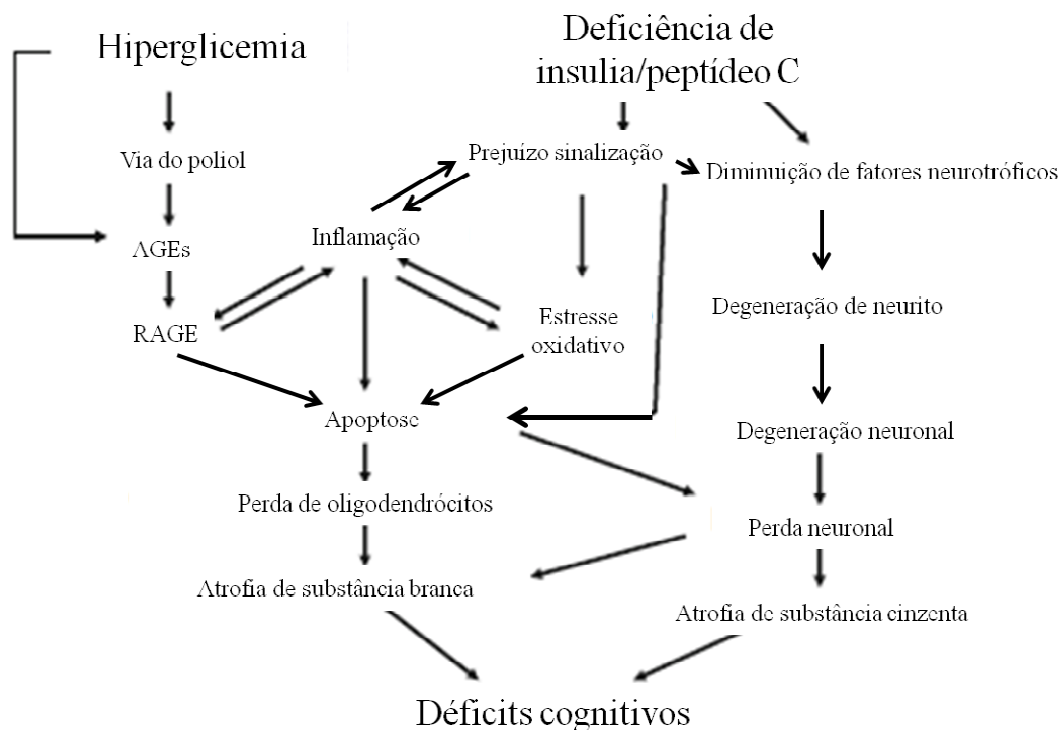


Figura 1. Esquema que resume os possíveis mecanismos envolvidos na encefalopatia do diabetes tipo 1; RAGE = receptores para produtos finais de glicação avançada (modificado de SIMA, 2010).

Humanos diabéticos com baixo controle da doença apresentam também hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), com aumento nos níveis de cortisol circulantes (DESROCHER *et al.*, 2004; MESSIER, 2005). Similarmente, uma elevação dos glicocorticóides adrenais é encontrada em modelos animais da doença (GRILLO *et al.*, 2005; REVSIN *et al.*, 2008; 2009; STRANAHAN *et al.*, 2008), bem como em estudos envolvendo estresse crônico (WRIGHT *et al.*, 2006) e depressão (McEWEN *et al.*, 2002). Recentes estudos têm mostrado que altos e persistentes níveis de glicocorticóides causam efeitos deletérios no SNC, levando a degenerações morfológicas e funcionais no hipocampo, como alterações na plasticidade sináptica, diminuição da neurogênese e perda neuronal, possivelmente contribuindo para o déficit

de aprendizado e memória associado à doença (KAMAL *et al.*, 1998; STRANAHAN *et al.*, 2008; REVSIN *et al.*, 2009; PIAZZA *et al.*, 2011).

1.1.2 Modelos experimentais de diabetes

Para estudar os efeitos do DMT1 em modelos animais, bem como de diversas intervenções terapêuticas, as drogas diabetogênicas aloxano e estreptozotocina (STZ) são as mais frequentemente utilizadas (SZKUDELSKI, 2001).

A STZ é um antibiótico derivado da *Streptomyces achromogenes*, que tem ação seletiva e citotóxica sobre as células- β das ilhotas pancreáticas, secretoras de insulina, acarretando em uma diminuição da produção do hormônio no organismo e consequente hiperglicemia (MURATA *et al.*, 1999).

A STZ é transportada para dentro das células- β pancreáticas por transportadores de glicose do tipo GLUT2 presentes em suas membranas plasmáticas. O efeito citotóxico da STZ é atribuído, principalmente, a dois possíveis efeitos diretos sobre a célula: metilação de purinas do DNA e formação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO) intracelulares, levando a dano no DNA (Figura 2). Já como efeito citotóxico indireto da STZ pode-se citar a inflamação das ilhotas pancreáticas causada pela infiltração de células mononucleares, e a produção de radicais superóxido e NO pelas mesmas, contribuindo para a destruição das células- β (MURATA *et al.*, 1999; GISPEN; BIESSELS, 2000).

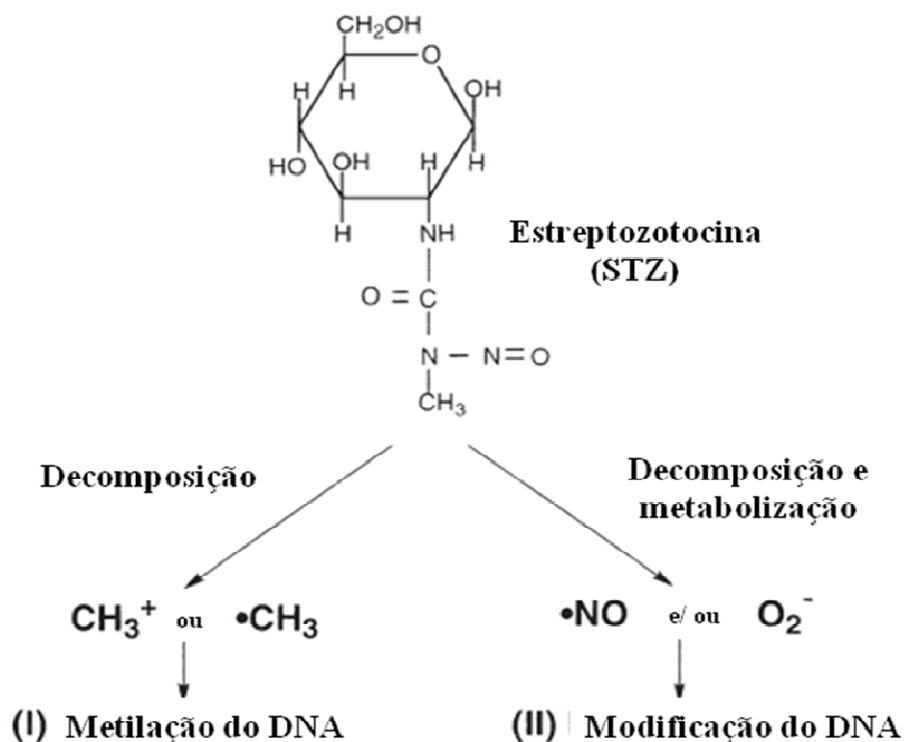


Figura 2. Esquema mostrando os possíveis mecanismos de destruição das células- β pancreáticas pela STZ: (I) por metilação do DNA e (II) por modificação do DNA induzido por espécies reativas de oxigênio e/ou NO. O_2^- = radical superóxido (modificado de MURATA *et al.*, 1999).

A aplicação da droga normalmente se faz por injeção intravenosa ou intraperitoneal de STZ, com dose variando de 40 a 60 mg/Kg (SZKUDELSKI, 2001). Desse modo, os animais diabéticos induzidos por STZ se tornam hipoinsulinêmicos, mas não chegam a necessitar de tratamento com insulina para sobreviverem (GISPEN; BIESSELS, 2000).

Assim como em humanos, os animais diabéticos induzidos por STZ apresentam os sinais clássicos de diabetes: marcada hiperglicemia, hiperosmolaridade plasmática, hipoinsulinemia, polifagia, poliúria, polidipsia e perda de peso (SERINO *et al.*, 1998; SENNA *et al.*, 2011); além de complicações como retinopatia, nefropatia, danos vasculares e no sistema nervoso proporcionais ao avançar da doença (GISPEN; BIESSELS, 2000).

1.2 Hipocampo e Memória

O hipocampo é uma das estruturas mais plásticas e mais estudadas do SNC. Está localizado no lobo temporal de cada hemisfério cerebral e, anatomicamente, é dividido pelo Corno de Ammon (CA1 a CA4; ou hipocampo propriamente dito), composto por cinco camadas celulares, sendo uma delas a camada das células piramidais; e pelo giro denteado (GD), cuja concavidade se dispõe ao redor de CA4. O giro denteado, por sua vez, é composto por três camadas: a camada molecular (mais externa), uma camada de células granulares, que emitem seus prolongamentos dendríticos para a camada molecular, e uma camada de células polimórficas (ou hilo), mais interna e próxima à CA4 (PAXINOS, 1995).

O hipocampo propriamente dito (CA), juntamente com o giro denteado, com o complexo subicular (subiculum, presubiculum e parasubiculum) e com o córtex entorrinal, compreende a formação hipocampal. Essas regiões estão ligadas entre si por três principais conexões nervosas unidirecionais: do córtex entorrinal partem aferências axonais corticais que fazem sinapse com os neurônios granulares do GD (via perforante), que, por sua vez, emitem projeções axonais (fibras musgosas) que atravessam o hilo e se conectam com neurônios de CA3; destes, partem ramificações que, ou deixam o hipocampo via fórnix, ou se estendem e fazem sinapses com neurônios de CA1 (colaterais de Schaffer); e de CA1, por fim, partem eferências para o subiculum (Figura 3) (LANGSTON *et al.*, 2010).

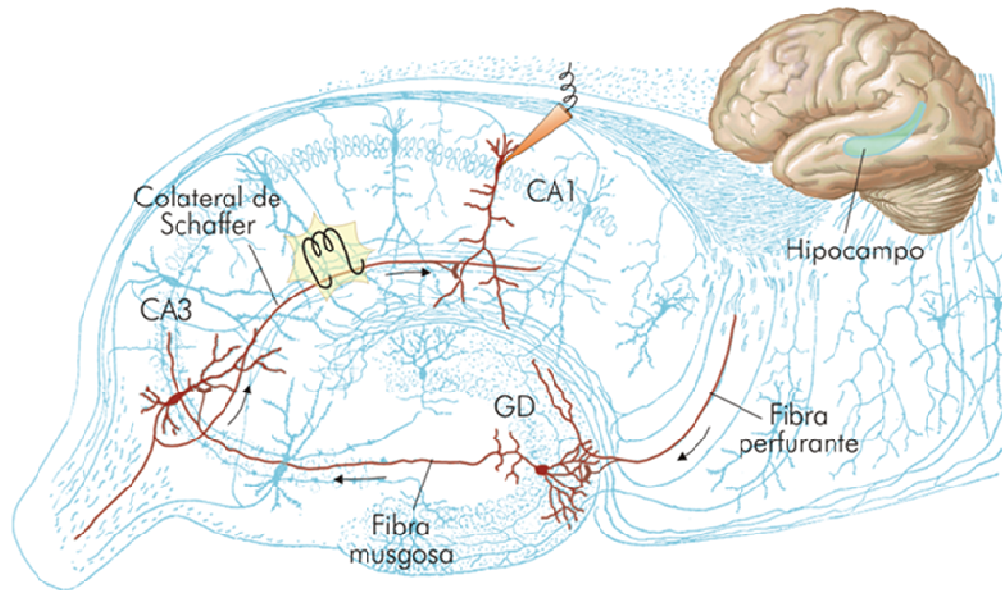


Figura 3. Desenho esquemático mostrando a estrutura e as principais conexões do hipocampo. CA = Corno de Ammon; GD = giro dentado (Lent, 2010).

O hipocampo, junto com outras estruturas do lobo temporal medial, está diretamente relacionado com o processamento e a consolidação de memórias declarativas ou explícitas. Além disso, é uma região cerebral que participa do sistema límbico, tendo um papel integrativo e essencial para os processos cognitivos e afetivos (BEAR *et al.*, 2008).

As memórias declarativas estão associadas ao conhecimento de lugares, coisas e pessoas, e aos seus significados. São subdivididas em dois tipos de memórias, as semânticas, que envolvem o conhecimento desses fatos independentemente do contexto em que foram aprendidos; e as episódicas, relacionadas a lembranças de eventos específicos pessoalmente vivenciados dentro de um contexto como tempo e espaço (BEAR *et al.*, 2008; SHARMA *et al.*, 2010).

Memória espacial é conceituada como um subtipo de memória episódica, pois se refere ao armazenamento de informações sobre localização dentro de certo ambiente, sendo dependente da

integridade hipocampal (PAUL *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2010). Em modelos animais, podemos avaliar possíveis déficits cognitivos associados a diversas patologias, como o diabetes, e/ou a lesões no hipocampo através de testes comportamentais que avaliam memória espacial, tais como o *water maze* (labirinto aquático de Morris) e o teste de reconhecimento do objeto reposicionado (NOPR), entre outros (BIESSELS *et al.*, 1998; POPOVIÇ *et al.*, 2001; PAUL *et al.*, 2009; REVSIN *et al.*, 2009). Em animais diabéticos tipo 1, por exemplo, o déficit de aprendizado e memória no *water maze* é identificado quando os animais despendem um maior tempo e percorrem uma maior distância para encontrarem a localização da plataforma alvo do teste, comparado aos animais controles (TUZCU; BAYDAS, 2006), enquanto na tarefa do NOPR os animais com diabetes despendem um menor tempo explorando o objeto reposicionado (PIAZZA *et al.*, 2011).

Nos estudos com modelos animais de DMT1, contudo, torna-se importante avaliar, concomitantemente a memória espacial dependente de hipocampo, a atividade locomotora, uma vez que Do Nascimento e colaboradores (2011) mostraram que o diabetes também causa comprometimento motor nos animais, possivelmente associado à redução da produção de dopamina e morte neuronal na área tegmental ventral e na pars compacta da substância Nigra. Assim, mensurá-la torna-se essencial para avaliar se o dano motor está interferindo ou não no desempenho dos animais no teste de aprendizado e memória.

Com relação às possíveis bases celulares e mecanismos eletrofisiológicos envolvidos no processo de aprendizagem e consolidação de memória, estudos têm mostrado que o diabetes acarreta também em alterações na potenciação de longa duração (LTP) e na depressão de longa duração (LTD) no hipocampo de animais experimentais, possivelmente contribuindo para os déficits cognitivos relacionados à doença (BIESSELS *et al.*, 1998; KAMAL *et al.*, 1999). Foi evidenciado prejuízo na indução da LTP nas regiões de CA1, CA3 e GD do hipocampo,

associado à facilitação da LTD na região CA1 em animais com 12 semanas de diabetes tipo 1, quando comparados a animais controles (KAMAL *et al.*, 1999). Além disso, Biessels e colaboradores (1998) mostraram que o tratamento com insulina desde o início da doença preveniu as alterações na LTP, porém, quando iniciada após 10 semanas da indução do diabetes, a insulina já não conseguiu reverter o déficit de aprendizado no *water maze* e só restabeleceu parcialmente a LTP em ratos diabéticos induzidos por STZ.

Enquanto a exposição a níveis basais de glicocorticóides é essencial para a manutenção da função neuronal, a exposição a longo prazo a níveis elevados induzem alterações morfológicas no hipocampo e déficit cognitivo (McEWEN; SAPOLSKY, 1995). Em roedores, os efeitos do glicocorticóide corticosterona sobre os processos de aprendizagem e memória são mediados por receptores do tipo mineralocorticóides (MR) e glicocorticóides (GR), os quais são altamente expressos em áreas cerebrais límbicas, especialmente o hipocampo (REVSIN *et al.*, 2009). Sabe-se que a ativação transitória de receptores do tipo GR após situações esporádicas de estresse facilitam a consolidação da memória (OITZL *et al.*, 1992). No entanto, a ativação excessiva de GRs por níveis altos e crônicos de glicocorticóides causam prejuízo na função hipocampal e no processamento da memória (McEWEN; SAPOLSKY, 1995). Já receptores do tipo MR são neuroprotetores e estimulam a função hipocampal, mediando a ação da corticosterona em situações de novidade, em reações comportamentais e em respostas afetivas (OITZL *et al.*, 1992; 1994).

O excesso de glicocorticóides circulantes associado ao diabetes possivelmente contribui para as alterações hipocampais, bem como para o déficit de aprendizado e memória associado à doença (REVSIN *et al.*, 2008; 2009). Corroborando essa hipótese, Stranahan e colaboradores (2008) mostraram que o prejuízo na LTP, a redução na neurogênese no GD do hipocampo, bem como os déficits cognitivos foram normalizados nos animais diabéticos após adrenalectomia e

posterior reposição de corticosterona em concentrações fisiológicas. Além disso, Revsin e colaboradores (2009) mostraram que o uso de antagonista de receptores GR (mifepristona) reverteu as alterações hipocampais e o déficit cognitivo em animais diabéticos tipo 1, e que esses efeitos deletérios sobre o hipocampo são causados pelo excesso de ativação de receptores do tipo GR nos estágios iniciais da doença.

1.3 Sinaptofisina

Sinaptofisina é uma glicoproteína integral de membrana presente nas vesículas pré-sinápticas de neurônios, em vesículas similares na medula adrenal, e também em uma variedade de células neuroendócrinas normais e tumorais dos tipos epitelial e neural (WIEDENMANN *et al.*, 1986). Em estudos com fluorescência, a sinaptofisina geralmente está co-localizada com terminações axonais, e presume-se que alterações em seus níveis reflitam em mudanças nas vesículas sinápticas, sendo utilizado como um indicador de plasticidade sináptica (CALHOUN *et al.*, 1996; NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2004).

Atualmente, na literatura, não há um consenso estabelecido sobre a relação da sinaptofisina no DMT1. Grillo e colaboradores (2005) mostraram que a expressão de sinaptofisina encontrou-se aumentada no *stratum oriens e no stratum radiatum* de CA1 e CA3 do hipocampo de animais diabéticos induzidos por STZ após 1 e 5 semanas do início da doença utilizando análise radioimunocitoquímica. Além disso, após 5 semanas de diabetes, observaram uma redistribuição e reorganização na expressão da proteína pré-sináptica em CA3 por imunofluorescência, quando comparado com animais controles.

A exposição de cultura de neurônios hipocampais a elevados níveis de glicose por 7 dias não alterou a expressão e a marcação de sinaptofisina, mas induziu mudanças no conteúdo e na

distribuição de outras proteínas envolvidas na exocitose de neurotransmissores no hipocampo, como SNAP-25 (proteína associada a sinaptossoma com 25 kDa; uma das proteínas do complexo SNARE, receptor para SNAP), sinaptotagmina-1 (proteína vesicular com sensor de Ca^{+2}), e VGluT-1 (transportador vesicular de glutamato - 1) (GASPAR *et al.*, 2010a). Entretanto, os mesmos autores encontraram aumento no conteúdo de sinaptofisina em terminações nervosas do hipocampo através da análise de purificação de sinaptossomas hipocampais após 2, 4 e 8 semanas de diabetes, associado com uma diminuição do conteúdo de SNAP-25 e sintaxina-1 (outra proteína do complexo SNARE) em ratos induzidos por STZ (GASPAR *et al.*, 2010b).

Já Nitta e colaboradores (2002) mostraram uma redução nos níveis de sinaptofisina e sintaxina no hipocampo, acompanhado por uma diminuição no número de dendritos basais e anormalidades na estrutura de espinhos dendríticos utilizando a técnica de Golgi no córtex, bem como uma redução nos níveis da proteína BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) – proteína essencial para a manutenção das funções neuronais, incluindo funções sinápticas e neurotransmissão – e do seu RNAm (ácido ribonucléico) no córtex e no hipocampo de ratos com 4 semanas de diabetes. Corroborando esses achados, Sima e colaboradores (2009) observaram uma significativa diminuição na expressão de sinaptofisina hipocampal em ratos com 4 meses de diabetes, além de uma diminuição no número de terminais pré-sinápticos marcados com sinaptofisina na região do *stratum oriens* de CA1, sugerindo que o diabetes cause disfunção sináptica e degeneração envolvendo neuritos pré-sinápticos.

Além disso, Chambers e colaboradores (2005) revelaram uma redução na imunorreatividade de sinaptofisina no giro denteado do hipocampo de indivíduos com esquizofrenia, quando comparado com indivíduos controles, através da análise de tecido *post-mortem*, podendo haver uma associação entre alterações nos níveis de sinaptofisina hipocampais e o déficit cognitivo relacionado à esquizofrenia.

Assim, mais estudos tornam-se necessários para a elucidação dos efeitos agudos e crônicos do diabetes sobre a expressão de sinaptofisina no hipocampo, revelando possíveis alterações de conexão e plasticidade sináptica provocadas pela hiperglicemia, bem como estudos envolvendo a expressão de sinaptofisina no giro dentado do hipocampo, pouco estudada até o momento.

1.4 Astrócitos

Astrócitos são as células gliais mais numerosas do encéfalo (BEAR *et al.*, 2008). Baseados em sua morfologia celular e localização anatômica são divididos em dois subtipos: astrócitos protoplasmáticos, que possuem numerosos prolongamentos curtos e ramificados, predominantes na substância cinzenta; e astrócitos fibrosos, dotados de menos prolongamentos, porém mais longos e menos ramificados, predominantes na substância branca. Além disso, análises de microscopia eletrônica revelaram que os processos dos astrócitos protoplasmáticos envolvem sinapses, enquanto os processos dos astrócitos fibrosos estão em contato com nódulos de Ranvier, e ambos os subtipos de astrócitos fazem extensivos contatos com vasos sanguíneos (Figura 4) e se comunicam com outros astrócitos por junções *gap* (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

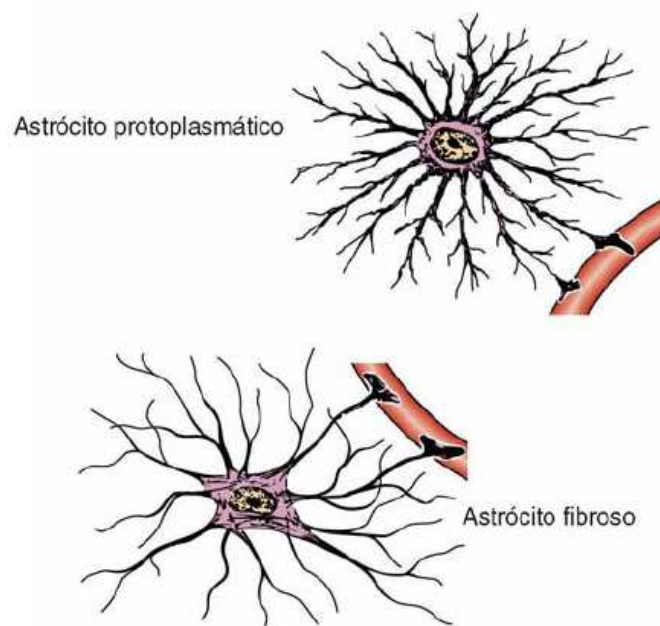


Figura 4. Desenho esquemático mostrando os dois subtipos de astrócitos: protoplasmático e fibroso, ambos fazendo contato com vasos sanguíneos através dos pés-terminais (Junqueira; Carneiro, 2004).

Os astrócitos são fundamentais para a manutenção da homeostasia do SNC. Juntamente com neurônios e microvasos, formam as unidades neurovasculares, que estão envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo cerebral, na manutenção da barreira hematoencefálica (BBB) e no suporte metabólico e neurotrófico aos neurônios (ABBOTT *et al.*, 2006; SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Além disso, participam da sinapse “tripartite”, modulando a transmissão sináptica e sendo indispensáveis para o controle da composição iônica, molecular e do pH do ambiente extracelular (ARAQUE *et al.*, 1999; THEODOSIS *et al.*, 2008).

Sabe-se que alterações astrocitárias podem contribuir para o dano oxidativo associado ao diabetes, uma vez que os astrócitos são componentes importantes no sistema de defesa antioxidante encefálico, através da regulação da concentração de glutamato extracelular (ciclo “glutamato-glutamina”) e da produção de compostos antioxidantes, como a glutatona

(COLEMAN *et al.*, 2004; 2010; SIEGEL *et al.*, 2006). Ademais, participam da captação e tamponamento de íons K^+ extracelular através de bombas de Na^+/K^+ e canais presentes em suas membranas capazes de concentrarem K^+ no seu citosol, sendo posteriormente dissipados para a corrente sanguínea por uma ampla área da extensa rede de processos astrocíticos (BEAR *et al.*, 2008; THEODOSIS *et al.*, 2008).

Outra função dos astrócitos é captar a glicose dos vasos sanguíneos e fornecer suporte energético aos neurônios, além de estocá-la na forma de glicogênio para a manutenção da atividade encefálica durante episódios de hipoglicemia ou de alta atividade cerebral (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Entretanto, na hiperglicemia crônica, o excesso de glicose causa danos celulares e microvasculares, principalmente pelo acúmulo de sorbitol intracelular, caracterizado pelo aumento da atividade da via do poliol em resposta a hiperglicemia, afetando o metabolismo e a perfusão cerebral (WESSELS *et al.*, 2008); tornando, assim, os astrócitos também células alvo no DMT1, contribuindo para a encefalopatia associada à doença (COLEMAN *et al.*, 2010).

Corroborando essa idéia, tem sido descrito na literatura a participação dos astrócitos também em doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla, epilepsia, doença de Huntington, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, infecções e episódios hipóxicos/isquêmicos, principalmente envolvendo a liberação de fatores pró-inflamatórios e moléculas neuroativas pelas células astrocíticas, e alterações na recaptação de neurotransmissores (SETH; KOUL, 2008; SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Além disso, estudos têm mostrado a contribuição dos astrócitos para o processo de formação de memórias, modulando a plasticidade neuronal (THEODOSIS *et al.*, 2008). Em algumas áreas cerebrais como hipotálamo, hipocampo e retina, os astrócitos sintetizam e liberam uma molécula neuroativa, o aminoácido D-serina, um importante intermediário da

neurotransmissão glutamatérgica, servindo como um co-agonista de receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) (THEODOSIS *et al.*, 2008; HENNEBERGER *et al.*, 2010). Visto isso, Henneberger e colaboradores (2010) demonstraram que a LTP, o mecanismo eletrofisiológico de consolidação de memória de longo prazo, que age através de receptores glutamatérgicos, depende da liberação de D-serina dos astrócitos para sua facilitação e eficiência. Assim, os astrócitos são elementos chave em todos os processos, fisiológicos ou patológicos, que implicam receptores do tipo NMDA, desde plasticidade sináptica à excitotoxicidade (THEODOSIS *et al.*, 2008).

A expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um tipo de filamento intermediário presente em astrócitos maduros, tem sido frequentemente utilizada como um marcador para a identificação das células astrocíticas em diferentes processos patológicos pela técnica de imunistoquímica ou imunofluorescência (SOFRONIEW, VINTERS, 2010). Contudo, a distribuição celular de GFAP não é uniforme. A proteína é encontrada no corpo celular e nos principais processos astrocíticos, sendo ausente nas ramificações mais distais, os quais carecem de citoplasma e organelas intracelulares, inclusive de filamentos intermediários (THEODOSIS *et al.*, 2008).

Os astrócitos tornam-se reativos na presença de um evento neuropatológico, no intuito de proteger as células do SNC contra agentes infecciosos e células inflamatórias (SOFRONIEW, VINTERS, 2010), ou mediante o processo de neuroplasticidade - induzido por exercício físico ou experiências de aprendizado, por exemplo - para regular o microambiente sináptico em resposta ao aumento da atividade neural (THEODOSIS *et al.*, 2008; VIOLA *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011).

A morfologia dos astrócitos e o grau de expressão da proteína GFAP variam conforme o estado de reatividade celular, sendo esta proporcional à gravidade da lesão ou infecção. Pode se tratar de uma astrogliose reativa moderada inicial, com aumento na expressão de GFAP, porém

com pouca ou nenhuma proliferação de astrócitos; ou de uma astrogliose reativa difusa severa, com pronunciado aumento na expressão de GFAP, acompanhado de hipertrofia do corpo e dos processos celulares, e proliferação de astrócitos com perda dos seus domínios celulares; ou ainda de uma astrogliose reativa severa com formação de cicatriz compacta, uma estreita e densa “barreira” neuroprotetora de células astrocitárias localizada principalmente nas bordas do tecido comprometido (SOFRONIEW, VINTERS, 2010).

Assim, o aumento da expressão da proteína GFAP deve ser cuidadosamente analisado, pois pode indicar eventos como proliferação de astrócitos, hipertrofia ou aumento do número e do comprimento das ramificações dessas células, sendo condizente com o estágio de reatividade astrogliar (SOFRONIEW, VINTERS, 2010; MESTRINER *et al.*, 2011). Em contra-partida, a diminuição da expressão da proteína GFAP pode indicar disfunção ou perda de astrócitos, redução da sua proliferação ou do número e do comprimento de suas ramificações (COLEMAN *et al.*, 2004; SOFRONIEW, VINTERS, 2010).

Os estudos com modelos experimentais de diabetes apontam haver uma reação precoce das células astrocitárias em resposta aguda à hiperglicemia (Lebed *et al.*, 2008; REVSIN *et al.*, 2009). Três dias após a indução do diabetes com STZ, Lebed e colaboradores (2008) verificaram uma redução no número de células marcadas com GFAP no hipocampo desses animais, além de células significativamente menores e menos arborizadas, quando comparados aos animais controles. No entanto, no mesmo estudo, houve uma reversão disso aos 7 e 14 dias de diabetes, com aumento no número de células GFAP+, além das células se tornarem maiores e mais ramificadas, quando comparados aos animais controles.

Entretanto, a resposta crônica das células astrocitárias à hiperglicemia no hipocampo de animais diabéticos parece ser inversa, sendo caracterizada por uma diminuição da expressão de GFAP, uma redução do número de astrócitos e no tamanho dos seus prolongamentos, e tem sido

associada com o prejuízo na plasticidade sináptica e os déficits cognitivos relacionados à progressão do diabetes (COLEMAN *et al.*, 2004; SENNA *et al.*, 2011). Nesse contexto, mais estudos tornam-se necessários para elucidar os efeitos a curto e longo prazo da hiperglicemia sobre as células astrocitárias, bem como o seu envolvimento no prejuízo de aprendizado e memória associado ao DMT1.

1.5 Microglia

Microglia são as células imunes/macrófagos residentes do SNC e possuem a função de proteger o microambiente cerebral e medular de possíveis danos, além de estarem envolvidas no processo de reparação e reorganização de conexões neuronais durante o desenvolvimento (AYOUB; SALM, 2003; SOULET; RIVEST, 2008; NAPOLI; NEUMANN, 2009). Representam aproximadamente 10 a 20% de todas as células gliais, sendo encontradas em maior abundância na substância cinzenta do que na substância branca (SOULET; RIVEST, 2008).

Células microgliais possuem origem mesodérmica, derivando de progenitores mielóides da linhagem monocitária da medula óssea (SOULET; RIVEST, 2008; KETTENMANN *et al.*, 2011). Essas células penetram em todas as regiões do SNC ainda durante o desenvolvimento embrionário, até a completa formação da BBB, se disseminam através do parênquima cerebral e adquirem uma morfologia ramificada, característico das células microgliais residentes (DAVIS *et al.*, 1994; KETTENMANN *et al.*, 2011).

Monócitos e macrófagos presentes na medula óssea e na circulação sanguínea podem ser recrutados para o SNC em condições patológicas para fornecerem suporte à microglia residente, e em alguns casos até adquirirem um fenótipo microglial (LADEBY *et al.*, 2005). Em condições normais, essas células mononucleares são hábeis a penetrar a BBB por meio de um processo

chamado diapedese, atravessando diretamente o citoplasma das células endoteliais, sem ruptura das junções de oclusão. Já nos processos inflamatórios com comprometimento da BBB, as junções de oclusão que unem as células endoteliais se abrem como resultado da ação de citocinas e outros agentes, e, então, essas células podem penetrar no SNC tanto por via transcelular como por via paracelular. Em eventos mais graves como trauma ou isquemia, também é possível haver a penetração de neutrófilos do sangue pela BBB (ABBOTT *et al.*, 2010).

Recentes estudos indicam que mesmo em condições normais, as células da microglia possuem capacidade plástica, apresentando alta motilidade em seus processos, pelos quais torna-se possível examinar todo o seu domínio territorial (NAPOLI; NEUMANN, 2009; KETTENMANN *et al.*, 2011).

As células microgliais podem ser classificadas em três tipos de acordo com seu estado de ativação, adquirindo morfologia característica: microglia de repouso ou ramificada, apresenta corpo celular oval com processos longos e finos contendo delicadas ramificações se projetando radialmente ao soma; microglia ativada ou hipertrófica, apresenta corpo celular aumentado e mais escuro com processos menores, mais espessos e menos ramificados; e microglia reativa ou amebóide, possui corpo celular aumentado e densamente marcado, com nenhum ou poucos processos com aspecto de filopódios (Figura 5) (AYOUB; SALM, 2003).

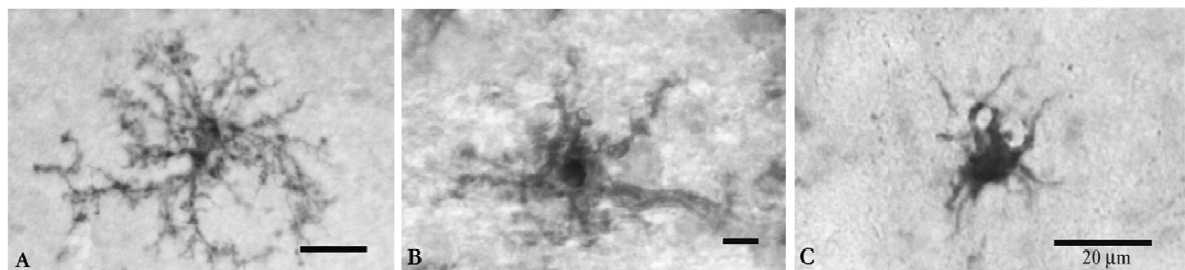


Figura 5. Imagens digitalizadas mostrando as diferentes formas de microglia marcadas com Isolectina-B4: (A) microglia de repouso ou ramificada, (B) microglia ativada ou hipertrófica e (C) microglia reativa ou amebóide (Adaptado de AYOUB; SALM, 2003).

A identificação de células microgliais e a avaliação de sua morfologia podem ser feitas em fatias de tecido de encéfalo de humanos e animais ou em culturas celulares pela marcação específica de uma variedade de moléculas de superfícies ou moléculas intracelulares presentes no citosol dessas células (KETTENMANN *et al.*, 2011). Anticorpos contra Iba-1 (*Ionized calcium binding adapter molecule-1*), uma proteína envolvida na homeostasia do cálcio, tem se mostrado muito útil na visualização de microglia com detalhamento de seus processos, sendo que a sua expressão aumenta com a ativação microglial (SOULET; RIVEST, 2008; KETTENMANN *et al.*, 2011).

Em encéfalos de mamíferos adultos normais, a maioria das células microgliais são ramificadas; porém, após qualquer detecção de sinais de lesão ou disfunção no sistema nervoso, elas se tornam progressivamente ativadas, alterando sua morfologia e adquirindo fenótipo fagocítico (AYOUB; SALM, 2003; LADEBY *et al.*, 2005).

A microglia está envolvida em traumas e acidentes vasculares cerebrais agudos, bem como em doenças inflamatórias e doenças crônicas degenerativas (KIM; VELLIS, 2005; LADEBY *et al.*, 2005; NAPOLI; NEUMANN, 2009). Essas células microgliais, quando ativadas, migram para o sítio da lesão, proliferam e fagocitam células e compostos estranhos (KETTENMANN *et al.*, 2011). Além disso, através da síntese e liberação de moléculas sinalizadoras e tróficas, são capazes de agir como células apresentadoras de antígeno e possuem propriedade imunorreguladora, interagindo com outras células da glia, principalmente os astrócitos, com neurônios e com outras células do sistema imune (STREIT *et al.*, 1999).

Após a detecção de patógenos invasores, sinais de lesão ou disfunção neuronal, as células microgliais ativadas produzem mediadores pró-inflamatórios como NO, interferon- γ (IFN- γ), TNF- α e uma variedade de interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-15), ou também mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 (LADEBY *et al.*, 2005; NAPOLI; NEUMANN,

2009; KIM *et al.*, 2005 e 2010). Os astrócitos parecem ser importantes reguladores e atenuantes das respostas inflamatórias agudas microgliais, uma vez que são capazes de reduzir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e de IL-12 pelas células microgliais, além de liberarem fatores solúveis capazes de induzir a expressão de enzimas antioxidantes pela microglia (KIM *et al.*, 2010).

Além disso, estudos têm mostrado que a ativação das células microgliais e a consequente produção desses mediadores inflamatórios com potenciais neurotóxicos, como as espécies reativas de oxigênio e as citocinas pró-inflamatórias, especialmente a IL-1 β , afetam a neurogênese hipocampal, envolvida no declínio cognitivo e nas funções de aprendizado e memória relacionados com o envelhecimento e com certas neuropatologias, incluindo a encefalopatia diabética (GEMMA *et al.*, 2010; BEAUQUIS *et al.*, 2011; PIAZZA *et al.*, 2011).

Estudos apontam que as alterações microvasculares relacionadas ao diabetes podem levar a um comprometimento da BBB – com aumento da permeabilidade causada por uma diminuição nos níveis das proteínas constituintes das junções de oclusão – do acoplamento neurovascular, e a processos inflamatórios, contribuindo para a disfunção neuronal e para as complicações cognitivas associadas à doença (MOGI; HORIUCHI, 2011; SERLIN *et al.*, 2011).

Atualmente, na literatura, há poucos estudos a respeito de um possível envolvimento direto da microglia na patogênese do diabetes. Valente e colaboradores (2010) mostraram uma maior ativação das células microgliais localizadas ao redor e dentro das placas β amilóides no hipocampo de pacientes diabéticos com doença de Alzheimer, acompanhada por maiores níveis de AGEs, aumento de células positivas para proteína Tau e no número de placas β amilóides, quando comparado a pacientes somente com a doença de Alzheimer em análises *post-mortem*. Havendo uma maior liberação de mediadores potencialmente neurotóxicos pela microglia, isso pode estar possivelmente associado com um sinergismo patológico entre as duas doenças

(VALENTE *et al.*, 2011). No entanto, a literatura carece de mais dados com relação à contribuição da ativação microglial na encefalopatia diabética.

1.6 Enriquecimento Ambiental

O “enriquecimento ambiental” (EA) é um modelo experimental de condição de moradia que consiste em uma associação de exercício físico, interação social e estímulos sensoriais, motores e cognitivos (Figura 6) (LEGGIO *et al.*, 2005; NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2006). Tais estímulos podem causar modificações comportamentais e morfofuncionais neurais, estimulando mecanismos de plasticidade dependentes de experiência, tais como: aumentar as sinapses, a arborização dendrítica, a densidade de espinhos dendríticos no hipocampo e a neurogênese hipocampal, melhorando o desempenho dos animais em testes de aprendizado e memória (NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2004; LEGGIO *et al.*, 2005; BEAUQUIS *et al.*, 2010; DENG *et al.*, 2010; PIAZZA *et al.*, 2011).

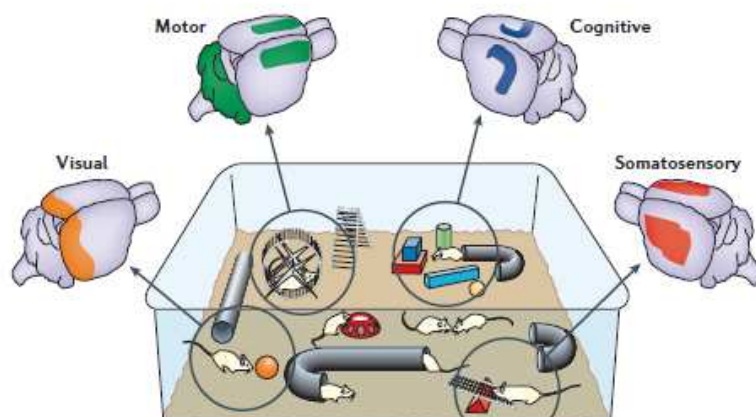


Figura 6. Enriquecimento ambiental e seus possíveis efeitos de estimulação sensorial, visual, cognitiva e motora em diferentes áreas do encéfalo de roedores (NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2006).

Para tanto, os animais são mantidos em caixas ou gaiolas grandes com diversos objetos, tais como: bolas, rampas, escadas, túneis, cubos e rodas que estão à disposição dos animais por um período variável de tempo (KEMPERMANN *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2008; VIOLA *et al.*, 2009; BEAUQUIS *et al.*, 2010; PIAZZA *et al.*, 2011). Uma variedade de condições tem sido utilizada, mas o principal é que o ambiente forneça uma série de oportunidades de estimulação visual, somatosensorial, motora e olfatória (NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2006); outro ponto chave é que proporcione novidade ambiental, através da introdução de objetos novos com texturas diferentes ao EA e da mudança dos objetos de posição, com a finalidade de promover estimulação adicional de memória espacial (PEREIRA *et al.*, 2008; VIOLA *et al.*, 2009; PIAZZA *et al.*, 2011).

Estudos têm mostrado que o EA estimula a neurogênese no GD do hipocampo (KEMPERMANN *et al.*, 1997; BRUEL-JUNGERMAN *et al.*, 2005; BEAUQUIS *et al.*, 2010), uma vez que aumenta a expressão de fatores de crescimento e neurotrofinas, como fator BDNF, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) e IGF-1 em roedores, bem como estimula vias serotoninérgicas do núcleo dorsal e medial da Rafe para o hipocampo (GROTE; HANNAN, 2007). Além disso, mecanismos envolvendo o recrutamento de células T e a ativação de células microgлияis no GD do hipocampo mediada por citocinas associadas com imunidade inata, que são neuroprotetoras, parecem contribuir para o aumento da neurogênese e para a melhora da habilidade de aprendizado e memória espacial em condições de EA (ZIV *et al.*, 2006).

Ademais, o EA tem revelado possuir efeito protetor e terapêutico (ansiolítico) contra eventos estressores do tipo psicogênico e neurogênico, atenuando respostas endócrinas mediadas pelo eixo HPA (FOX *et al.*, 2006), bem como causar efeitos plásticos no hipocampo, aumentando os níveis de sinaptofisina (FRICK; FERNANDEZ, 2003; NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2004;

LAMBERT *et al.*, 2005) e induzindo alterações morfológicas nos astrócitos (VIOLA *et al.*, 2009).

Estudos vêm utilizando o EA como terapia não farmacológica para várias desordens cerebrais como doença de Parkinson, Alzheimer, Huntington, epilepsia, síndrome de Down, (NITHIANANTHARAJAH *et al.*, 2006) hipóxia-isquemia neonatal (PEREIRA *et al.*, 2008) e também na encefalopatia diabética (BEAUQUIS *et al.*, 2010; PIAZZA *et al.*, 2011). E a demonstração de que o EA é capaz de prevenir ou atrasar o início e a progressão de algumas dessas patologias e de suas complicações enfatizam a importância de um melhor entendimento sobre a contribuição e interação dos fatores genéticos e ambientais na patogênese de desordens do SNC, inclusive no diabetes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do enriquecimento ambiental sobre os efeitos causados pelo diabetes no giro denteado do hipocampo através de parâmetros funcionais, fisiológicos e morfológicos em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a funcionalidade da memória espacial dependente de hipocampo entre animais diabéticos expostos ou não ao enriquecimento ambiental através do “teste de reconhecimento de objeto reposicionado”.

2.2.2 Avaliar a locomoção dos animais dos diferentes grupos durante o teste de memória.

2.2.3 Quantificar os níveis de corticosterona sérica por radioimunoensaio nos animais diabéticos expostos ou não a enriquecimento ambiental.

2.2.4 Avaliar a imunorreatividade da proteína sinaptofisina no hipocampo dos animais dos diferentes grupos pela técnica de imunoistoquímica associada à densitometria óptica.

2.2.5 Avaliar a densidade numérica e a ativação dos astrócitos marcados com GFAP pela técnica de imunofluorescência no giro denteado do hipocampo dos animais dos diferentes grupos.

2.2.6 Avaliar a densidade numérica e a ativação das células microgliais marcadas com Iba-1 pela técnica de imunofluorescência no giro denteado do hipocampo dos animais dos diferentes grupos.

3. MÉTODOS E RESULTADOS

3.1 Artigo: **Enriched environment induces beneficial effects on memory deficits and hippocampus cellular plasticity in type 1 diabetic rats.** Francele Valente Piazza, Ethiane Segabinazi, Lígia Aline Centenaro, Patrícia Severo do Nascimento, Matilde Achaval, Simone Marcuzzo.

Artigo submetido à *Neurobiology of Disease*.

Enriched environment induces beneficial effects on memory deficits and hippocampus cellular plasticity in type 1 diabetic rats

Francele Valente Piazza^{a,b}, Ethiane Segabinazi^b, Lígia Aline Centenaro^{a,b}, Patrícia Severo do Nascimento^{a,b}, Matilde Achaval^{a,b}, Simone Marcuzzo^{a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

^bLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Simone Marcuzzo, PhD

Laboratório de Histofisiologia Comparada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: +55 51 33083624 Fax: +55 51 33083092 E-mail address: simone.marcuzzo@ufrgs.br

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) has been associated with long-term complications in central nervous system, besides peripheral common adverse effects, causing neurocognitive dysfunction in the brain. On the other hand, enriched environment (EE) induces mechanisms of experience-dependent plasticity especially in hippocampus, improving the performance of animals in learning and memory tasks. Thus, our objective was to investigate the influence of the EE on memory deficits, locomotion, corticosterone levels, synaptophysin protein immunoreactivity, and density and activation of astrocytes and microglia in the hippocampal dentate gyrus (DG) of type 1 diabetic rats. For this, male Wistar rats, 21 days old, were exposed to the EE or maintained in standard housing (controls, C) for 3 months. At adulthood, C and EE animals were randomly divided and half of them induced to diabetes by streptozotocin, being maintained the respective environmental conditions for each animal groups. Hippocampus-dependent spatial memory was evaluated in all groups in the novel object-placement recognition task, on 41th day after diabetes induction, as well as the general locomotion in the open field at the same test. Serum corticosterone levels were measured in the end of the experiment, contents of synaptophysin was evaluated by immunohistochemistry, and density and activation of both astrocytes and microglia by immunofluorescence in the hilus of the DG in hippocampus. Our results showed that EE was able to prevent or delay the development of memory deficits caused by diabetes in rats, however did not revert the motor impairment observed in group diabetic. There was no significant difference in synaptophysin immunoreactivity among the groups. Furthermore, although the EE did not modify the density and activation of astrocytes in diabetic animals, it attenuated the injurious effect of hyperglycemia over microglial activation, as well as decreased the serum level of corticosterone in diabetic adult rats. Thus, the EE has helped to ameliorate cognitive

comorbidities associated with T1DM, possibly by reducing the hyperactivity of HPA axis and the microglial activation in diabetic animals.

Keywords: Diabetic encephalopathy, Enriched environment, Hippocampus, Memory, Corticosterone, Synaptophysin, Astrocytes, Microglia, Immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune disease that results in the permanent destruction of pancreatic β -cells, with consequent insulin deficiency and hyperglycemia (Gispen and Biessels, 2000; Revsin et al., 2009). T1DM has been associated with long-term complications in peripheral nervous system (PNS), affecting eyes, kidneys, heart, blood vessels and nerves, and also in central nervous system (CNS), causing structural changes in the brain and neurocognitive dysfunction such as impairments in psychomotor skills, attention, information processing speed and learning and memory in humans and animal models of disease (Brands et al., 2005; Wessels et al., 2008; Do Nascimento et al. 2011; Piazza et al., 2011). The development of these complications is dependent on the duration of diabetes and the quality of metabolic control (Gispen and Biessels, 2000).

Although the mechanisms underpinning the diabetic encephalopathy are not completely elucidated, it seems to be result of cellular, molecular and microvascular alterations induced by chronic hyperglycemia, leading to a decrease of cerebral blood flow and metabolism, contributing to the disease-related cognitive disabilities (Gispen and Biessels, 2000; Wessels et al., 2008). The increased flux through the polyol pathway, with intracellular sorbitol accumulation, and the increase production of advanced glycosylation end products (AGEs) precursors secondary to hyperglycemia have been shown to play an important role in the pathogenesis of brain complications (Brownlee, 2005; Sima, 2010). Moreover, studies with diabetic rats have shown neuronal apoptosis, decreased of both dendritic complexity and neurogenesis and vascular area reduction in the dentate gyrus (DG) of the hippocampus (Beauquis et al., 2010), as well as synaptic plasticity deficits like alterations in the content of the presynaptic marker synaptophysin (Nitta et al. 2002; Grillo et al., 2005; Sima et al., 2009) and

long-term potentiation (LTP) impairment in the hippocampus (Kamal et al., 1999; Biessels, 1996). Furthermore, these brain changes are possibly related with higher glucocorticoid levels on diabetes disease (Stranahan et al., 2008; Revsin et al., 2009). Astrocytic and microglial activation in the hippocampus have also been reported to be involved in cognitive function decline, since these cells have a critical role in neuronal activity (Streit et al., 1999; Gemma et al., 2010; Senna et al., 2011). Changes in astrocyte function may contribute to oxidative damage associated with diabetes (Bhardwaj et al., 1998; Coleman et al., 2010), while microglia to production of pro-inflammatory cytokines and decrease of neurogenesis (Kim et al., 2005; Ladeby et al., 2005; Gemma et al., 2010).

Enriched environment (EE) refers to an experimental model of housing condition that consists of a combination of social interaction, motor and sensory stimulation, improving the performance of animals in learning and memory tasks (Nithianantharajah et al., 2006; Leggio et al., 2005; Piazza et al., 2011). Several studies have shown that EE can induce mechanisms of experience-dependent plasticity such as increases hippocampal neurogenesis, synapses, spine density, dendritic branching and synaptophysin protein, as well as promotes morphological changes in astrocytes in the hippocampus (Nithianantharajah et al., 2004; Bruel-Jungerman et al., 2005; Leggio et al., 2005; Viola et al., 2009; Beauquis et al., 2010). EE can also increase growth factor and neurotrophins levels, recruit T cells and active microglia in the hippocampus (Ziv et al., 2006; Grote and Hannan, 2007), besides attenuating endocrine responses via the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis evoked by stressor factors (Fox et al., 2006).

Therefore, the aim of the present study was to investigate the influence of the enriched environment on memory deficits and motor activity, corticosterone levels, synaptophysin protein immunoreactivity, density and activation of both astrocytes and microglia in the hippocampal dentate gyrus in rats submitted to a model of T1DM.

MATERIALS AND METHODS

Animals and differential caging conditions

Male Wistar rats, 21 days old, from our local breeding colony (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) were assigned to two experimental groups: (1) control (C), two rats housed in standard housing (Plexiglas cages – 41 x 34 x 16 cm), and (2) submitted to an enriched environment (EE; 7 animals to cage), both for 3 months. The EE protocols employed consisted of a large home cage (56 x 56 x 56 cm) with 3 different floors connected by ramps, which contained various objects with different textures like toys, tunnels, running wheels, pots, cubes and balls. Objects in the EE were reset in their positions every day, and, in order to stimulate motor, sensory and cognitive functions, the positions were completely rearranged and a new different object were exchanged once a week (Nithianantharajah et al., 2006; Piazza et al., 2011). Cages of both groups were cleaned twice a week. Animals were maintained with free access to food and water, at a temperature around 22° C in a 12 h light:dark cycle. All the procedures for the care and handling of animals were in compliance with current international laws and policies (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No. 85-23, 1985, revised 1996) and with the Brazilian Laws for animal care and ethical use of animals. The study was approved by the Ethical Committee from UFRGS (2010/18434) and all efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals needed.

Experimental groups

In the beginning of the experiment, with 21 days old, the rats were exposed to the enriched environment (EE) or maintained in standard housing (C). At adulthood (66 days old),

control and EE animals were randomly divided and half of them induced to diabetes. Following this, rats were assigned to each group as follows: (1) non-diabetic rats previously exposed to standard housing (NDC); (2) diabetic rats previously exposed to standard housing (DC); (3) non-diabetic rats previously exposed to an enriched environment (NDEE); (4) diabetic rats previously exposed to enriched environment (DEE). The respective environmental conditions (EE or C) were maintained for each group of rats until the end of the experiment. For analyses of hippocampal spatial memory and motor activity were used 7-8 animals per group, and for corticosterone levels, 5-6 animals per group. For immunohistochemistry and immunofluorescence studies, 5-6 animals per group were randomly selected.

Diabetes induction

Type 1 diabetes was induced by a single intravenous injection of streptozotocin (STZ, 50 mg/Kg/mL; Sigma Chemicals Co., USA) dissolved in citrate buffer (pH 4,3) in the DC and DEE groups. Non-diabetic rats (NDC; NDEE groups) were injected only with citrate buffer (1 mL/Kg, i.v.). Before diabetes induction, the animals were weighed and fasted for 6 h. Diabetes was confirmed by using test strips (Performa, Roche[®], Indianapolis, IN, USA) to evaluate blood collected from the tail vein 48 h and 42 days after the STZ injection, following a 6 h morning fasting. Diabetes was defined as a fasting glycemia >300 mg/dL (Rhoden, 2006; Do Nascimento et al., 2011), and this occurred in all animals. A timeline of the experimental design is presented in Figure 1.

Novel Object-Placement Recognition Task (NOPR)

A Novel Object-Placement Recognition Task was used to evaluate hippocampal spatial memory function, which was assessed in the open field apparatus (41 x 41 x 41 cm) in which the floor was divided into 9 squares, on 41th day after diabetes induction. Each animal received one sample trial and a test trial. In the sample trial, animals were placed into in the center of the open field containing two identical plastic bottles placed one in the northwest zone and another in the southwest zone. After 5 min of exploration, rats were returned to its home cages for 50 min. For the consecutive test trial, the southwest object was moved to the east zone, in order to analyze the exploration of the relocated object, and were allowed to the animals explore for more 5 min the objects. After each trial, the apparatus and objects were thoroughly cleaned with a 70% ethanol solution. The exploration of the two objects was filmed with a video camera (DCR-SR47, Sony, Japan) and then was calculated for the sample and test trials, the explorations parameter were defined before. The percentage of preference for exploring the relocated object was quantified as follows: $\text{Exploration time of relocated object} / \text{Sum of exploration of both objects} \times 100$ (Revsin et al., 2009; Piazza et al., 2011).

In the same test, the general locomotion was evaluated in the sample and test trials. The number of crossings from one square to another was counted (Do Nascimento et al., 2011; Piazza et al., 2011; Senna et al., 2011). One day before the memory and motor tasks, the animals were habituated to the same open field for 3 min, however without the objects (Piazza et al., 2011; Senna et al., 2011).

Serum corticosterone assay

The blood samples were obtained individually by puncturing the animal's orbital plexus before transcardiac perfusion, collected in tubes, kept on ice and centrifuged for 15 min at 3000

rpm at 4°C. Serum samples were transferred to clean tubes and stored frozen at -20°C until measurement. Serum corticosterone levels were determined by the MP Biomedicals Radio Immuno Assay (RIA) kit (ICN, Biomedicals Inc., CA) (Rhoden, 2006; Revsin et al., 2009).

Histological procedures

Forty-five days after the diabetes induction, animals were deeply anesthetized with ketamine (90 mg/Kg i.p.) and xylazine (10 mg/Kg i.p.). Heparin (1000 IU; Cristalia, Brazil) was injected into the left cardiac ventricle, and the animals were transcardially perfused through the left ventricle using a peristaltic pump (Milan, Brazil, 30 mL/min) with 300 mL of 0.9% saline solution, followed by 300 mL of a fixative solution 4% paraformaldehyde (Synth, Brazil) diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). The brains were dissected, post-fixed in the same fixative solution at room temperature for 4h and cryoprotected by immersion in 15% and 30% sucrose solution (Synth, Brazil) in PB at 4°C until they sank. Then, the brains were quickly frozen in isopentane (Merck, Germany) cooled in liquid nitrogen and kept in a freezer (-70 °C) for further analyses.

Coronal sections (40 µm thick) of the dorsal hippocampus were obtained using a cryostat (CM1850, Leica, Germany) at -20 °C and serially collected on gelatin coated slides. This area corresponded to a distance of approximately 2.30 to 4.52 mm posterior to the bregma (Paxinos and Watson, 1982). Every sixth section (240 µm apart) was processed for each immunostaining (described below) (Malberg et al., 2000; Veena et al., 2009).

Synaptophysin Immunohistochemistry (IHC)

Sections were fixated in ice cold acetone (10 min) at room temperature, followed by washing in ice cold phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4. The tissues were washed in PBS and pre-incubated with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Aldrich, USA) in PBS, containing 0.1% Triton X-100 (PBS-Tx), during 30 min. Then, samples were incubated with monoclonal mouse anti-SYP (synaptophysin) antibody to detect changes in presynaptic vesicles, an indicator of synaptic plasticity (1:200; Sigma Aldrich, USA) at 4 °C, for 48 h. Sections were washed in PBS and the endogen peroxidase was inactivated with 3% hydrogen peroxide (Synth, Brazil) dissolved in PBS during 30 min. After washing in PBS-Tx, sections were incubated with the secondary antibody rabbit anti-mouse IgG conjugated with peroxidase (1:500, Sigma Aldrich, USA) at room temperature for 2 h. The immunohistochemical reaction was revealed using a solution of 0.06% 3,3-diaminobenzidine (DAB; Sigma Aldrich, USA) and 10% hydrogen peroxide for 5 min. Finally, the sections were rinsed in PBS, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and covered with synthetic canada balsam (Chemical Reaction, Brazil) and coverslips.

Negative control was prepared omitting the primary antibody and replacing it with PBS. In order to minimize differences in the staining and background, all histological procedures were performed at the same time and using the same solutions (Xavier et al., 2005; Viola et al., 2009).

SYP optical densitometry

Images of SYP immunoreactivity in diaminobenzidine-stained brain sections was evaluated by means of regional semi-quantitative optical densitometry (OD) (Viola et al. 2009; Xavier et al. 2005). Images from DG of the dorsal hippocampus were taken using an Optiphot-2 microscope (200x, Nikon, Japan) coupled to a CMOS camera (518CU, Micrometrics, USA) and Image Pro Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA). All lighting conditions and

magnifications were held constant. From each animal, 10 images were analyzed (5 sections per animal, both left and right sides), 6 animals per group. For analysis were converted to an 8-bit gray scale (0–255 gray levels). Picture elements (pixels) employed to measure optical density were obtained from 3 squares measuring $1153 \mu\text{m}^2$ each one (area of interest, AOI), overlaid in the hilus of the DG of the hippocampus (Ferreira et al. 2011). Background correction was performed according to Xavier and cols. (2005). The following formula was used for OD: $\text{OD}(x,y) = -\log[(\text{INT}(x,y) - \text{BL}) / (\text{INC} - \text{BL})]$. Where “OD” is the optical density; “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.

Iba-1 and GFAP Immunofluorescence (IF)s

In the remaining sections, fixation was done also with ice cold acetone and antigen retrieval was performed by heating sections in 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) in a thermostatic bath at 92 °C for 20 minutes. The sections were washed in PBS and tissue block with BSA were followed as described above. Sections were incubated with the primary monoclonal rabbit anti-Iba-1 (ionized calcium binding adapter molecule 1) antibody to detect microglial cells (1:500; Wako Chemicals, USA) or polyclonal rabbit anti-GFAP (glial fibrillary acid protein) antibody to detect astrocytes (1:1000; Dako, UK) at 4 °C, for 48 h. Sections were washed in PBS-Tx and incubated with secondary antibody anti-rabbit Alexa Fluor 555 (1:500, Molecular Probes, Invitrogen, USA) at room temperature, for 1 h. Then, sections were washed in PBS and the slides covered with aqueous mounting medium (FluorSave, Calbiochem, Germany) and coverslips. Primary antibody was omitted in negative controls.

GFAP+ astrocytes and Iba-1+ microglia quantification

A confocal microscope (Olympus FV1000) was used to visualize the fluorescent immunostaining (excitation wavelength of 555 nm) of the sections. Images from the DG of the hippocampus (400x) were acquired by z-axis analysis in a series of stacks (GFAP, x and y: 317.33 μm , z: 1.38 μm each; Iba-1, x and y: 317.33 μm , z: 1.42 μm each).

Numerical density of GFAP+ astrocytes and Iba-1+ microglia in the hilus of the DG was estimated using Image Pro Plus Software 6.0. For this, an AOI square of 24260.36 μm^2 was overlaid in the region of interest and the cells located inside this square or intersected by their upper and/or right edges were counted. All obvious unspecific dyes and not clearly identifiable astrocytes or microglia were excluded from analysis. From each animal, 10 images were analyzed (5 sections per animal, both left and right sides), 5-6 animals per group (Viola et al., 2009; Ferreira et al. 2011; Mestriner et al., 2011).

GFAP+ astrocytes and Iba-1+ microglia density (number of cells/ mm^3) was determined per image according to the stereological procedure previously described (Mestriner et al., 2011): $AD = (CEL_n / VOI)$, where: AD: density of GFAP+ astrocytes or Iba-1+ microglia; CEL_n : mean of cells (astrocytes or microglia) counted in the interested volume; VOI: interested volume (obtained from AOI area X z-thickness stack X number of stacks).

In addition to density, the total area occupied by soma and astrocytic or microglial processes was determined to reveal a possible cellular activation. All images (the same 10 images from each animal, with an area of 90889.67 μm^2 each one containing the region of interest) were turned into binary (black and white) and a single threshold value was established for each staining, one for the GFAP+ astrocytes and another for the Iba-1+ microglia. Then, each threshold was kept constant for all animal groups and was used to measure the total percentage

area (%) occupied by soma and astrocytic or microglial processes according to the procedure previously described (Centenaro et al., 2011).

Statistical analysis

The data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) with enriched environment and diabetes as independent variables. When there were statistically significant F values ($p < 0.05$), the Student-Newman-Keuls *post hoc test* was used. Statistica 6.0 software package (StatSoft, Inc., USA) was used for the statistical analysis. All data are represented by the mean \pm standard error of mean (SEM).

RESULTS

Serum corticosterone levels

To characterize the basal activity of the HPA system in the different groups, blood samples were taken for hormone concentration measurement at the end of the experiment. Two-way ANOVA showed significant main effects of the diabetes x EE interaction ($F(1,19)=7.02$; $p < 0.05$) and EE factor ($F(1,19)=4.58$; $p < 0.05$) over the serum corticosterone levels. The Student–Newman–Keuls *post hoc test* revealed a significant increase in the serum level of corticosterone in the DC group (783.36 ± 65.98 ng/mL) when compared to the other groups (NDC: 532.51 ± 67.25 ; NDEE: 563.91 ± 29.33 ; DEE: 488.51 ± 77.21 ng/mL; $p < 0.05$), showing a beneficial effect of the EE in reducing corticosterone levels in diabetic group.

Spatial memory (NOPR) and locomotion analysis

The results showed that diabetic rats present memory deficit in the Novel Object-Placement Recognition Task and that enriched environment prevents/attenuates this deficit. Two-way ANOVA revealed significant main effects of the diabetes x EE interaction ($F(1,26) = 7.50$; $p=0.01$) and EE factor ($F(1,26) = 10.02$; $p<0.01$). In the sample trial, the time percentages for exploration of both objects were similar in all the 4 groups (NDC: 52.44 ± 5.85 ; DC: 47.58 ± 7.76 ; NDEE: 51.19 ± 5.63 ; DEE: $41.35\pm 9.00\%$; $p > 0.05$, expressed as percentage of preference for the object that was relocated in the test trial, $n=7-8$ per group). In the test trial, however, Student–Newman–Keuls post hoc test revealed a significant decrease in the percentage of preference for exploring the relocated object in the DC group when compared to the other groups ($p < 0.05$) (Fig. 2). The EE caused a beneficial effect in the spatial memory because the DEE group spent more time exploring the relocated object, compared to the DC group.

Analyzing the locomotion in the different groups, two-way ANOVA showed significant main effect of the diabetes factor in the sample trial ($F(1,26) = 21.63$; $p<0.001$) and in the test trial ($F(1,26) = 65.76$; $p<0.001$). Rates of locomotion were lower in the diabetic groups when compared to non-diabetic groups in the sample and test trials. Although locomotion was lower in the diabetic rats, EE did not alter this parameter. Furthermore, in the test trial Student–Newman–Keuls post hoc test showed that the NDEE group had a greater rate of locomotion in the open field than NDC group. Results are shown in Table 1.

SYP immunoreactivity

ANOVA applied to the densitometric measurements of SYP immunoreactivity in the hilus of the DG of the hippocampus revealed no significant differences among the groups ($p>0.05$). Results and images from the groups are shown in Fig. 3.

Quantification of GFAP+ astrocytes and Iba-1+ microglia

Analysis of GFAP+ astrocytes density in the hilus of the DG showed significant main effects of the diabetes x EE interaction ($F(1,20) = 8.63$; $p < 0.01$) and EE factor ($F(1,20) = 6.63$; $p < 0.05$). The Student–Newman–Keuls post hoc test revealed a significant decrease in the density of astrocytes in the DC, NDEE and DEE groups when compared to the NDC group ($p < 0.01$) (Fig. 4b). In addition, ANOVA applied to the quantification of the total percentage area (%) occupied by soma and astrocytic processes revealed no significant differences among the groups ($p > 0.05$) (Fig. 4c).

Moreover, analysis of Iba-1+ microglia density in the hilus of the DG showed significant main effect of the diabetes factor ($F(1,18) = 38.67$; $p < 0.001$) and EE factor ($F(1,18) = 4.55$; $p < 0.05$). The Student–Newman–Keuls post hoc test revealed a significant decrease in the density of microglia in the diabetic groups (DC and DEE), when compared to non-diabetic groups (NDEE and NDC) ($p < 0.01$), besides a reduction in the NDEE compared to NDC group ($p < 0.05$) (Fig. 5b). In addition, ANOVA applied to the quantification of the total percentage area (%) occupied by soma and microglial processes showed significant effect of the diabetes x EE interaction ($F(1,18) = 15.37$; $p = 0.001$). The Student–Newman–Keuls post hoc test revealed an increase in the % of area occupied by microglia in the DC and NDEE groups, compared to the NDC group ($p < 0.05$) (Fig. 5c). The EE caused a beneficial effect decreasing the microglial activation in the DEE group, similar to the NDC group, when compared to the group DC ($p < 0.05$).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In the present study, we showed that enriched environment prevented memory deficit in diabetic rats, which was accompanied by decrease in the serum level of corticosterone and by attenuation of the microglial activation in the dentate gyrus of hippocampus.

Enriched environment has been shown to produce several beneficial effects in the brain. In fact, EE improve the recovery from neurological damage, such as those caused by global or focal ischemia, traumatic brain injuries, neonatal anoxia, and neurological and neurodegenerative diseases, by enhancing, preventing or attenuating motor and cognitive impairments (Will et al., 2004; Nithianantharajah et al., 2006; Pereira et al., 2008).

Ours findings in the NOPR task, designed to evaluate hippocampus-dependent spatial memory, confirm the results of other previous studies (Revsin et al., 2009; Piazza et al., 2011; Senna et al., 2011) that also showed that diabetic-control animals spend less time exploring the relocated object, indicating that T1DM cause spatial memory deficit. Additionally, we observed a positive effect of EE preventing/attenuating this impairment caused by diabetes, as shown by higher performance of diabetic rats reared in the EE (DEE group) than DC group in the NOPR task. Similar effect has also been demonstrated by physical exercise (Senna et al., 2011) and by administration of the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone (Revsin et al., 2009).

Hyperglycemia associated to diabetes induces a neuronal death by increase oxidative stress (Tuzcu et al., 2006), as well as by cause a reduction in neurogenesis in the DG of the hippocampus (Beauquis et al., 2010), and synaptic plasticity and LTP impairments (Kamal et al., 1999; Biessels, 1996; Grillo et al., 2005; Sima et al., 2009). In contrast, the EE improves these mechanisms of plasticity in the hippocampus (Nithianantharajah et al., 2004; Bruel-Jungerman et al., 2005; Leggio et al., 2005; Beauquis et al., 2010), in addition to increase growth factor and neurotrophins levels, as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF-2) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (Grote

and Hannan, 2007; Beauquis et al., 2010). These neuroprotector mechanisms induced by EE may partly explain the enhancement in spatial memory found in the diabetic animals.

Furthermore, studies have reported that poorly controlled diabetes display hyperactivity of the HPA axis, leading to elevated circulating adrenal glucocorticoids levels in humans and in rodents with experimental diabetes, and may contribute to cognitive deficits induced by hyperglycemia (Desrocher et al., 2004; Messier, 2005; Stranahan et al., 2008; Revsin et al., 2009). Here we observed a significant increase in the serum level of corticosterone in the diabetic group when compared to all others, indicating the HPA axis hyperactivity. Moreover, EE attenuated this parameter in diabetic rats, since the serum corticosterone level was similar to the control group. Possibly, the serum corticosterone reduction can have contributed to higher performance of DEE group than DC group in the NOPR task, effect similar to that previously demonstrated by administration of the glucocorticoid receptor antagonist and the cognitive normalization in diabetic mice (Revsin et al., 2009). These results are also in according to others that showed a decrease in the endocrine responses via HPA axis induced by stress and a cognitive improvement in behavioral test in animals exposed to EE (Morley-Fletcher et al., 2003; Benaroya-Milshtein et al., 2004; Laviola et al., 2004; Fox et al., 2006).

Diabetic rats decreased the general locomotion in the sample and test trials when compared to non-diabetic rats, as previously described (Revsin et al., 2009; Do Nascimento et al., 2011; Piazza et al., 2011; Senna et al., 2011), evidencing motor disabilities caused by this disease, possibly related to decrease of dopamine production and neuronal death in the ventral tegmental area and substantia nigra pars compacta (Do Nascimento et al., 2011). Nevertheless, the EE protocol used in our study was not able to prevent or attenuate this motor impairment induced by diabetes, in contrast with what have been reported about treadmill training (Do Nascimento et al., 2011).

Besides, there was a significant increasing in the number of crossed squares in the open field by the enriched healthy group in test trial, as compared to control group. Our results are in agreement with Benaroya-Milshtein et al. (2004) that observed a decrease of anxiety and increase in exploratory activity caused by EE in elevated plus-maze, demonstrating that enriched healthy animals are more active than controls. However, our results are in contrast with others that showed that EE decreases locomotion in rodents in the open field, suggesting the beneficial effects on behavioral despair and better habituation to a novel environment (Larsson et al., 2002; Hattori et al., 2007; Brenes et al., 2009). These discrepancies in the results were possibly due to differences in EE protocols, species and age of the animal models.

Studies have shown that diabetes causes cellular and synaptic plasticity impairment, including alterations in the content of the presynaptic marker synaptophysin (SYP) (Nitta et al., 2002; Beauquis et al., 2010). In fact, the treatment with glucocorticoids, as well as the high levels of glucocorticoids induced by hyperglycemia, increased SYP expression in CA1, CA3 and DG of hippocampus in animals with 5 weeks of diabetes by radioimmunocytochemical labeling (Grillo et al., 2005). Nevertheless, other studies demonstrated a decrease of the SYP protein accompanied by a reduction in BDNF levels and memory impairment in diabetic rat brains with 4 weeks (Nitta et al. 2002) and with 4 months of disease (Sima et al., 2009) by immunoblotting. On the other hand, there is a strong agreement in the literature showing that EE enhances synaptic plasticity, increasing SYP expression in multiple regions of the brain, including in hippocampus, using mainly an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Frick and Fernandez, 2003; Nithianantharajah et al., 2004; Lambert et al., 2005). In our study we evaluated the effect of 45 days of diabetes and 3 months of total exposure to EE over SYP immunoreactivity, and neither diabetes nor EE altered significantly the SYP expression measured by semi-quantitative optical densitometry in the hilus of the DG of hippocampus. This may be a result of different methods

for evaluation of SYP used among the studies, and their respective sensibilities (Calhoun et al, 1996). In addition, different hippocampal subregions were analysed in these studies, possibly explaining the divergent results.

Damage to the CNS elicits the activation of both astrocytes and microglia (Streit et al. 1999). Studies have reported the possible involvement of astrocytes dysfunction in several neurodegenerative disorders (Seth and Koul, 2008; Sofroniew and Vinters, 2010), as well as in cognitive function decline associated with diabetes (Coleman et al., 2004; Revsin et al., 2009; Senna et al., 2011). This is because these cells play critical roles in brain homeostasis, regulating synaptic plasticity and participating to the process of formation of memories (Henneberger et al., 2010; Sofroniew and Vinters, 2010). Furthermore, changes in astrocyte function may contribute to oxidative damage associated with hyperglycemia, by decrease the production of antioxidant compounds (Baydas et al., 2003; Coleman et al., 2010).

The results showed a decrease of GFAP⁺ astrocytes density in the hilus of the DG of hippocampus in all the experimental groups comparing to NDC group: both diabetic groups (DC and DEE), as well as in NDEE group. However, all the groups had the same total % area occupied by GFAP⁺ soma and astrocytic processes. Then, since the local decrease of cell number coincide spatially with the same % area occupied by GFAP expression, we assume that these astrocytes suffered an increment in their GFAP⁺ processes, an indicative of cellular hypertrophy (Estrada et al., 2012). A reduction in the GFAP⁺ astrocytes number may indicate cell loss or dysfunction, or a decrease in its proliferation, while astrocytic processes hypertrophy may indicate cellular reactivity (Olabarria et al., 2010; Sofroniew and Vinters, 2010).

The decrease of GFAP immunoreactivity and also its protein content expression by immunoblotting has been demonstrated in the hippocampus of diabetic animals probably as a chronic consequence of hyperglycemia (Coleman et al. 2004 and 2010; Sima et al., 2009; Senna

et al., 2011). These has been related with disruptions in the BBB and abnormal neurovascular coupling, changes in LTP and learning and memory impairment in diabetic patients and experimental model of disease (Coleman et al. 2010; Mogi et al., 2011; Serlin et al., 2011; Senna et al., 2011). Nevertheless, in this study, there was no difference in % area occupied by GFAP expression among the groups, but a cellular GFAP increment. Supporting our results, Estrada et al. (2012) also showed the occurrence of glial activation arising from pilocarpine dose-dependent astrocytic cytoskeletal hypertrophy (by Sholl's concentric circles method) and loss of GFAP+ astrocytes density in the hilus of the DG of hippocampus in a rat model for epileptogenesis, demonstrating that similar glial morphological responses can be involved in diabetes and epilepsy.

Another finding in our study was that the EE also induced astrocytic activation in the healthy group (NDEE) hilus. This confirm in part the results of Viola et al. (2009) that showed that 8 weeks of EE was able to promote morphological changes in astrocytes, evidenced by an increase in the ramification of their processes measured by the Sholl concentric circles method, leading astrocytes to acquire a more stellate morphology in the CA1 region of the hippocampus of healthy mice. In addition, in this present study, the EE did not modify the astrocytes density and activation in the DEE group compared to the DC group, in contrast with the increase of astrocytic immunoreactivity caused by physical exercise protocol in the stratum radiatum of the CA1 in diabetic rats (Senna et al., 2011).

Microglia resides in the healthy CNS and responds to changes in the cerebral microenvironment, reacting swiftly to pathological events (Ladeby et al., 2005). Through their synthesis of toxic and trophic molecules and their immunoregulatory properties, studies have shown that the activation of microglia is involved in acute CNS injury and stroke, as well as inflammatory and neurodegenerative diseases (Kim and Vellis, 2005; Ladeby et al., 2005; Napoli

and Neumann, 2009), producing pro-inflammatory cytokines and interacting with other glial cells, mainly astrocytes, with neurons and other cells of the immune system (Streit et al., 1999; Kim et al., 2010).

In contrast with several studies that have been developed about astrocytes dysfunction and their contribution to the complications of the diabetes in the CNS, almost nothing has been described in the literature regarding the involvement of microglia specifically in diabetic encephalopathy. Our findings revealed a decrease of Iba-1+ microglia density in the hilus of the DG in both diabetic groups when compared to non-diabetics, besides a reduction also in healthy animals exposed to EE (NDEE group) compared to the control (NDC) group. Despite this, there was a higher % of area occupied by Iba-1+ expression in the DC and NDEE groups, compared to DEE and NDC groups, indicating a possibly hypertrophy of cell bodies and processes in these groups, characteristic of microglial activation (Ayoub and Salm, 2003; Estrada et al., 2012). This cellular activation in the DC group can be caused by production of pro-inflammatory cytokines by microglia associated with the diabetic encephalopathy, while in the NDEE group by production of anti-inflammatory cytokines (Ziv et al., 2006; Gemma et al., 2010; Valente et al., 2010). In this way, EE attenuated this cellular hypertrophy and reactivity in diabetic rats, since the microglial activation in the DEE group was similar to the NDC group.

Supporting our results, Valente et al. (2010) showed a major microglial activation associated with increased number of extracellular aggregates of the amyloid β peptide, Tau-positive cells and higher AGEs levels in post-mortem analysis of diabetic patients brain with Alzheimer's disease (AD), compared to those only with AD, suggesting pathological synergism of both pathologies. On the other hand, Ziv et al. (2006) demonstrated that the recruitment of T cells and the activation of microglia in the hilus of the DG of the hippocampus by cytokines associated with adaptive immunity, which are neuroprotective, are associated with enhancement

in hippocampal neurogenesis and in spatial learning abilities induced by EE in rats, since microglia are also capable of producing a number of growth factors including IGF-1 and BDNF (Ziv et al., 2006; Gemma et al., 2010). This may explain the increase of microglial activation observed in the NDEE group compared to NDC group, besides attenuation of EE on injurious effect of hyperglycemia over microglial activation in the DEE group compared to DC group. Furthermore, the major microglial activation observed in the DC group in this study may, possibly, be associated with the worst performance of this group in memory spatial task caused by the diabetic encephalopathy.

Another possibility is that changes in astrocytes could be correlated with observations on microglial activation in DC group, preceding neuronal damage, similarly the studies involving epilepsy (Faustmann et al., 2003; Estrada et al., 2012). It has been shown that chronic microglial reactivity can produce astrocytic dysfunction like cell death, retraction of foot processes and loss of aquaporin-4 and connexins, which are crucial for regulation of neuronal oscillations and brain homeostasis (Faustmann et al., 2003; Kang et al., 2006; Sofroniew and Vinters, 2010).

Glial cell changes have been implicated in many pathological and beneficial plasticity conditions. This was the first study involving synaptophysin levels and astrocytic and microglial activation on diabetes and on concomitant therapeutic effects of EE. All the results presented in this study demonstrate the plasticity inherent of the glial cells and how this may be specific to condition studied. The results about glial cell alterations should be analyzed together rather than isolated effects, and must be studied with the aid of other morphological and biochemical parameters, as well as in association to other cells and mechanisms in the CNS, as neurogenesis.

In conclusion, the EE attenuated the injurious effect of hyperglycemia over microglial activation, as well as decreased the serum level of corticosterone in diabetic adult rats, preventing the decline of the performance of these animals in the spatial memory test. These findings

suggest that enriched environment is able to prevent and/or delay the development of memory deficits caused by diabetes in rats, possibly by attenuate the HPA axis hyperactivity and the microglial activation in diabetic rats, helping to ameliorate cognitive comorbidities associated with disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the members of Laboratory of Comparative Histophysiology, Henrique B. Biehl for their assistance with confocal microscopy (Electron Microscopy Center of UFRGS), and for the financial support provided by CNPq, FAPERGS, UFRGS and Matilde Achaval, MD, PhD, researcher of CNPq.

REFERENCES

Ayoub AE, Salm AK. Increased morphological diversity of microglia in the activated hypothalamic supraoptic nucleus. *J Neurosci* 2003; 23: 7759–66.

Baydas G, Nedzvetskii VS, Tuzcu M, Yasar A, Kirichenko SV. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 2003; 462: 67–71.

Beauquis J, Roig P, Nicola AF, Saravia F. Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS ONE* 2010; 5: 1-12.

Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, Yaniv I, Pick CG. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 1341–347.

Bhardwaj SK, Sharma P, Kaur G. Alterations in free radical scavenger system profile of type I diabetic rat brain. *Mol Chem Neurobiol* 1998; 35: 187–202.

Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1996; 45: 1259-66.

Brands AMA, Biessels GJ, Haan EHF, Kappelle LJ, Kessels RPC. The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2005; 28: 726-35.

Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res* 2009; 197: 125–37.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615–25.

Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 513–21.

Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol.* 1996; 25: 821-8.

Centenaro LA, Jaeger MC, Ilha J, Souza MA, Kalil-Gaspar PI, Cunha NB, Marcuzzo S, Achaval M. Olfactory and respiratory lamina propria transplantation after spinal cord transection in rats: Effects on functional recovery and axonal regeneration. *Brain Res* 2011; 1426: 54 – 72.

Coleman ES, Judd RL, Hoel J, Dennis J, Posner P. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia* 2004; 48: 166–78.

Coleman ES, Dennis JC, Braden TD, Judd RL, Posner P. Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 and 8 weeks of diabetes duration. *Brain Res* 2010; 1306: 131–41.

Desrocher M, Rovet J. Neurocognitive correlates of type 1 diabetes mellitus in childhood. *Child Neuropsychol* 2004; 10: 36–52.

Do Nascimento PS, Lovatel GA, Barbosa S, Ilha J, Centanaro LA, Malysz T, Xavier LL, Schaann BD, Achaval M. Treadmill training improves motor skills and increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta in diabetic rats. *Brain Res* 2011; 1382:173-80.

Estrada FS, Hernández VS, López-Hernández E, Corona-Morales AA, Solís H, Escobar A, Zhang L. Glial activation in a pilocarpine rat model for epileptogenesis: A morphometric and quantitative analysis. *Neurosci Lett* 2012; 514: 51– 56.

Faustmann PM, Haase CG, Romberg S, Hinkerohe D, Szlachta D, Smikalla D, Krause D, Dermietzel R. Microglia activation influences dye coupling and Cx43 expression of the astrocytic network. *Glia* 2003; 42:101–8.

Ferreira AFB, Real CC, Rodrigues AC, Alves AS, Britto LRG. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, bdnf-independent hippocampal plasticity. *Brain Res* 2011; 1425:111–22.

Fox C, Merali Z, Harrison C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav Brain Res* 2006; 175: 1–8.

Frick KM, Fernandez SM. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiol of Aging* 2003; 24: 615–26.

Gemma C, Bachstetter AD, Bickford PC. Neuron-microglia dialogue and hippocampal neurogenesis in the aged brain. *Aging Dis* 2010; 1: 232–44.

Gispén WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 2000; 23: 542–49.

Grillo CA, Piroli GG, Wood GE, Reznikov LR, McEwen BS, Reagan LP. Immunocytochemical analysis of synaptic proteins provides new insights into diabetes-mediated plasticity in the rat hippocampus. *Neuroscience* 2005; 136: 477–86.

Grote HE, Hannan AJ. Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34, 533–45.

Hattori S, Hashimoto R, Miyakawa T, Yamanaka H, Maeno H, Wada K, Kunugi H. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behav Brain Res* 2007; 180: 69-76.

Henneberger C, Papouin T, Oliet HR, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 2010; 463: 232–37.

Kang TC, Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Won MH, Kim DW, Choi SY, Kwon OS. Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. *Glia* 2006; 54: 258-71.

Kamal A, Biessels GJ, Urban IJA, Gispen WH. Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocindiabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression. *Neuroscience* 1999; 90: 737–45.

Kim SU, Vellis J. Microglia in Health and Disease. *J Neurosci Res* 2005; 81:302–13.

Kim JH, Min KJ, Seol W, Jou I, Joe EH. Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. *J Neurochem* 2010; 115: 1161-71.

Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Rev* 2005; 48: 196– 206.

Lambert TJ, Fernandez SM, Frick KM. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem* 2005; 83: 206–16.

Larsson F, Winblad B, Mohammed AH. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73: 193-207.

Laviola G, Rea M, Morley-Fletcher S, Di Carlo S, Bacosi A, De Simone R, Bertini M, Pacifici R. Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *Eur J Neurosci* 2004; 20:1655–64.

Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res* 2005; 163: 78–90.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20: 9104-10.

Messier C. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 26–30.

Mestriner RG, Pagnussat AS, Boisserand LSB, Valentim L, Netto CA. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol* 2011; 227: 53–61.

Mogi M, Horiuchi M. Neurovascular coupling in cognitive impairment associated with diabetes mellitus. *Circ J* 2011; 75: 1042 - 48.

Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur J Neurosci* 2003;18: 3367–74.

Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 2009; 158: 1030–38.

Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiol Learn Mem* 2004; 81: 200–10.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 697 – 709.

Nitta A, Murai R, Suzuki N, Ito H, Nomoto H, Katoh G, Furukawa Y, Furukawa S. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. *Neurotoxicol Teratol* 2002; 24: 695–701.

Olabarria M, Noristani HN, Verkhatsky A, Rodriguez JJ. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* 2010; 58: 831–38.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press, 1982.

Pereira LO, Strapasson ACP, Nabinger PM, Achaval M, Netto, CA. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia–ischemia. *Brain Res* 2008; 1218: 257 – 66.

Piazza FV, Pinto GV, Trott G, Marcuzzo S, Gomez R, Fernandes MC. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behav Brain Res* 2011; 217:16–20.

Revsin Y, Rekers NV, Louwe MC, Saravia FE, Nicola AF, Kloet ER, Oitz MS. Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin- induced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34: 747–58.

Rhoden EL, Rhoden CR. *Princípios e técnicas em experimentação animal*. Porto Alegre: UFRGS, 2006.

Senna PN, Ilha J, Baptista PPA, Do Nascimento PS, Leite MC, Paim MF, Gonçalves CA, Achaval M, Xavier LL. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab Brain Dis* 2011; 26: 269–79.

Serlin Y, Levy J, Shalev H. Vascular pathology and blood-brain barrier disruption in cognitive and psychiatric complications of type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Psychiatry Neurol* 2011; 2011: 609202, 1- 10.

Seth P, Koul N. Astrocyte, the star avatar: redefined. *J Biosci* 2008; 33: 405–21.

Sima AAF, Zhang W, Muzik O, Kreipke CW, Rafols JA, Hoffman WH. Sequential abnormalities in type 1 diabetic encephalopathy and the effects of C-peptide. *Rev Diabet Stud* 2009; 6: 211–22.

Sima AAF. Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol* 2010; 47:279–93.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 7–35.

Stranahan AM, Arumugam TV, Cutler RG, Lee K, Egan JM, Mattson MP. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* 2008; 11: 309-17.

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 1999; 57: 563 - 81.

Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *Eur J of Pharmacol* 2006; 537: 106–10.

Valente T, Gella A, Fernández-Busquets X, Unzeta M, Durany N. Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 67–76.

Veena J, Srikumar BN, Mahati K, Bhagya V, Raju TR, Rao BSS. Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats. *J Neurosci Res* 2009; 87: 831–43.

Viola GG, Rodrigues L, Américo JC, Hansel G, Vargas RS, Biasibetti R, Swarowsky A, Goncalves CA, Xavier LL, Achaval M, Souza DO, Wessels AM, Scheltens P, Barkhof F, Heine RJ. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res* 2009; 1274: 47–54.

Wessels AM, Scheltens P, Barkhof F, Heine RJ. Hyperglycaemia as a determinant of cognitive decline in patients with type 1 diabetes. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 88–96.

Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990–2002). *Prog Neurobiol* 2004; 72: 167–82.

Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Da Cunha C, Deonizio JMD, Netto CA, Achaval M. 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 Protoc* 2005; 16: 58–64.

Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 2006; 9: 268-75.

Legends and Table

Fig. 1. Schematic representation of the experimental design.

Fig. 2. Percentage of preference for the relocated object during the test trial in different groups; * $p < 0.05$ comparing the DC *vs.* all other groups). Two-way ANOVA + Student-Newman-Keuls post hoc test. Data were expressed as mean \pm S.E.M.

Fig. 3. Effects of diabetes and EE on SYP in the hippocampus. (A) Digital images of coronal sections of the dentate gyrus stained for SYP. (B) Optical density (OD) measurement of SYP immunoreactivity in the hilus of the DG of the hippocampus in different groups; Two-way ANOVA showed there were no differences among the groups ($p > 0.05$). Data were expressed as mean \pm S.E.M. Scale bar = 50 μ m.

Fig. 4. Effects of diabetes and EE on quantification of GFAP+ astrocytes in the hippocampus. (A) Digital images of coronal sections of the dentate gyrus stained for GFAP immunofluorescence. (B) Density (number of astrocytes/ mm^3). (C) % of area occupied by astrocytes in the hilus of the DG of the hippocampus in different groups; * $p < 0.01$ compared to NDC group. Two-way ANOVA + Student-Newman-Keuls post hoc test. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Scale bar = 40 μ m.

Fig. 5. Effects of diabetes and EE on quantification of Iba-1+ microglia in the hippocampus. (A) Digital images of coronal sections of the dentate gyrus stained for Iba-1 immunofluorescence. (B) Density (number of microglia/ mm^3) (* $p < 0.01$ *vs.* NDC and NDEE, # $p < 0.05$ compared to NDC).

(C) % of area occupied by microglia (* $p < 0.05$ compared to NDC, # $p < 0.05$ vs. DEE) in the hilus of the DG of the hippocampus in different groups; Two-way ANOVA + Student-Newman-Keuls post hoc test. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Scale bar = 40 μ m.

Table 1. Locomotion in the different groups. Values expressed as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. NDC and NDEE, # $p < 0.05$ compared to NDC group. Student-Newman-Keuls post hoc test.

	NDC	DC	NDEE	DEE
<i>Sample trial</i>				
Number of crossed squares	27.43 \pm 5.49	14.50 \pm 2.64*	36.87 \pm 5.00	12.43 \pm 1.36*
<i>Test trial</i>				
Number of crossed squares	34.43 \pm 6.02	12.12 \pm 1.42*	47.25 \pm 3.72#	10.43 \pm 2.02*

Figure 1

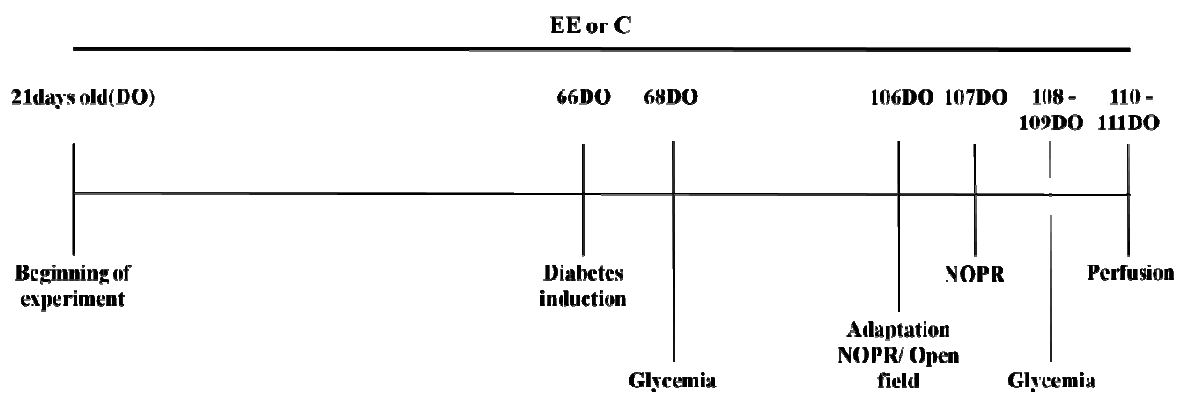


Figure 2

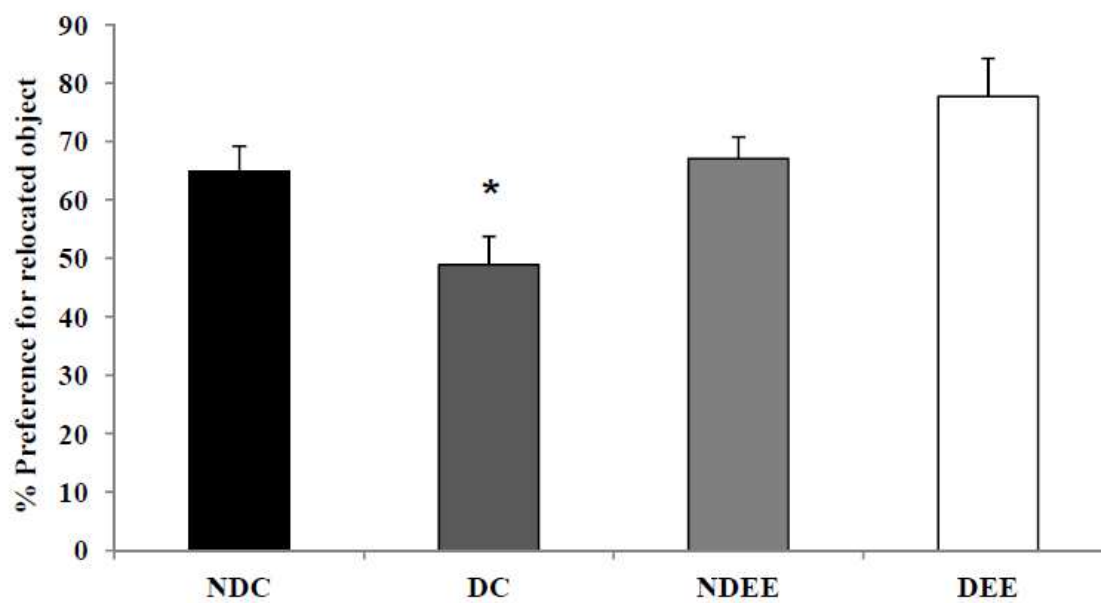
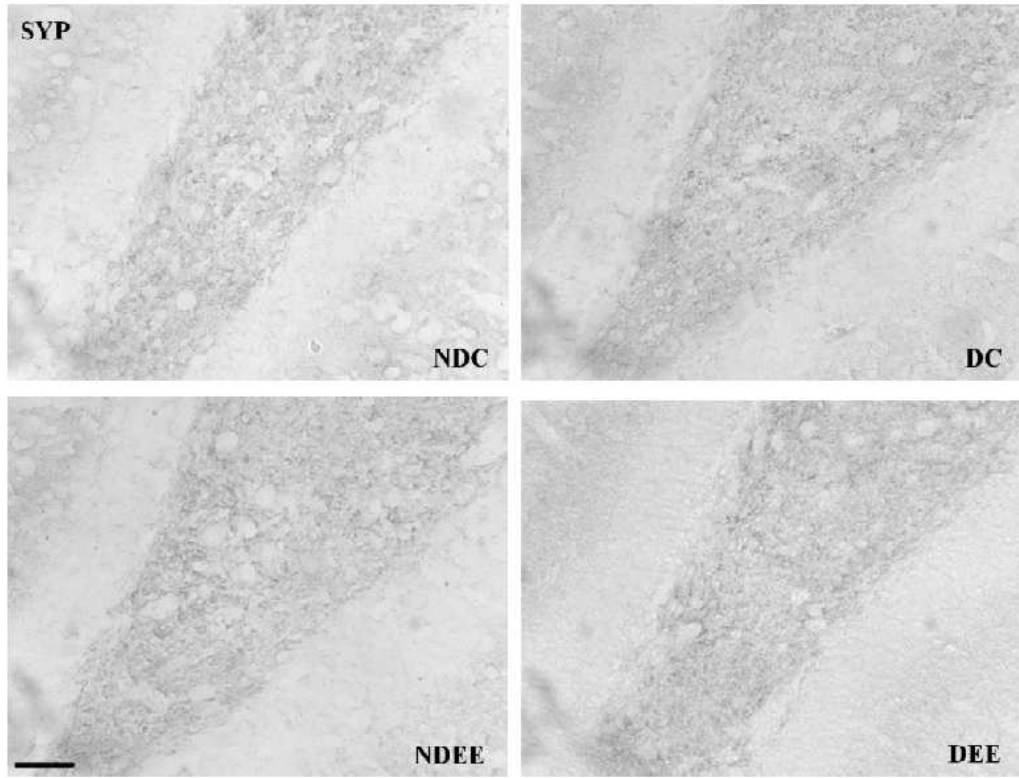


Figure 3

A



B

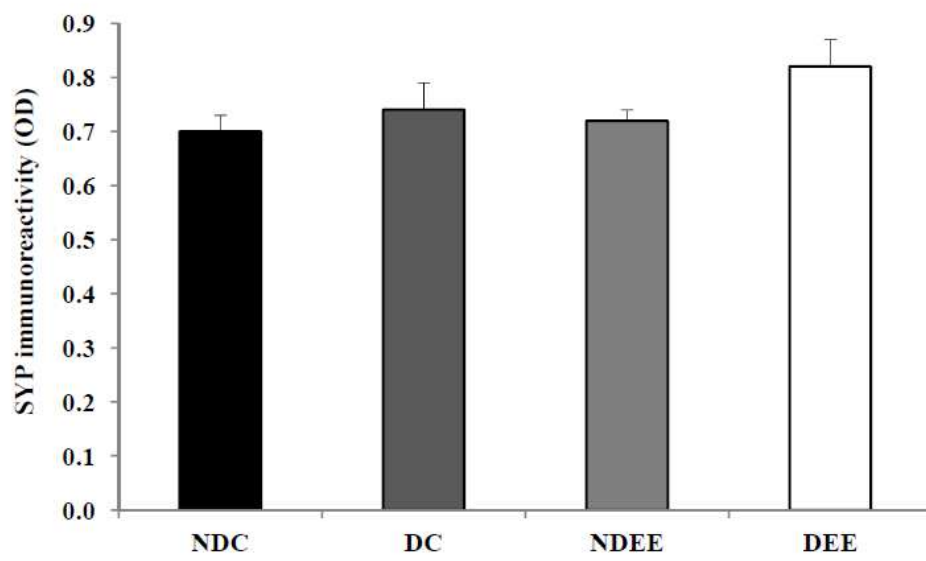
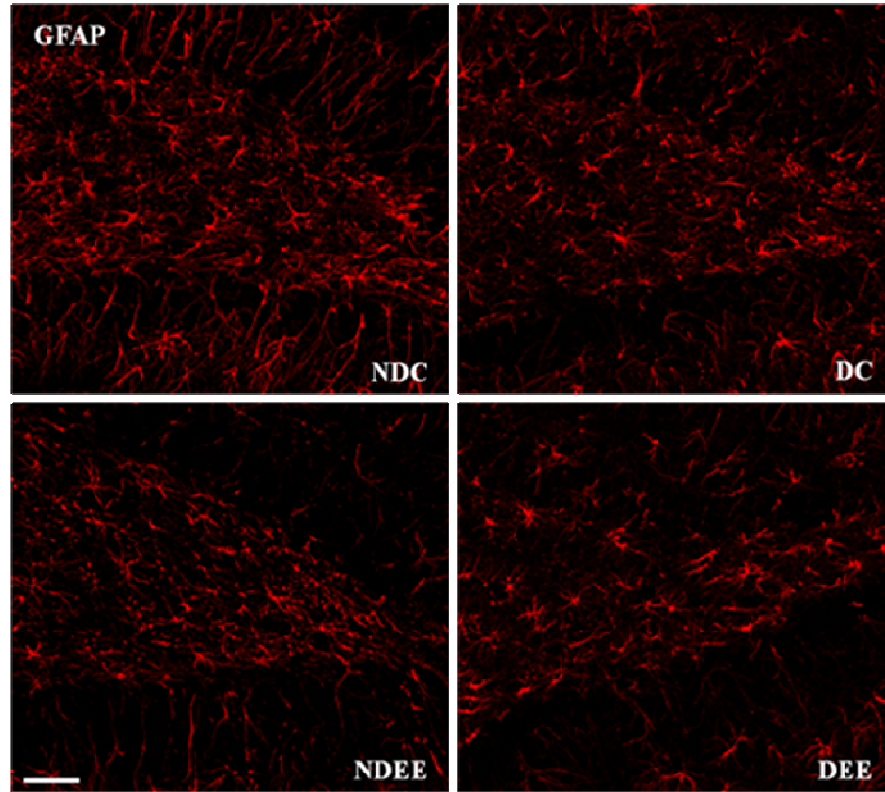
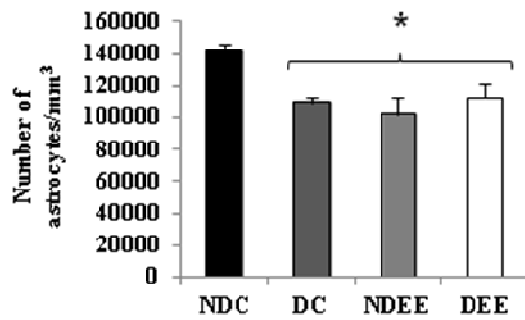


Figure 4

A



B



C

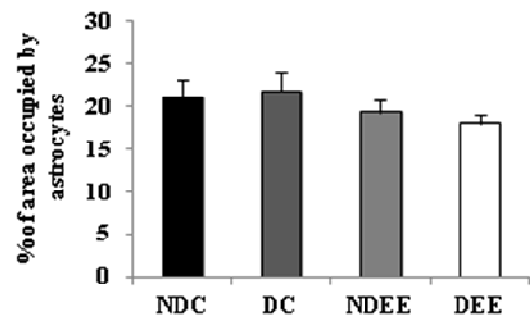
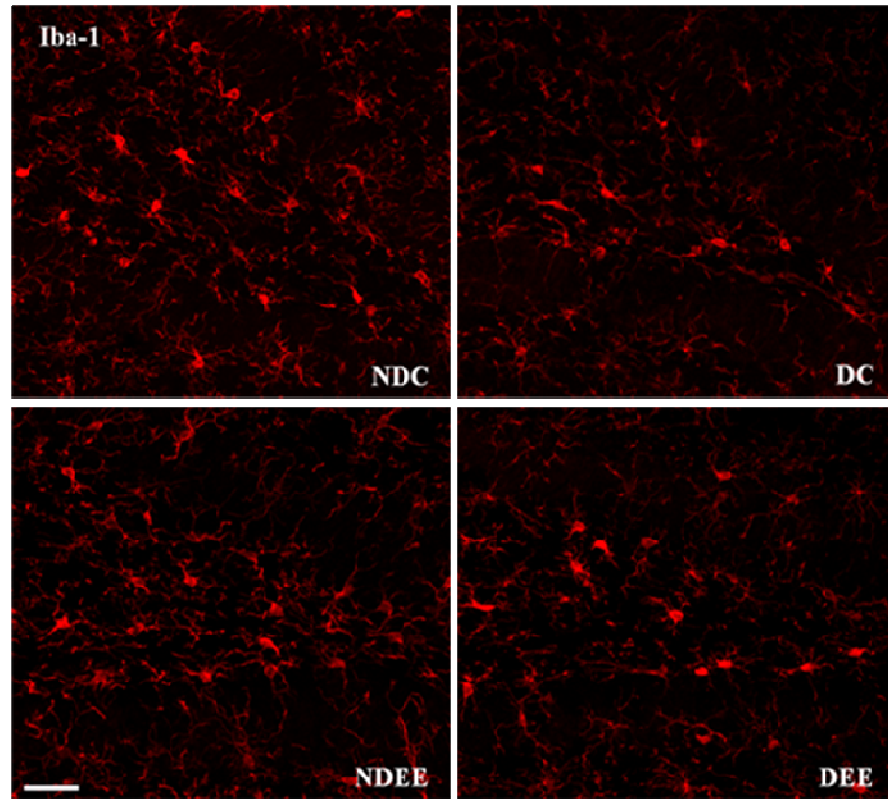
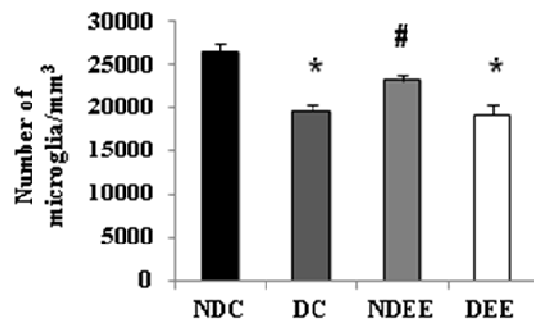


Figure 5

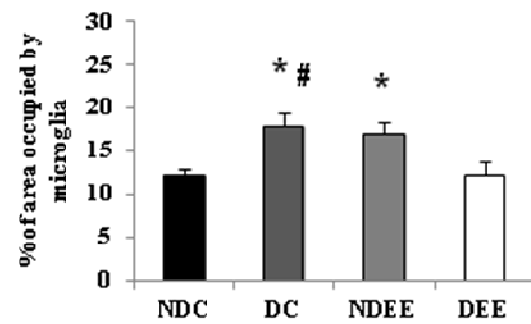
A



B



C



4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nessa dissertação nos permitem concluir que:

O enriquecimento ambiental (EA) foi capaz de prevenir ou atrasar o desenvolvimento do déficit de memória causado pelo diabetes em ratos adultos, ajudando, portanto, a amenizar as comorbidades cognitivas associadas à doença.

O EA não reverteu o déficit motor observado em ambos os grupos diabéticos.

Nem o diabetes, nem o EA alteraram significativamente a imunorreatividade da proteína sinaptofisina no hilo do giro denteado (GD) do hipocampo em todos os grupos estudados.

O EA reduziu os níveis séricos de corticosterona e a consequente hiperatividade do eixo HPA observada nos animais diabéticos.

Ambos os grupos de animais diabéticos apresentaram uma diminuição da densidade e ativação dos astrócitos no hilo do GD do hipocampo.

O EA também induziu uma redução da densidade e da ativação astrocitária no hilo do GD nos animais saudáveis, porém possivelmente relacionada a aumento de plasticidade sináptica hipocampal. No entanto, o EA não modificou as alterações astrocíticas observadas nos animais diabéticos.

Ambos os grupos de animais diabéticos apresentaram uma diminuição da densidade de células microgliais no hilo do GD do hipocampo, porém o EA atenuou a ativação microglial observada nos animais diabéticos.

O EA também induziu a uma redução da densidade e da ativação microglial no hilo do GD nos animais saudáveis, contudo possivelmente relacionada à liberação de citocinas anti-inflamatórias.

Este foi o primeiro estudo envolvendo as análises dos níveis de sinaptosifina e da ativação de astrócitos e microglia no diabetes e o concomitante efeito terapêutico do EA. Porém, para um melhor entendimento dessa interação, seria importante avaliar também a neurogênese hipocampal e a sua relação com a ativação microglial, bem como a dosagem de fatores pró e anti-inflamatórios secretados por essas células, para então associar esses resultados com os do teste de memória espacial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N.J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7: 41–53, 2006.

ABBOTT, N.J.; PATABENDIGE, A.A.K.; DOLMAN, D.E.M.; YUSOF, S.R.; BEGLEY, D.J. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37: 13–25, 2010.

AMARAL, O.B. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Research*, 1274: 47–54, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26: S5–S20, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 34: S11–S61, 2011.

ARAQUE, A.; PARPURA, V.; SANZGIRI, R.P.; HAYDON, P. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neuroscience*, 22: 208-215, 1999.

AYOUB, A.E.; SALM, A.K. Increased Morphological Diversity of Microglia in the Activated Hypothalamic Supraoptic Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 23: 7759 –7766, 2003.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BEAUQUIS, J.; ROIG, P.; NICOLA, A.F.; SARAIVIA, F. Short-Term Environmental Enrichment Enhances Adult Neurogenesis, Vascular Network and Dendritic Complexity in the Hippocampus of Type 1 Diabetic Mice. PLoS ONE, 5: 1-12, 2010.

BIESSELS, G.J.; KAMAL, A.; URBAN, I.J.; SPRUIJT, B.M.; ERKELENS, D.W.; GISPEN, W.H. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. Brain Research, 800: 125–135, 1998.

BRANDS, A.M.A.; BIESSELS, G.J.; HAAN, E.H.F.; KAPPELLE, L.J.; KESSELS, R.P.C. The Effects of Type 1 Diabetes on Cognitive Performance. Diabetes Care, 28: 726-735, 2005.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE/ DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. Cadernos de Atenção Básica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Diabetes Mellitus, n.º 16, Brasília – DF, 2006.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. Diabetes, 54: 1615–1625, 2005.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. European Journal of Neuroscience, 21: 513–521, 2005.

CALHOUN, M.E.; JUCKER, M.; MARTIN, L.J.; THINAKARAN, G.; PRICE, D.L.; MOUTON, P.R. Comparative evaluation of synaptophysin- based methods for quantification of synapses. *Journal of Neurocytology*, 25: 821–828, 1996.

CHAMBERS, J.S.; THOMAS, D.; SALAND, L.; NEVE, R.L.; PERRONE-BIZZOZERO, N.I. Growth-associated protein 43 (GAP-43) and synaptophysin alterations in the dentate gyrus of patients with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29: 283– 290, 2005.

COLEMAN, E.S.; JUDD, R.L.; HOEL, J.; DENNIS, J.; POSNER, P. Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS. *Glia*, 48: 166–178, 2004.

COLEMAN, E.S.; DENNIS, J.C.; BRADEN, T.D.; JUDD, R.L.; POSNER, P. Insulin treatment prevents diabetes-induced alterations in astrocyte glutamate uptake and GFAP content in rats at 4 and 8 weeks of diabetes duration. *Brain Research*, 1306: 131–141, 2010.

DAVIS, E.J.; FOSTER, T.D.; THOMAS, W.E. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Research Bulletin*, 34:73-78, 1994.

DE LA MONTE, S.M. Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Reports*, 42:475-481, 2009.

DENG, W.; AIMONE, J.B.; GAGE, F.H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews. Neuroscience*, 11: 339-350, 2010.

DESROCHER, M.; ROVET, J. Neurocognitive correlates of type 1 diabetes mellitus in childhood. *Child Neuropsychology*, 10: 36–52, 2004.

DO NASCIMENTO, P.S.; LOVATEL, G.A.; BARBOSA, S.; ILHA, J.; CENTANARO, L.A.; MALYSZ, T.; XAVIER, L.L.; SCHAANN, B.D.; ACHAVAL, M. Treadmill training improves motor skills and increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta in diabetic rats. *Brain Research*, 1382:173-180, 2011.

FERREIRA, A.F.B.; REAL, C.C.; RODRIGUES, A.C.; ALVES, A.S.; BRITTO, L.R.G. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, bdnf-independent hippocampal plasticity. *Brain Research*, 1425:111–122, 2011.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behavioural Brain Research*, 175:1–8, 2006.

FRICK, K.M.; FERNANDEZ, S.M. Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice. *Neurobiology of Aging*, 24: 615–626, 2003.

GASPAR, J.M.; CASTILHO, Á.F.; BAPTISTA, F.I.; LIBERAL, J.; AMBRÓSIO, A.F. Long-term exposure to high glucose induces changes in the content and distribution of some exocytotic proteins in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 171: 981–992, 2010a.

GASPAR, J.M.; BAPTISTA, F.I.; GALVÃO, J.; CASTILHO, Á.F.; CUNHA, R.A.; AMBRÓSIO, A.F. Diabetes differentially affects the content of exocytotic proteins in hippocampal and retinal nerve terminals. *Neuroscience*, 169:1589–1600, 2010b.

GEMMA, C.; BACHSTETTER, A.D.; BICKFORD, P.C. Neuron-Microglia Dialogue and Hippocampal Neurogenesis in the Aged Brain. *Aging and Disease*, 1: 232–244, 2010.

GISPEN, W.H.; BIESSELS, G.J. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends in Neuroscience*, 23: 542–549, 2000.

GRILLO, C.A.; PIROLI, G.G.; WOOD, G.E.; REZNIKOV, L.R.; MCEWEN, B.S.; REAGAN, L.P. Immunocytochemical analysis of synaptic proteins provides new insights into diabetes-mediated plasticity in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 136: 477–486, 2005.

GROTE, H.E.; HANNAN, A.J. Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34: 533–545, 2007.

HANNONEN, R.; KOMULAINEN, J.; EKLUND, K.; TOLVANEN, A.; RIIKONEN, R.; AHONEN, T. Verbal and academic skills in children with early-onset type 1 diabetes. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 52: 143–147, 2010.

HENNEBERGER, C; PAPOUIN, T.; OLIET, H.R.; RUSAKOV, D.A. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*, 463: 232–237, 2010.

JAHROMI, M.M.; EISENBARTH, G.S. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cellular and Molecular Life Science*, 64: 865–872, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan – 10ª ed., 2004.

KAMAL, A.; BIESELS, G.J.; URBAN, I.J.A.; GISPEN, W.H. Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocindiabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression. *Neuroscience*, 90: 737–745, 1999.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386: 493-495, 1997.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience*, 18: 3206–3212, 1998.

KETTENMANN, H.; HANISCH, U.K.; NODA, M.; VERKHRATSKY, A. Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, 91: 461–553, 2011.

KIM, J.H.; MIN, K.J.; SEOL, W.; JOU, I.; JOE, E.H. Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. *Journal of Neurochemistry*, 115:1161-1171, 2010.

KIM, S.U.; VELLIS, J. Microglia in Health and Disease. *Journal of Neuroscience Research*, 81:302–313, 2005.

LADEBY, R.; WIRENFELDT, M.; GARCIA-OVEJERO, D.; FENGER, C.; DISSING-OLESEN, L.; DALMAU, I.; FINSEN, B. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Research Reviews*, 48: 196– 206, 2005.

LAMBERT, T.J.; FERNANDEZ, S.M.; FRICK, K.M. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83: 206–216, 2005.

LANGSTON, R.F.; STEVENSON, C.H.; WILSON, C.L.; SAUNDERS, I.; WOOD, E.R. The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. *Behavioural Brain Research*, 215: 275–291, 2010.

LEBED, Y.V.; ORLOVSKY, M.A.; NIKONENKO, A.G.; USHAKOVA, G.A.; SKIBO, G.G. Early reaction of astroglial cells in rat hippocampus to streptozotocin-induced Diabetes. *Neuroscience Letters*, 444: 181–185, 2008.

LEGGIO, M.G.; MANDOLESI, L.; FEDERICO, F.; SPIRITO, F.; RICCI, B.; GELFO, F.; PETROSINI, L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behavioural Brain Research*, 163:78–90, 2005.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência? 2^a ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

MAAHS, D. M.; WEST, N.; LAWRENCE, J.M.; MAYER-DAVIS, E.J. Epidemiology of type 1 Diabetes. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 39: 481–497, 2010.

McEWEN, B.S.; SAPOLSKY, R.M. Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology*, 5: 205–216, 1995.

McEWEN, B.S.; MAGARINÕS, A.M.; REAGAN, L.P. Studies of hormone action in the hippocampal formation. Possible relevance to depression and diabetes. *Journal of Psychosomatic Research*, 53:883 – 890, 2002.

MESSIER, C. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. *Neurobiology Aging*, 26: 26–30, 2005.

MESTRINER, R.G.; PAGNUSSAT, A.S.; BOISSERAND, L.S.B.; VALENTIM, L.; NETTO, C.A. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Experimental Neurology*, 227: 53–61, 2011.

MOGI, M.; HORIUCHI, M. Neurovascular Coupling in Cognitive Impairment Associated With Diabetes Mellitus. *Circulation Journal*, 75: 1042 - 1048, 2011.

MURATA, M.; TAKAHASHI, A.; SAITO, I.; KAWANISHI, S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochemical Pharmacology*, 57: 881–887, 1999.

MUSEN, G.; LYOO, I.K.; SPARKS, C.R.; WEINGER, K.; HWANG, J.; RYAN, C.M.; JIMERSON, D.C.; HENNEN, J.; RENSHAW, P.F.; JACOBSON, A.M. Effects of type 1 diabetes on gray matter density as measured by voxel-based morphometry. *Diabetes*, 55:326–333, 2006.

NAPOLI, I.; NEUMANN, H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*, 158:1030–1038, 2009.

NITHIANANTHARAJAH, J.; LEVIS, H.; MURPHY, M. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81: 200–210, 2004.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A.J. Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7: 697 – 709, 2006.

NITTA, A.; MURAI, R.; SUZUKI, N.; ITO, H.; NOMOTO, H.; KATOH, G.; FURUKAWA, Y.; FURUKAWA, S. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. *Neurotoxicology and Teratology*, 24: 695–701, 2002.

NORTHAM, E.A.; RANKINS, D.; LIN, A.; WELLARD, R.M.; PELL, G.S.; FINCH, S.J.; WERTHER, G.A.; CAMERON, F.J. Central nervous system function in youth with type 1 diabetes 12 years after disease onset. *Diabetes Care*, 32:445–450, 2009.

OITZL, M.S.; DE KLOET, E.R. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behavioral Neuroscience*, 106: 62–71, 1992.

OITZL, M.S.; FLUTTERT, M.; DE KLOET, E.R. The effect of corticosterone on reactivity to spatial novelty is mediated by central mineralocorticosteroid receptors. *The European Journal of Neuroscience*, 6: 1072–1079, 1994.

PAUL, C.M.; MAGDA, G.; ABEL, S. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research*, 203:151–164, 2009.

PAXINOS G. *The rat Nervous System*. 2^a ed., San Diego: Academic Press, 1995.

PENG, H.; HAGOPIAN, W. Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 7: 149–162, 2006.

PEREIRA, L.O.; STRAPASSON, A.C.P.; NABINGER, P.M.; ACHAVAL, M.; NETTO, C.A. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia–ischemia. *Brain Research*, 1218: 257–266, 2008.

PIAZZA, F.V.; PINTO, G.V.; TROTT, G.; MARCUZZO, S.; GOMEZ, R.; FERNANDES, M.C. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behavioral Brain Research*, 217:16–20, 2011.

POPOVIĆ, M.; BIESELS, G.J.; ISAACSON, R.L.; GISPEN, W.H. Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task. *Behavioural Brain Research*, 122: 201–207, 2001.

REVSIN, Y.; WIJK, D.V.; SARAVIA, F.E.; OITZ, M.S.; NICOLA, A.F.; KLOET, E.R. Adrenal Hypersensitivity Precedes Chronic Hypercorticism in Streptozotocin-Induced Diabetes Mice. *Endocrinology*, 149:3531–3539, 2008.

REVSIN, Y.; REKERS, N.V.; LOUWE, M.C.; SARAVIA, F.E.; NICOLA, A.F.; KLOET, E.R.; OITZ, M.S. Glucocorticoid Receptor Blockade Normalizes Hippocampal Alterations and Cognitive Impairment in Streptozotocin- Induced Type 1 Diabetes Mice. *Neuropsychopharmacology*, 34: 747–758, 2009.

RISTOW, M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *Journal of Molecular Medicine*, 82:510–529, 2004.

SEAQUIST, E.R. The Final Frontier: How Does Diabetes Affect the Brain? *Diabetes*, 59: 4-5, 2010.

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. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metabolic Brain Disease*, 26:269–279, 2011.

SERINO, R.; UETA, Y.; TOKUNAGA, M.; HARA, Y.; NOMURA, M.; KABASHIMA, N.; SHIBUYA, I.; HATTORI, Y.; YAMASHITA, H. Up regulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, 41: 640-648, 1998.

SERLIN, Y.; LEVY, J.; SHALEV, H. Vascular Pathology and Blood-Brain Barrier Disruption in Cognitive and Psychiatric Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2011:1- 10, 2011.

SETH, P.; KOUL, N. Astrocyte, the star avatar: redefined. *Journal Bioscience*, 33: 405– 421, 2008.

SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*, 87: 521–536, 2010.

SIEGEL, G.; ALBERS, R.W.; BRADY, S.; PRICE, D. Basis neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects. 7^a ed. Canadá: Elsevier, 2006.

SIMA, A.A.F.; ZHANG, W.; MUZIK, O.; KREIPKE, C.W.; RAFOLS, J.A.; HOFFMAN, W.H. Sequential abnormalities in type 1 diabetic encephalopathy and the effects of C-peptide. Review of Diabetic Studies, 6:211–222, 2009.

SIMA, A.A.F. Encephalopathies: the emerging diabetic complications. Acta Diabetologica, 47:279–293, 2010.

SOFRONIEW, M.V.; VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathologica, 119: 7–35, 2010.

SOULET, D.; RIVEST, S. Microglia. Current Biology, 18: 506-508, 2008.

STRANAHAN, A.M.; ARUMUGAM, T.V.; CUTLER, R.G.; LEE, K.; EGAN, J.M.; MATTSON, M.P. Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. Nature Neuroscience, 11: 309-317, 2008.

STREIT, W.J.; WALTER, S.A.; PENNELL, N.A. Reactive microgliosis. Progress in Neurobiology. 57: 563 - 581, 1999.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiological Research, 50: 537–546, 2001.

THEODOSIS, D.T.; DOMINIQUE, A.; POULAIN, D.A.; OLIET, S.H.R. Activitydependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological Reviews*, 88: 983–1008, 2008.

TUZCU, M.; BAYDAS, G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *European Journal of Pharmacology*, 537: 106–110, 2006.

VALENTE, T.; GELLA, A.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X.; UNZETA, M.; DURANY, N. Immunohistochemical analysis of human brain suggests pathological synergism of Alzheimer's disease and diabetes mellitus. *Neurobiology of Disease*, 37: 67–76, 2010.

VIOLA, G.; RODRIGUES, L.; AMERICO, J.; HANSEL, G.; VARGAS, R.; BIASIBETTI, R.; SWAROWSKY, A.; GONCALVES, C.A.; XAVIER, L.L.; ACHAVAL, M.; SOUZA, D.O.; WESSELS, A.M.; SCHELTENS, P.; BARKHOF, F.; HEINE, R.J. Hyperglycaemia as a determinant of cognitive decline in patients with type 1 diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 585: 88–96, 2008.

WIEDENMANN, B.; FRANKE, W.W.; KUHN, C.; MOLL, R.; GOULD, V.E. Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83:3500–3504, 1986.

WRIGHT, R.L.; LIGHTNER, E.N.; HARMAN, J.S.; MEIJER, O.C.; CONRAD, C.D. Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. *European Journal of Neuroscience*, 24: 595–605, 2006.

ZHAO, W.Q.; CHEN, H.; QUON, M.J.; ALKON, D.L. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *European Journal of Pharmacology*, 490:71– 81, 2004.

ZIV, Y.; RON, N.; BUTOVSKY, O.; LANDA, G.; SUDAI, E.; GREENBERG, N.; COHEN, H.; KIPNIS, J.; SCHWARTZ, M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature Neuroscience*, 9: 268-275, 2006.