

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

**AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE NEURAL, NÍVEIS GLICÊMICOS E PESO
DA PROLE DE RATAS DIABÉTICAS**

Andreia Nobre Anciuti

Orientador

Prof. Carlos Alberto Gonçalves

Coorientadora

Patrícia Sesterheim

Porto Alegre, Janeiro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Anciuti, Andreia Nobre
AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE NEURAL, NÍVEIS
GLICÊMICOS E PESO DA PROLE DE RATAS DIABÉTICAS /
Andreia Nobre Aciuti. -- 2016.
57 f.

Orientador: Carlos Alberto Saraiva Gonçalves.
Coorientadora: Patrícia Sesterheim.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. diabetes mellitus tipo I. 2. desenvolvimento
do SNC. 3. desenvolvimento de roedores. 4. disfunção
cognitiva. I. Gonçalves, Carlos Alberto Saraiva,
orient. II. Sesterheim, Patrícia, coorient. III.
Título.

AVALIAÇÃO DA PLASTICIDADE NEURAL, NÍVEIS GLICÊMICOS E PESO DA PROLE DE RATAS DIABÉTICAS

Andreia Nobre Anciuti

“O que prevemos raramente ocorre;
o que menos esperamos geralmente acontece.”
(Benjamin Disraeli)

Dedicatória

*Dedico essa dissertação aos meus pais Márcia e Marcos,
meu irmão Eduardo minha avó Erica e meu namorado Eder,
que sempre estiveram ao meu lado, entendendo minha ausência e
apoiando meus sonhos, amo vocês!*

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Carlos Alberto pela paciência e pela dedicação, minha coorientadora Patricia Sesterheim pelo aprendizado, carinho e amizade, meus colegas do Lab33, tanto pelo auxílio técnico como pelo apoio emocional.

Sem o apoio de vocês não seria possível

Sumário

Parte I	1
Resumo	2
Abstract	3
1. Introdução	5
1.1. Desenvolvimento biológico de ratos	5
1.2. Desenvolvimento celular do sistema nervoso central em ratos	6
1.3. Alterações astrogliais durante o desenvolvimento	10
1.4. Diabetes mellitus tipo I	11
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
Parte II	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Animais	19
3.2. Padronização do modelo de diabetes e obtenção dos filhotes	20
3.3. Avaliação da prole	21
3.4. Avaliação estatística	24
4. Resultados	24
4.1. Padronização do modelo de fêmeas diabéticas	24
4.2. Avaliação ponderal e glicêmica	25
4.3. Quantificação das proteínas S100B e GFAP	27
4.4. Avaliação comportamental	30
Parte III	33
5. Discussão	34
6. Conclusões	44
7. Referências	45

Parte I

Resumo

O diabetes mellitus tipo I é uma enfermidade autoimune relacionada com anormalidades genéticas, influenciada por fatores ambientais, que resultam na destruição de células β -pancreáticas, mediadas por células T. O diabetes durante a gravidez aumenta o risco a alterações no sistema nervoso central. O processo de gliogênese é importante para o desenvolvimento e funcionamento do SNC e começa na segunda semana de gestação, em ratos. A glia é composta por astrócitos, oligodendrócitos, células ependimais e microglia. Os astrócitos são as células mais abundantes e responsáveis pela integração do cérebro com o sistema vascular e imunológico, estando relacionados com as funções cognitivas, além de uma importância física e estrutural na barreira hemato-encefálica. Duas proteínas astrocíticas foram estudadas aqui: a proteína glial fibrilar ácida e a S100B, uma proteína ligante de cálcio, produzida e secretada por astrócitos. A S100B está envolvida na comunicação neurônio-glia, possuindo propriedades neurotróficas ou neurotóxicas de acordo com a concentração extracelular. A expressão da proteína glial fibrilar ácida é essencial para a estrutura encefálica e para a integridade da barreira hemato-encefálica. Assim avaliamos essas proteínas gliais na prole oriunda de mães diabéticas (PoD) no desenvolvimento corporal e do sistema nervoso central. Foram utilizadas ratas Wistar-Kyoto diabéticas induzidas por estreptozotocina para obtenção da prole. As fêmeas diabéticas induzidas apresentaram ninhadas menores do que o controle, e os filhotes apresentam menor peso ao nascer. A hiperglicemia materna induz aumento da produção insulínica no feto, que leva a um quadro de hipoglicemia pós-natal. Os níveis glicêmicos do PoD foram superiores ao controle (PoC) com 1 dia, e inferiores com 21 dias. A mensuração da proteína S100B no soro de animais PoD14 apresentou diminuição em relação ao controle. A S100B no líquido mostrou valores maiores no PoD7. Já a S100B no hipocampo mostrou um crescimento progressivo, com diminuição no PoD14 e um aumento no PoD28. Na quantificação da proteína glial fibrilar ácida os animais do grupo PoD7 e PoD14 apresentaram valores menores, em seguida os níveis começaram a subir. No teste de campo aberto os animais PoD apresentaram comportamento ansioso. Já no reconhecimento de objetos os ratos PoD exploraram menos o objeto novo, tanto na memória de curta como de longa duração. As mudanças astrogliais observadas nos animais do grupo PoD estão muito provavelmente relacionadas a alterações da plasticidade neuroglial e ao déficit cognitivo observado.

Abstract

The type I diabetes mellitus is an autoimmune disease associated with genetic abnormalities, influenced by environmental factors which result in the destruction of pancreatic β -cells, mediated by T cells. Diabetes during pregnancy increases the risk of changes in the central nervous system. The gliogenesis process is important to the development and functioning of the central nervous system and starts the second week of rat gestation. The glia is composed of astrocytes, oligodendrocytes, ependymal cells and microglia. The astrocytes are more abundant cells and responsible for the integration of the brain with vascular and immune systems, being connected with the cognitive functions, as well as a physical and structural importance of the blood-brain barrier. Two astrocyte proteins were studied: glial acidic fibrillar protein and S100B, a binding protein of calcium produced and secreted by astrocytes. S100B is involved in neuron-glia communication, having neurotoxic or neurotrophic properties according to the extracellular concentration. Expression of glial acidic fibrillar protein is essential for brain structure and integrity of the blood-brain barrier. So we evaluated these glial proteins in the offspring derived from diabetic mothers (PoD) on body development and central nervous system. Wistar-Kyoto rats with diabetes induced by streptozotocin to obtain offspring. Induced diabetic females had smaller litters than the control, and the offspring have a lower birth weight. Maternal hyperglycemia induces increased insulin production in the fetus. Blood glucose levels were higher in PoD than the control (PoC) with 1 day and less than 21 days. The measurement of S100B protein in PoD14 animal serum showed a decrease compared to the control. The S100B in cerebrospinal fluid showed values were higher in PoD7. Since S100B in the hippocampus showed a progressive increase with decrease in PoD14 and increase in PoD28. Glial acidic fibrillar protein quantification in animals of PoD7 and PoD14 group showed lower values, and then levels began to rise. In the open field test the PoD animals showed anxious behavior. Since the object recognition (RO) test rats explored the new object in both short and long term memory. Induced diabetic females had smaller litters than the control, and the offspring have a lower birth weight. Maternal hyperglycaemia induces increased insulin production in the fetus, which leads to a postnatal hypoglycemia. The variations observed in the animals of group PoD caused biochemical changes related to astroglial plasticity, which caused cognitive impairment.

Lista de abreviaturas

BHE – barreira hemato-encefálica

G – gestação

GFAP – proteína glial fibrilar ácida

PN – pós-natal

SNC – sistema nervoso central

STZ - estreptozotocina

1. Introdução

1.1. Desenvolvimento biológico de ratos

O uso de animais de laboratório é muito importante para a pesquisa biomédica. Ratos têm sido utilizados na pesquisa científica desde o século XVII, porém o desenvolvimento destes como um modelo animal de laboratório para a pesquisa ocorreu somente em 1906 pelo Instituto Wistar. A escolha desta espécie, em especial, se deve às suas características como pequeno tamanho, docilidade, curto tempo de gestação e baixo custo de manutenção quando comparada a outras espécies (Sengupta, 2015).

Desprovido de pelos e com os olhos fechados, os ratos nascem com peso médio de 5,5g. Até o 14^o dia de vida, são totalmente dependentes nutricionalmente da mãe, quando então inicia a exploração do alimento sólido. Contudo, a maior parte de seus nutrientes é recebida pelo leite materno até o 21^o dia, apresentando ao desmame um peso que pode variar de 33g a 55g (Sengupta, 2015).

Os primeiros 12 dias pós-natal (PN) dos ratos são comparados ao período final da gestação em humanos (Quinn, 2005). O pico de crescimento do encéfalo é entre o PN7 e PN8 (Dobbing and Sands, 1971), e o desenvolvimento completo ocorre apenas aos 60 dias de vida, quando o animal já é considerado adulto (Dekaban and Sadowsky, 1978). Os ratos desenvolvem-se rapidamente durante a infância e tornam-se sexualmente maduros com cerca de seis semanas de idade (Andreollo *et al.*, 2012). A velocidade máxima de crescimento ocorre aos 35 dias de idade nas fêmeas e

aos 42 dias no macho, e a puberdade aparece aos 35 dias de vida em ambos os sexos (Dobbing and Sands, 1971; Lapchick *et al*, 2009).

1.2. Desenvolvimento celular do sistema nervoso central em ratos

Os ratos apresentam um extensivo desenvolvimento neurológico pós-natal (Dobbing and Sands, 1979). A neurulação é o processo de formação dos precursores de células do cérebro e da medula, que ocorre em torno do 6º dia de gestação (G). O tecido ectodérmico da notocorda forma o tubo neural que se apresenta completo em G10,5 (Rice and Barone, 2000). Em G7 áreas específicas do SNC começam a se formar com a neurogênese e migração celular no prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo seguida de uma sequência de processos de desenvolvimento, incluindo a proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, apoptose, e mielinização (Herschkowitz *et al.*, 1997; Vorhees, 1986).

A proliferação é um processo altamente regulado e o início varia de acordo com a região do SNC. No hipocampo, por exemplo, tem início em G15, sendo que o giro denteado apresenta proliferação também no período pós parto (Bayer, 1980). A migração das células proliferadas ocorre da zona ventricular e outras camadas germinativas ocorrem no neocortex medial/dorsal e outras regiões do cérebro anterior (O'Rourke *et al.*, 1992). Por volta de G16 e G17 as primeiras células iniciam a formação do neocórtex. Após este período até o final da gestação, a placa cortical se torna mais espessa à medida que mais células migram da zona ventricular. A neurogênese pós-natal no giro denteado hipocampal pode ser influenciada por hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento. Muitos desses elementos têm um potencial impacto no aprendizado e na memória de adultos. As primeiras duas semanas após o

nascimento são as mais sensíveis e coincidem com máxima produção de células (Watson *et al.*, 2006).

Quanto à diferenciação dos neuroblastos pode ser definida como o processo de expressão de um fenótipo específico. A fase inicial começa assim que os precursores neuronais completam sua última divisão, estando prontos para a migração para a placa cortical (Eagleson *et al.*, 1997; McConnell, 1990). Fatores ambientais podem influenciar o processo de diferenciação, a migração dos neurônios juntamente com a interação de sinais extracelulares e intracelulares iniciam a expressão de genes específicos que irão influenciar o fenótipo neuronal ou glial (Vallés *et al.*, 1996). As sinapses são as responsáveis por quase toda a comunicação célula-célula (Bailey and Chen, 1991), e amadurecem ao longo das primeiras 3 semanas pós-natal. A sinaptogênese consiste em alterações bioquímicas e morfológicas pré e pós sinápticas. Compatibilidade físico-químicas desses elementos e o tempo correto de exclusão de conexões inapropriadas são essenciais para a maturação das conexões sinápticas (Jacobson, 1991).

Os processos de gliogênese e mielinização são essenciais para o funcionamento e desenvolvimento normal do SNC, sendo a glia e as células de Schwann importantes para esse evento. A glia é composta pelos elementos não-neurais do SNC, e pode ser dividida em dois grupos de acordo com a linhagem celular: macroglia (astrócitos, oligodendrócitos) a qual surge do ectoderma, e a microglia que é originária de linhagens de monócitos-macrófagos (Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007; Ventura and Goldman, 2006). As células da glia são capazes de proporcionar uma fonte de energia metabólica e de fatores de crescimento/neurotrófico. Estão envolvidas na

regulação da plasticidade sináptica, modulação da excitabilidade neuronal, modulação e receptação de neurotransmissores, e na retransmissão de informações, entre outras funções (Elsayed and Magistretti, 2015).

Os astrócitos, células gliais mais abundantes no SNC, apresentam diferentes padrões morfológicos que refletem sua especialização funcional dependendo da região do SNC. Na substância branca os astrócitos assumem forma estrelar; já na matéria cinzenta encontramos uma forma menos complexa deste tipo celular. Podemos encontrar nos nichos de células tronco do cérebro astrócitos ependimais que são corados positivamente para proteína fibrilar glial ácida (GFAP). A glia radial, encontra-se na zona ventricular, e fornece sustentação para a migração de neurônios durante o desenvolvimento do cérebro e os astrócitos perivasculares, também apresentam coloração + para GFAP e tem estreita relação com os vasos sanguíneos (Claycomb *et al.*, 2013).

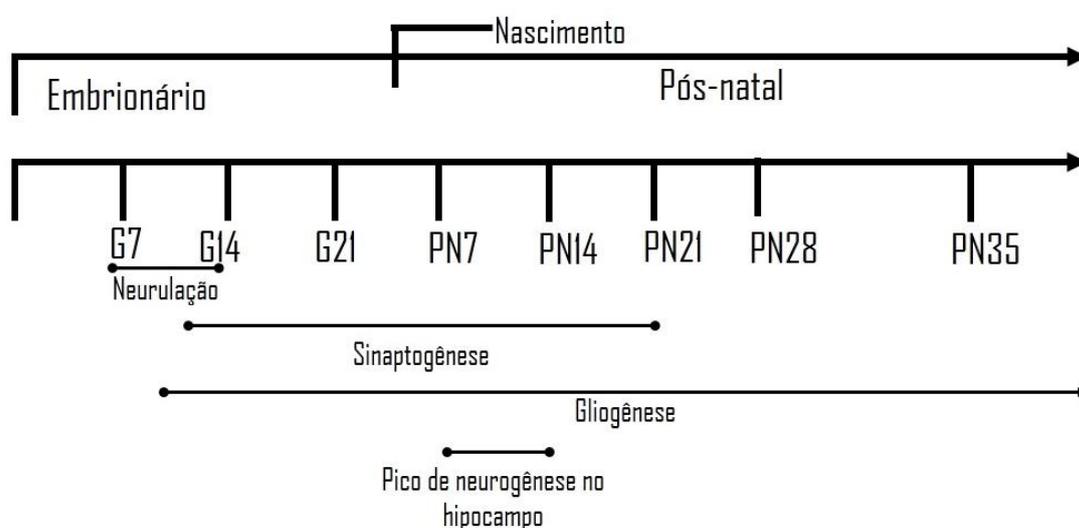
As funções astrocíticas envolvem, principalmente, a modulação local do processamento de informações dentro de uma sinapse, a integração do cérebro com o sistema vascular e imunológico, estando diretamente relacionados com as funções cognitivas, além de uma importância física e estrutural na barreira hemato-encefálica (BHE).

Já os oligodendrócitos são células menores e menos ramificadas que os astrócitos E podem ser divididos em dois tipos: perineurais, que estão localizados na substância cinzenta, e interfasciculares, encontrados na substância branca (Rajkowska and Miguel-Hidalgo, 2007). A principal função atribuída a este tipo celular é a formação de mielina, para o isolamento dos axônios, permitindo rápida velocidade de condução do potencial de ação (Miller

et al., 2012; Zhang and Sejnowski, 2000). Ao aumentar a velocidade e a eficácia da transmissão, a mielinização permite a sincronização de redes neurais, que estão na base dos repertórios cognitivos e comportamentais, um processo vital para o funcionamento do cérebro (Haroutunian *et al.*, 2014). Além disso, os oligodendrócitos também expressam fatores de crescimento, junções GAP e fornecem energia sob forma de lactato (Byravan *et al.*, 1994; Orthmann-Murphy *et al.*, 2008).

As células da micróglia são os macrófagos do SNC, portanto, estão relacionadas com a defesa e manutenção do SNC, envolvidas no refinamento de circuitos neuronais e na neuroinflamação (Chu *et al.*, 2010). Em resposta a um agente patogênico ou à lesão, há uma mudança morfológica em que elas proliferam, migram para o local da lesão e fagocitam células danificadas. Elas também estão envolvidas na ativação do sistema imunológico por fatores como citocinas e quimiotáticos para promover a proteção neuronal (Ginhoux *et al.*, 2013).

Figura 1. Principais eventos do desenvolvimento do SNC de roedores.



Fonte: Adaptado de Rice and Barone (2000)

1.3. Alterações astrogliais durante o desenvolvimento

A proteína ligante de cálcio, S100B, é expressa e secretada por astrócitos, apresentando alvos envolvidos na regulação da proliferação, diferenciação e plasticidade do citoesqueleto. Essa proteína tem atividades funcionais intracelulares como a regulação do metabolismo de energia, crescimento, divisão e comunicação celular, bem como manutenção homeostase do cálcio (Donato, 2001). Ela também pode exercer funções extracelulares como, por exemplo, estimular a proliferação de células neurais e a plasticidade sináptica (Nishiyama *et al.*, 2002).

Sabe-se que, extracelularmente, a S100B está envolvida na comunicação neurônio-glia, possuindo propriedades neurotróficas ou neurotóxicas de acordo com sua concentração. Em níveis nanomolares, a S100B apresenta efeito pró- sobrevivência em neurônios e atua favorecendo o crescimento de neuritos (Donato *et al.*, 2009), enquanto que em concentrações micromolares, exerce efeitos neurotóxicos estimulando a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (Van Eldikand Wainwright, 2003). Por outro lado, níveis sanguíneos de S100B podem ter origem em outros tecidos que não somente o cerebral. Apesar de estar presente em maior quantidade no cérebro (95%), essa proteína pode ser detectada em adipócitos, condrócitos e cardiomiócitos, mas não secretada ativamente por estas células (Mazzini *et al.*, 2005).

Em estudo realizado em humanos, Portela *et al.*, (2002) sugerem que as concentrações de S100B em neonatos e crianças são maiores quando comparadas com indivíduos mais velhos, provavelmente pelo contínuo

desenvolvimento neurológico que ocorre nesta etapa da vida, como a proliferação e maturação glial, extensão dos neuritos e a formação das sinapses.

A GFAP pertence à família das proteínas do citoesqueleto, sendo um importante modulador da motilidade celular e forma dos astrócitos, por prover estabilidade estrutural aos processos astrocíticos. A expressão dessa proteína é essencial para a estrutura encefálica e para a integridade da BHE, podendo haver desmielinização do SNC na sua ausência. De acordo com o avanço da idade, essa proteína tem seus níveis aumentados (Liedtke *et al.*, 1996). A gliose é um evento que ocorre após o dano tecidual no SNC, caracterizada por um grande número de astrócitos na região e uma rápida síntese de GFAP (Norton *et al.*, 1992).

Segundo Glaser *et al.* (2015) ratos jovens com cetoacidose diabética apresentam os valores séricos de S100B significativamente menores quando comparados a ratos saudáveis e hiperglicêmicos. Porém, após 72h do tratamento com insulina, os níveis tornam-se similares aos animais hiperglicêmicos, contudo ainda reduzidos se comparados ao grupo controle, demonstrando alterações na função glial, mas não de perda de células gliais.

1.4. Diabetes mellitus tipo I

O diabetes mellitus tipo I (DM1) ou diabetes dependente de insulina é uma enfermidade autoimune relacionada com anormalidades genéticas, mas também influenciada por fatores ambientais, que resultam na destruição de células β -pancreáticas, mediadas por células T (Barbosa and Santamaria, 1989; Sesterheim *et al.*, 2007). A doença se manifesta geralmente na infância ou adolescência, tendo uma taxa de destruição de células T mais rápida,

quando comparada a taxa que ocorre em adultos. Indivíduos mais jovens podem apresentar cetoacidose como a primeira manifestação da doença, ou ainda hiperglicemia em jejum que evolui rapidamente, em casos de infecção ou estresse, para hiperglicemia e/ou cetoacidose grave (Introduction Diabetes Care, 2015).

As taxas de malformações congênitas e mortalidade perinatal de filhos de mulheres diabéticas são altas quando comparadas a mulheres não diabéticas. Além disso, as alterações são similares entre os tipos de diabetes (tipo I, tipo II e gestacional), sugerindo que as anormalidades são mais dependentes dos níveis de glicose e controle da enfermidade do que com o tipo de diabetes (Mathiesen *et al.*, 2011; Michael Weindling, 2009; Moore *et al.*, 2002). Há aproximadamente o dobro de anomalias congênitas, principalmente nos sistemas cardiovascular e nervoso, em filhos de mães diabéticas em relação aos filhos de mães não diabéticas, e a taxa de mortalidade perinatal é cerca de três vezes superior no grupo de filhos de mães diabéticas (Macintosh *et al.* 2006).

Para o estudo do DM1, existem diversos modelos animais, dentre eles camundongos, ratos, coelhos, cães, gatos, suínos e primatas não humanos (Nelson and Reusch, 2014; Sakata *et al.*, 2012; Saleem Mir *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2014). O modelo de diabetes pode se apresentar de forma espontânea, através de técnicas de engenharia genética ou de métodos farmacológicos (Kirsten *et al.*, 2010; Van Belle *et al.*, 2009). O diabetes experimental induzido farmacologicamente com estreptozotocina (STZ) em ratos tem sido utilizado para avaliações neurológicas (Chmiel-Perzyńska *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014).

1.4.1. Diabetes durante a gestação e o desenvolvimento neuronal

Como resultado de dietas de alto teor calórico e sedentarismo, o diabetes está se tornando prevalente. Em adição aos seus efeitos adversos nos sistemas cardiovascular e nervoso periférico, esta doença parece afetar negativamente o SNC, aumentando o risco de depressão e demência (Messier, 2005). Humanos com diabetes tipo 1 (causada por deficiência de insulina) ou tipo 2 (mediada pela resistência à insulina) mostram alterações típicas da função cognitiva em comparação com não diabéticos (Greenwood and Winocur, 2005). Biessels e colaboradores constataram um desempenho prejudicado nos testes de habilidade de aprendizagem espacial em modelos animais com diabetes tipo 1 experimental (injeção única intraperitoneal de STZ), (Biessels *et al.*, 1998). A indução de DM1 em ratos adultos resulta em alterações na BHE.

O diabetes durante a gravidez é acompanhado por aumento do risco de complicações e malformações fetais, incluindo a síndrome do desconforto respiratório, macrossomia, organomegalia, complicações metabólicas e hematológicas (ter Braak *et al.*, 2002). Os defeitos mais comuns são encontrados no SNC, coração, rins e no sistema esquelético (Mills, 1982). Em ratos, o diabetes pré-gestacional está relacionado com as seguintes alterações: alta dificuldade de conceber, maior número de abortos espontâneos, distúrbios feto-placentárias, mortalidade perinatal e malformações congênitas (Salazar García *et al.*, 2015). Nos seres humanos, as crianças de mães diabéticas podem apresentar anomalias que incluem dificuldades motoras, déficit de

atenção, defeitos de aprendizagem e também o risco de desenvolver esquizofrenia durante a adolescência (McElduff *et al.*, 2005).

O desenvolvimento do cérebro fetal, durante a gestação, requer um aporte adequado de nutrientes que favoreça os processos de sinapses e mielinização dos neurônios (Bonilla *et al.*, 2012; Georgieff, 2007). A glicose se enquadra nestes nutrientes essenciais, pois ela atravessa a barreira placentária para dar suporte energético ao feto. Porém em fetos de mulheres com valores glicêmicos mal controlados, há uma alta concentração de glicose. Esta situação é compensada pelo feto através de hiperinsulinemia, que acarretam futuras complicações metabólicas influenciando no controle da ingesta e do peso corporal, além disso, o excesso de insulina leva a episódios de hipoglicemia, que podem produzir danos irreversíveis ao SNC (Plagemann, 2011).

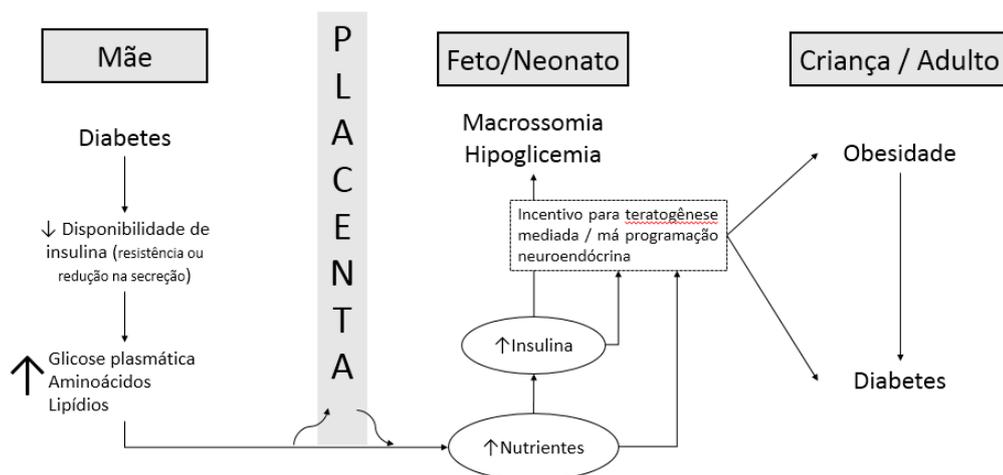
1.4.2. O papel da glicemia no desenvolvimento do sistema nervoso central

Há evidências de que o meio intrauterino e o período pós-natal hiperglicêmicos podem causar predisposição para o desenvolvimento de desordens na vida adulta. A hiperglicemia é conhecida por afetar negativamente a estrutura e a função do SNC em ratos jovens (Suzuki *et al.*, 2004; Vlassara and Palace, 2002). Ainda, no período infantil pode danificar severamente a estrutura do hipocampo apresentando limiares convulsivos mais baixos (Abdelmalik *et al.*, 2005). Níveis elevados de glicose extracelular estão associados a um aumento de alterações neuronais, danos a células da glia (Li *et al.*, 1998), dano oxidativo no SNC (Aragno *et al.*, 2000), e aumento da formação de radicais livres de oxigênio (Baydas *et al.*, 2002). Foi demonstrado que os danos oxidativos e de morte neuronal, provocados pela hiperglicemia

experimental em ratos, induzida por STZ, levam a alterações no hipocampo e no neocortex que, do ponto de vista comportamental, são refletidas como déficits de memória (McEwen *et al.*, 2002).

A hipoglicemia grave recorrente parece não ter efeito negativo sobre a função cognitiva em jovens com diabetes tipo 1 (Austin and Deary, 1999; Malone *et al.*, 2008). Por outro lado, após um episódio de hipoglicemia em ratos jovens com 25 dias de idade, há morte de neurônios corticais, levando a disfunção sináptica e a prejuízos cognitivos (Kamiyama *et al.* 1965). Comparado com o PN28 e adultos, o SNC de PN7 e PN14 têm menor necessidade de energia, reservas de glicogênio mais elevadas e são capazes de realizar transportes eficientes com a utilização de substratos de energia não glicídicas, como os corpos cetônicos (Ennis *et al.* 2008).

Figura 2: Hipótese da programação perinatal (adaptado de Dörner and Plagemann, 1994)



Diante destas evidências, fica clara a importância de se explorar os fatores predisponentes como o diabetes mellitus tipo I durante a gestação, suas interferências nos prejuízos estrutural e funcional do SNC e consequentes

comprometimentos nos domínios cognitivos, visando uma melhor compreensão dos efeitos da doença sobre os fetos e a busca por possíveis tratamentos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar as proteínas associadas à plasticidade astrogliar ao longo do desenvolvimento de ratos oriundos de fêmeas diabéticas.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar o modelo de diabetes induzido por STZ em ratos da linhagem Wistar Kyoto;
- Avaliar a evolução glicêmica e ponderal da prole de fêmeas diabéticas ao longo do tempo: 1, 7, 14, 21 e 28 dias de idade;
- Avaliar o conteúdo de S100B sérica, líquórica e hipocampal na prole nestas mesmas idades;
- Avaliar o conteúdo de GFAP hipocampal;
- Avaliar o comportamento cognitivo, motor e de ansiedade da prole aos 28 dias de idade.

Parte II

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Este estudo foi realizado no Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no período de outubro a dezembro de 2015. Foram utilizados ratos reprodutores da linhagem Wistar-Kyoto (10 fêmeas e 5 machos), com 60 dias de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, objetivando a produção de seis filhotes por grupo experimental.

Os animais foram criados e mantidos em padrão sanitário convencional, com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro (07:00/19:00) e temperatura controlada (21 a 24°C). Foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas, com dimensões de 41 x 34 x 16cm, em cama de maravalha de *pinus* selecionada e autoclavada e alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab CR-1® - Nuvital) e água *ad libitum*.

As avaliações foram realizadas sob normas de ética para pesquisa em modelos animais, com cuidados especiais para a utilização do menor número destes e para manejo da dor e sofrimento. Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), pelas diretrizes do CONCEA que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais entre outras providências, e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA, 2015).

3.2. Padronização do modelo de diabetes e obtenção dos filhotes

As fêmeas reprodutoras foram divididas em dois grupos: grupo controle (GC) e grupo diabética (GD). Após ambientação, as fêmeas de ambos grupos permaneceram em jejum por três horas durante o fotoperíodo claro para a mensuração da glicemia sanguínea através de glicofitas em monitor de glicemia (Accu-ChekAdvantage II- Roche®), em sangue da porção distal da cauda.

Para formação do GC, foram incluídas as fêmeas que apresentaram valores glicêmicos entre 92 – 115 mg/dL. Já para a formação do GD, as demais fêmeas receberam uma injeção única de estreptozotocina (Sigma, St. Louis, MO, USA) na dose de 60 mg/kg, diluída em 1 mL de tampão citrato 0,01M, pH 4,2, pela via intraperitoneal. Após 72 horas de indução, foi realizada nova aferição da glicemia. Foram consideradas diabéticas as fêmeas que apresentaram valor glicêmico superior a 250mg/dL.

Para a obtenção da prole, as fêmeas foram acasaladas através do sistema *Brother & Sister*, mantendo a isogenicidade, na proporção de um macho para duas fêmeas (1:2). Para tanto, foram alocadas em cada caixa uma fêmea do GD, uma do GC e um macho hígido devidamente identificados.

Confirmada a gestação, os grupos GC e GD foram divididos em cinco subgrupos de acordo com o tempo de avaliação proposto da prole produzida (Tabela 1). Após o parto, os filhotes eram observados diariamente.

Tabela 1 – Subgrupos experimentais e tempo de vida da prole analisada.

Idade da prole (grupo $n=6$)	Prole oriunda de fêmeas Controle	Prole oriunda de fêmeas Diabéticas
1 dia (24 horas)	PoC1	PoD1
7 dias	PoC7	PoD7
14 dias	PoC14	PoD14
21 dias	PoC21	PoD21
28 dias	PoC28	PoD28

3.3. Avaliação da prole

3.3.1. Avaliação ponderal e glicêmica

De acordo com o período experimental, conforme item 2.2., diariamente ou semanalmente, foram realizadas a pesagem, em balança analítica, e mensuração glicêmica dos subgrupos.

3.3.2. Conteúdo de S100B

A proteína S100B foi quantificada, pelo método ELISA, de acordo com Leite (2008). A proteína foi avaliada em amostras de soro, líquido e fatias hipocâmpais. As amostras (50 μ L) juntamente com tampão tris (50 μ L) foram incubadas por duas horas em uma placa pré-incubada com o anticorpo anti-S100B monoclonal (SH-B1). Após, foram incubadas por 30 minutos com anti-S100B policlonal e, então, com o anti-rabbit, conjugado com peroxidase, por mais 30 minutos. A reação colorimétrica com o fenilenediamina (OPD) foi medida em 492nm. O valor de concentração de S100B foi calculado a partir da comparação das absorbâncias das amostras com uma curva padrão de S100B, variando de 0,002 – 1 ng/mL.

3.3.3. Quantificação de Proteína Fibrilar Glial Ácida (GFAP)

O conteúdo de GFAP foi quantificado por ELISA, conforme Tramontina *et al.* (2007), com as amostras de hipocampo (100 µL). Foi realizada a incubação com um anticorpo policlonal anti-GFAP de coelho durante uma hora seguida de incubação com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase, à temperatura ambiente. Em seguida, a reação colorimétrica com OPD foi medida em 492 nm. O valor de concentração de GFAP foi calculado a partir da comparação das absorvâncias das amostras com uma curva padrão de GFAP, variando de 0,1 a 10 ng GFAP, e então calculadas a porcentagem do grupo prole de diabéticas em relação ao grupo prole de controles (100%).

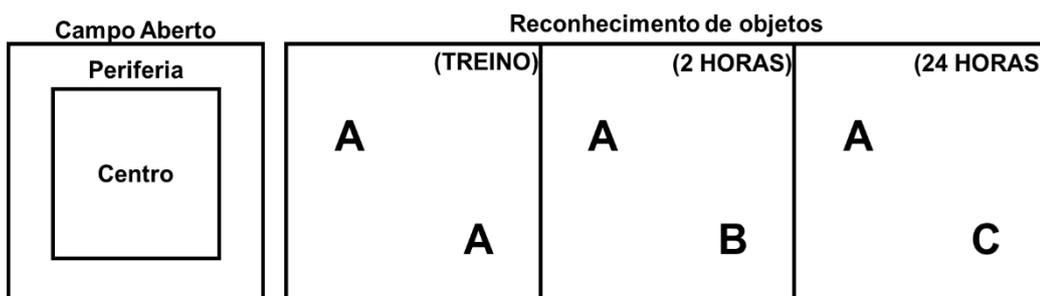
3.3.4. Avaliação comportamental

A avaliação comportamental foi realizada aos 28 dias de idade. Primeiramente, foi realizado o teste do campo aberto, o qual permite avaliar possíveis alterações motoras e comportamentos ansiogênicos, além de permitir a ambientação dos animais ao local que será realizado o teste cognitivo. O teste ocorreu em sala com 30 lux de iluminação, dentro de caixas com paredes e piso pretos, com as seguintes dimensões de 65 x 45 x 45 cm. A arena foi virtualmente dividida em área periférica e área central. Cada rato foi colocado no canto inferior direito, de costas para o centro do campo aberto, e deixado livremente durante 5 minutos para a exploração. Depois, o rato foi transferido de volta para sua gaiola e a arena foi higienizada com álcool 70%. Uma câmera de vídeo, instalada acima da arena, foi conectada a um *notebook* e a um sistema de análise de movimento de monitoramento de vídeo (*Any-maze*), que mediu a distância total percorrida (cm) e o tempo em movimento (s). Além

disso, foi manualmente mensurado o tempo gasto na área central e periférica (s) (Ramírez-López *et al.*, 2016).

Para a avaliação do comportamento cognitivo, foi realizado o teste de reconhecimento de objetos, descrito por Borsoi *et al.* (2015). O teste ocorreu dentro da mesma arena utilizada para o campo aberto. Os objetos utilizados para o reconhecimento foram confeccionados em vidro, plástico e metal. O teste consistiu-se de três sessões: treino, 2 horas após o treino (memória de curta duração) e 24 horas após o treino (memória de longa duração). No treino, que ocorreu 24 horas após a sessão do campo aberto, o animal foi exposto a dois objetos idênticos (A) por cinco minutos. Após duas horas, o animal foi exposto a dois objetos diferentes, um familiar (A) e um novo (B), também por cinco minutos. Por fim, após 24 horas do treino, o animal foi exposto novamente ao objeto familiar (A) e outro objeto novo (C), durante cinco minutos (Figura3). Durante este teste, admite-se que o animal deve explorar o objeto novo (B e C) por pelo menos 50% do tempo, ou seja 2,5 minutos, mostrando assim, capacidade de reconhecimento do objeto familiar (A), tanto nas provas de curta e longa duração da memória.

Figura 3: Demonstração da avaliação em campo aberto e do reconhecimento de objetos no treino, 2 horas e 24 horas após o treino.



3.4. Avaliação estatística

Os dados foram armazenados e analisados pelo suplemento de análise estatística do programa Excel® 2010, além do software Grapppad Prim versão 6. Os dados foram apresentados em $M \pm EP$; foram usados o teste t, teste de correlação e de regressão linear ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Padronização do modelo de fêmeas diabéticas

O desenvolvimento do modelo de diabetes em ratas da linhagem Wistar-Kyoto foi realizado com sucesso. Após a indução com STZ, as 5 fêmeas apresentaram valores glicêmicos acima de 250mg/dL, as quais posteriormente foram acasaladas para obtenção dos filhotes, apresentando taxa de prenhez de 100%, detectada por volta dos 18 dias de gestação, através da observação do aumento abdominal. No dia da eutanásia dos filhotes, a glicemia das fêmeas também foi aferida para confirmar o estado hiperglicêmico (Tabela 2).

Tabela 2. Valores da glicemia periférica das fêmeas antes do acasalamento.

Fêmea	Glicemia pré-indução (STZ)	Glicemia pós-indução (STZ)	Glicemia no dia da eutanásia
1	112	319	395
2	92	289	294
3	115	347	403
4	98	271	330
5	96	258	441
6	107	158	-
7	101	110	-
8	98	123	-

A média de filhotes nascidos das fêmeas do GD variou entre 6 e 8 (M=7,6), e das fêmeas do GC entre 7 e 11 (M=8,4). No grupo controle não houve animais natimortos ou óbitos, já no grupo oriundo de mães diabéticas houve, no total, 7 óbitos em diferentes grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Valores reprodutivos das fêmeas controle (GC) e diabéticas (GC), de acordo com o tempo experimental.

	1 dia		7 dias		14 dias		21 dias		28 dias	
	PoC	PoD	PoC	PoD	PoC	PoD	PoC	PoD	PoC	PoD
Nºde filhotes	7	8	7	7	9	6	9	8	11	8
Mortos	-	-	-	3	-	3	-	1	-	-
<i>n</i> final	7	8	7	4	8	3	8	7	9	8

4.2. Avaliação ponderal e glicêmica

Os animais da PoD apresentaram menor peso no período de lactação (1 aos 21 dias de vida) em relação ao grupo PoC (Tabela 4). Porém, ao 28º dia de vida, esta diferença não foi estatisticamente observada (Figura 4A).

Já, na avaliação glicêmica, os animais do grupo PoD apresentaram, em relação ao grupo PoC, valores glicêmicos estatisticamente superiores na idade de 1 dia e inferiores no 21º dia de vida. Nos outros tempos não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 4B e Tabela 4).

Figura 4: Peso corporal (A) e glicemia periférica (B) da prole nos diferentes tempos observados. Os dados representam $M \pm EP$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, **** $p < 0,00005$, comparados ao grupo controle. PoC = prole oriunda de controles, PoD = prole oriunda de diabéticas.

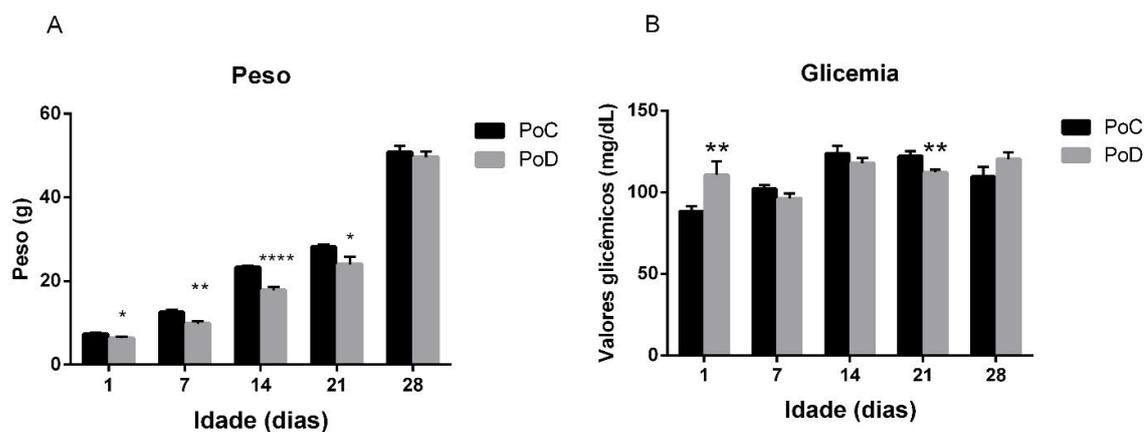


Tabela 4. Valores de n e p para peso e glicemia de acordo com os grupos experimentais.

Tempo	PoC (n)	PoD (n)	Peso (p)	Glicemia (p)
1	28	16	0,0244	0,0053
7	30	22	0,0015	NS*
14	22	18	0,0001	NS*
21	17	15	0,0338	0,0091
28	9	8	NS*	NS*

*NS: não significativo

4.3. Quantificação das proteínas S100B e GFAP

4.3.1. S100B no soro sanguíneo

Em nosso estudo, a mensuração da proteína S100B no soro de animais PoD apresentou, em relação ao grupo PoC, diminuição significativa apenas aos 14 dias de idade (Figura 5 e Tabela 5).

4.3.2. S100B no líquido

Quanto a S100B no líquido, os valores foram superiores aos 7 dias de idade. Nos demais tempos observados, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 5B e Tabela 5).

4.3.3. S100B no hipocampo

Já o perfil da S100B no hipocampo mostrou um crescimento progressivo, contudo apresentou no 14º dia de vida uma diminuição estatisticamente significativa no grupo PoD, retomando um crescimento, também significativo na idade de 28 dias. (Figura 5C e Tabela 5).

4.3.4. GFAP no hipocampo

Na quantificação da proteína GFAP, os animais do grupo PoD apresentaram, em relação ao grupo PoC (100%), valores estatisticamente menores nas idades de 7 e 14 dias. Após este período, os níveis começaram a subir e não tiveram diferença estatística em relação ao controle (Figura 5D e Tabela 5).

Figura 5: S100B no soro (A), S100B no líquor (B), S100B no hipocampo (C) e GFAP no hipocampo (D) da prole nos diferentes tempos observados. Os dados representam a $M \pm EP$, $*p < 0,05$, comparados aos grupo controle. PoC = prole oriunda de controles, PoD = prole oriunda de diabéticas.

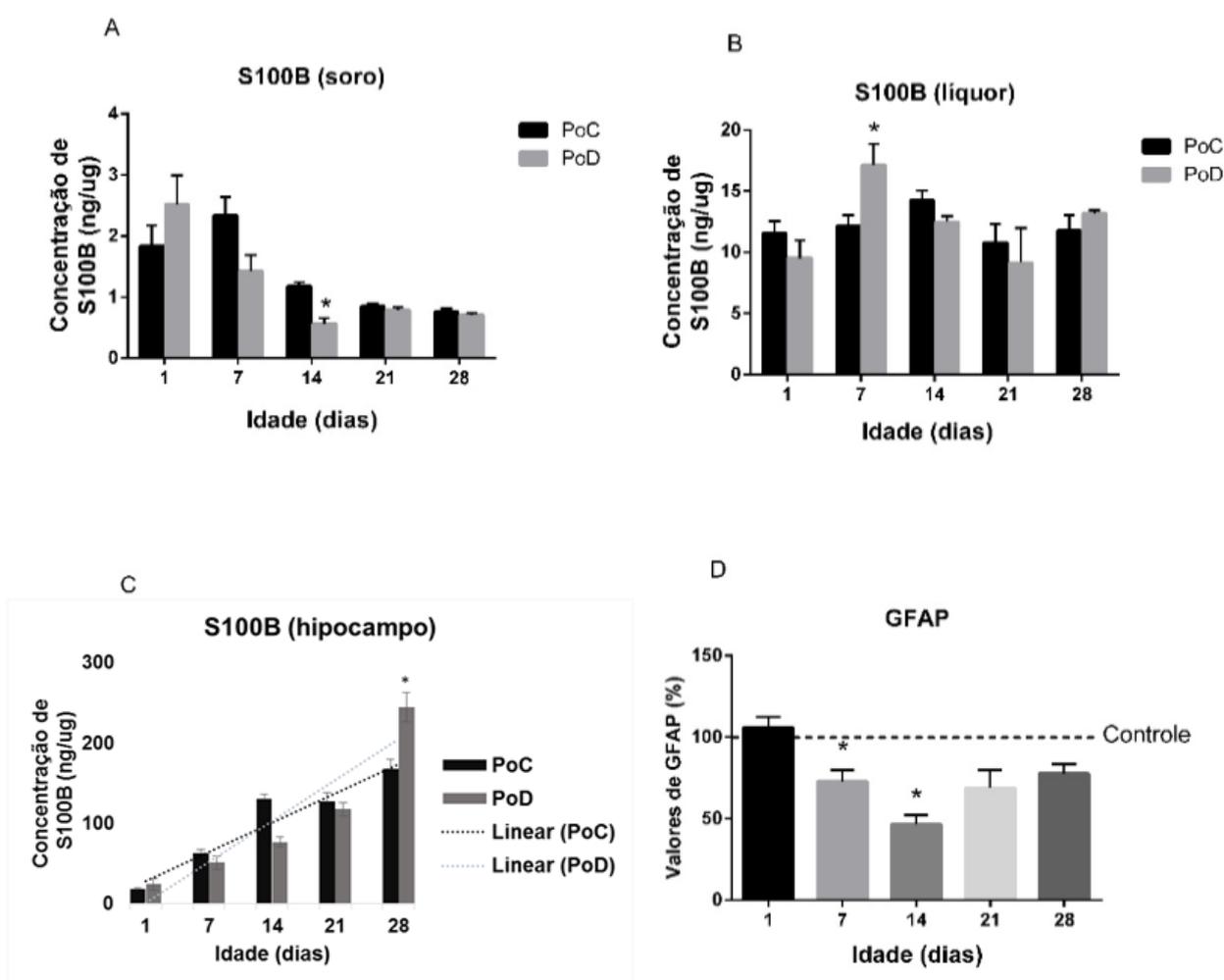


Tabela 5. Valores de n e p para S100B no soro, líquor e hipocampo, bem como GFAP, de acordo com os grupos experimentais.

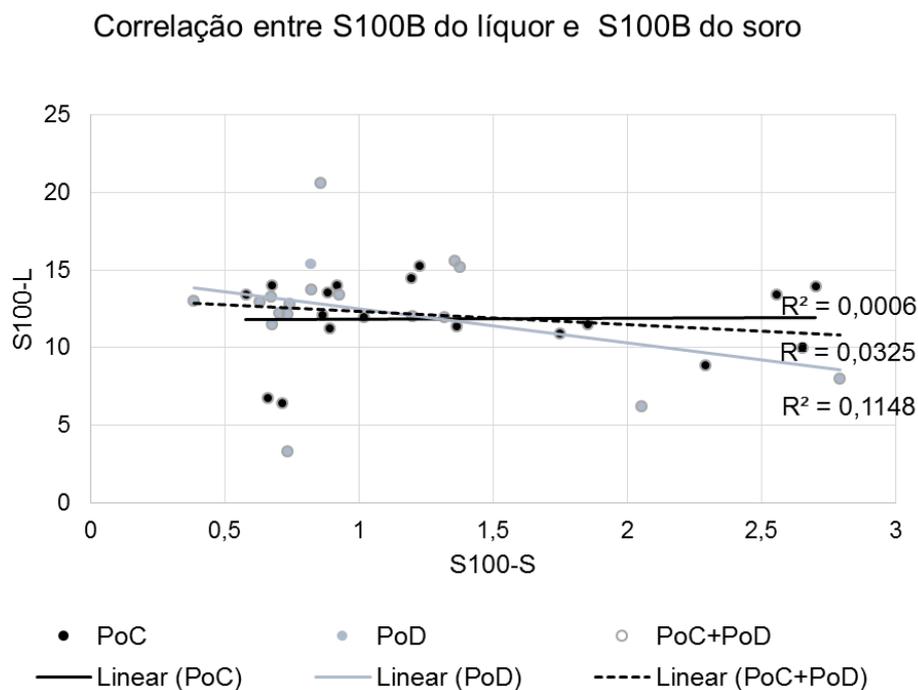
Tempo	S100B Soro			S100B líquor			S100B hipocampo			GFAP hipocampo		
	PoC(n)	PoD(n)	p	PoC(n)	PoD(n)	p	PoC(n)	PoD(n)	p	PoC(n)	PoD(n)	p
1	6	6	NS*	5	4	NS*	6	6	NS*	4	6	NS*
7	4	4	NS*	4	3	0,0403	5	4	NS*	5	4	0,0097
14	6	3	0,0484	5	3	NS*	6	3	0,0215	6	3	0,0118
21	6	6	NS*	4	5	NS*	6	5	NS*	5	4	NS*
28	6	6	NS*	6	5	NS*	5	5	0,0108	5	4	NS*

*NS: não significativo

4.3.5. Correlação entre S100B no soro e no líquido

Analisando possível relação entre os níveis séricos da proteína S100B com os níveis encontrados no líquido, não há evidências suficientes para se afirmar que exista entre eles uma correlação ($r=-0,18$, fraca negativa) (Figura 6).

Figura 6:. Correlação entre S100B no líquido e no soro

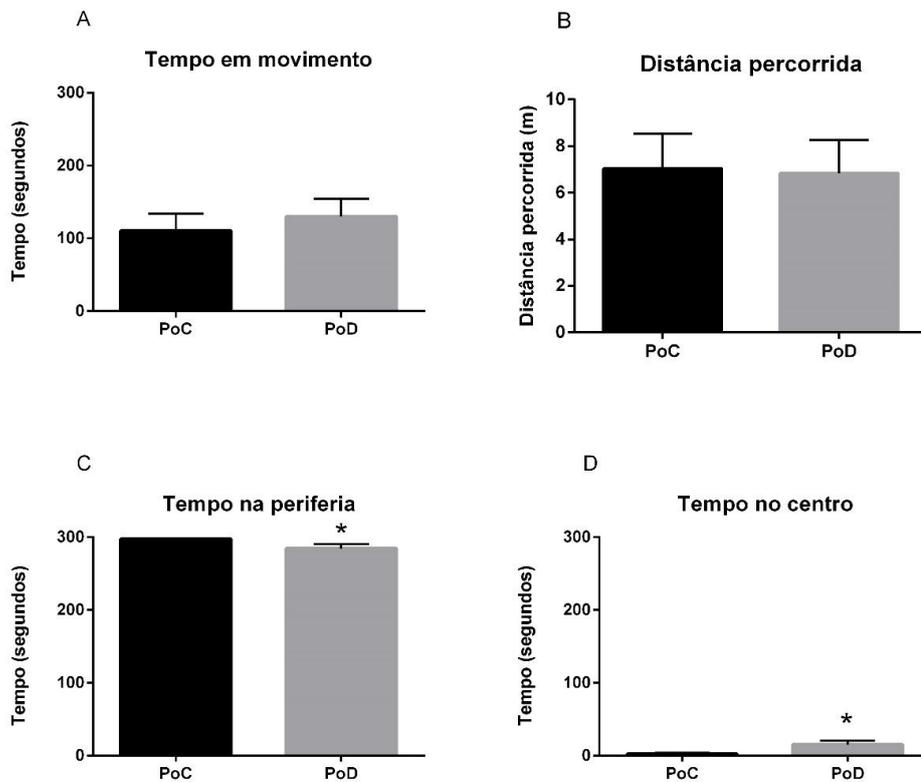


4.4. Avaliação comportamental

4.4.1. Campo aberto

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nas avaliações do tempo em movimento (teste t , $p=0,570$) e distância total percorrida (teste t , $p=0,926$) (Figura 7A e 7B). Porém, foram significativos os valores encontrados nas avaliações do tempo de permanência na periferia (teste t , $p=0,049$) e do tempo de permanência no centro (teste t , $p=0,049$) (Figura 7C e 7D)

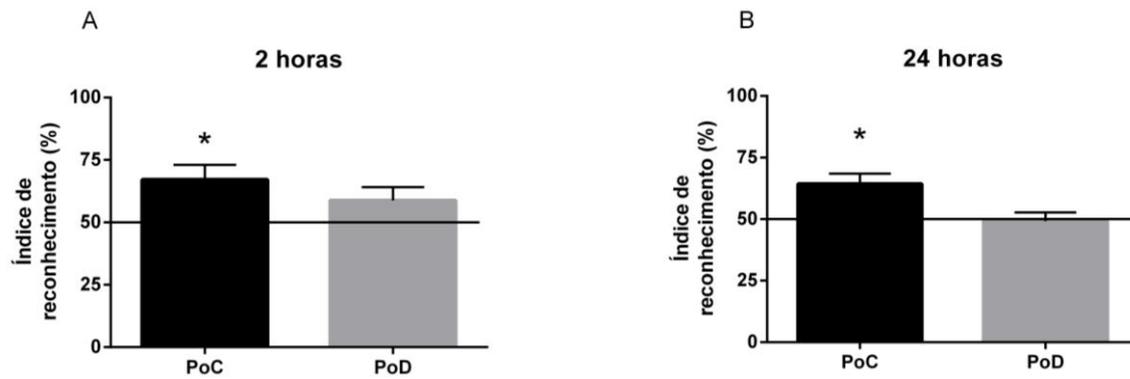
Figura 7: Tempo em movimento (A) e distância percorrida (B) pelos animais durante o teste de campo aberto. Tempo gasto na periferia (C) e tempo gasto no centro (D) da arena do teste de campo aberto. Teste *t* não pareado: * $p < 0,05$ Resultados demonstrados em média + erro padrão da média (n= 8 por grupo).



4.4.2. Teste de reconhecimento de objetos

Na idade de 28 dias, as proles de mães controle (PoC) exploraram significativamente por mais tempo o objeto novo nas provas de 2 horas (One sample T test, $p=0,043$) e 24 horas após o treino (One sample T test, $p=0,027$). Já as proles de mães diabéticas (PoD) não apresentaram diferença entre a exploração do objeto novo e do velho em 2 horas (One sample T test, $p=0,143$) e 24 horas após o treino (One sample T test, $p=0,820$) (Figura 8).

Figura 8: Comparação dos índices de reconhecimento de objetos: (A) prova realizada 2 horas pós-treino e (B) 24 horas pós-treino. One sample T test: * $p < 0,05$. Resultados demonstrados em média + erro padrão da média (n= 8 por grupo).



Parte III

5. Discussão

O diabetes mellitus tipo 1 tem sido associado a complicações a longo prazo no sistema nervoso central e efeitos periféricos, causando disfunções cognitivas no encéfalo. A hiperglicemia durante a gestação pode influenciar na programação perinatal, porém esses efeitos não estão bem definidos (Plagemann, 2011; Sima, 2010). Desta forma, ao estudarmos os distúrbios cognitivos trouxemos à comunidade científica esclarecimentos sobre a interferência desta enfermidade durante a gestação, seu risco durante os desenvolvimentos peri e pós-natal, através das alterações de níveis das proteínas astrogliais S100B e GFAP e comprovando o déficit cognitivo por testes comportamentais.

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune órgão-específica caracterizada pela destruição seletiva de células-beta pancreáticas produtoras de insulina. Compreende um grupo clínica e geneticamente heterogêneo de doenças que apresentam, como característica comum, níveis elevados de glicemia e distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas devido à produção ou ação deficiente da insulina no organismo (Sesterheim *et al.*, 2007).

Modelos para estudo DM1 podem ser químicos, utilizando estreptozotocina (STZ) ou aloxana ou espontâneos. A STZ, antibiótico e anti-carcinogênico, é o agente químico diabetogênico mais proeminente na investigação do diabetes, cerca de 90% dos protocolos publicados, devido à sua citotoxicidade, causando dano no ácido desoxirribo-nucleico (DNA), depletando a Nicotina Adenina Di-nucleotídeo (NAD⁺), que inibe a biossíntese e a secreção de insulina, levando à morte das células beta, através da

depleção de energia (Gauthier, 2014; Kirsten et al., 2010; Sakata et al., 2012). Foram realizados estudos *in vitro*, com STZ, para verificar o efeito diabetogênico nas células beta-pancreáticas. O estudo mostrou uma descarga transitória de glutamato descarboxilase no meio extracelular, propondo que esta enzima poderia servir como um marcador de processos tóxicos e como um auto-antígeno para a reatividade imune (Szkudelski, 2001).

As doses usualmente utilizadas para indução do DM1 estão entre 40 e 60mg/kg pela via intravenosa, porém a via intraperitoneal também pode ser utilizada, sabendo-se que única injeção em doses menores de 40mg/kg é ineficaz (Furlan, 2001; Szkudelski, 2001). Embora estudos relatem que, na mesma dose utilizada em nosso estudo, cerca de 10 a 20% dos animais morrem devido à citotoxicidade da STZ, não ocorreram óbitos utilizando o protocolo com dose de 60mg/kg, pela via intraperitoneal, após três horas de jejum, no início do período claro em ratas da linhagem Wistar-Kyoto.

Animais isogênicos apresentam vantagens como a uniformidade fenotípica e genotípica, possibilitando a redução do número de animais necessários para os experimentos (Baptista *et al.*, 2011), porém encontramos o fenômeno chamado de depressão por endogamia em que é observado uma baixa fertilidade, uma vez que durante o desenvolvimento da endogamia, determinados alelos desfavoráveis são colocados em estado homozigoto (Benavides and Guénet, 2003). Assim, comparando a taxa de natalidade das fêmeas utilizadas em nosso estudo com os dados reprodutivos do Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, onde a linhagem de ratos Wistar-Kyoto produz ninhadas com média de 8 filhotes por parto, as fêmeas do grupo controle seguiram o padrão reprodutivo esperado. Já, as fêmeas diabéticas

induzidas apresentaram prolificidade menor. Calderon *et al.* (1992), utilizando o mesmo protocolo experimental em ratas, encontrou alta incidência de abortamentos e mortalidade pós-natal. Em nosso estudo, duas fêmeas diabéticas apresentaram três óbitos na ninhada após o parto, e outra diabética apresentou um óbito.

O retardo do crescimento intrauterino (RCIU) pode ocorrer em mães diabéticas. Um estudo com modelo gestacional induzido por STZ em ratas mostrou que as proles dessas fêmeas apresentam baixo peso na idade fetal de 21 dias (Salazar García *et al.*, 2015). Outro estudo avaliando ratas prenhes com glicemia acima de 120mg/dL (diabetes moderado induzido por STZ) mostrou uma alta taxa de animais com baixo peso ao nascer (Saito *et al.*, 2010). O mesmo foi visto por Song *et al.* (2012), ao avaliar a prole de ratas com diabetes gestacional induzida por STZ e glicemia acima de 360mg/dL, encontraram valores ponderais significativamente baixos.

Nosso estudo vai ao encontro dos resultados mencionados, pois os animais do grupo PoD apresentaram diminuição estatisticamente significativa do peso durante a fase de lactação (até 21 dias de idade). O RCIU pode ser explicado por hiperglicemia materna severa (acima de 300mg/dL), que conduz à depleção de pâncreas fetais funcionais, que leva à redução na produção de insulina, causando um insulto ao crescimento fetal (Song *et al.*, 2012). Em humanos o resultado da gravidez de mulheres com DM1 está associada com macrossomia, esse quadro deve-se provavelmente ao fato de que nas mulheres o quadro de hiperglicemia é moderado (Groen *et al.*, 2013). Estudos em ratos mostraram que em ratas diabéticas sem controle glicêmico adequado apresentou aumento do peso da prole (Knopp *et al.*, 1986).

Durante a gestação, o feto recebe glicose a partir do sangue da mãe. No caso de fêmeas diabéticas não tratadas, há o transporte de grande quantidade de glicose, como a insulina não atravessa a barreira placentária, o feto necessita produzir grandes quantidades de insulina (Lau *et al.*, 2007). Tal compensação continua sendo vista logo após o parto, podendo levar o animal a um quadro de hipoglicemia (Kelly *et al.*, 2005). Em nosso estudo, encontramos níveis glicêmicos aumentados nas primeiras 24 horas no grupo PoD, provavelmente refletindo a hiperglicemia materna, porém no 7º e 14º dias de vida, os filhotes apresentaram uma tendência à hipoglicemia, a qual foi significativa no 21º dia quando comparados aos filhotes do grupo PoC de mesma idade.

A proteína astrogliar S100B é um marcador de astrócitos maduros do tecido cerebral durante o período de desenvolvimento pós-natal (Donato, 2001; Feoli *et al.*, 2008). Neste estudo, encontramos no grupo PoD elevação dos níveis séricos de S100B nas primeiras 24h após o nascimento. Esses achados estão de acordo com o estudo desenvolvido por Zhou *et al.*, (2015) que mostrou níveis séricos de S100B elevados nas primeiras 24h de vida em neonatos prematuros humanos que apresentaram injúria cerebral. Sabe-se que, em relação ao desenvolvimento, ratos de 7 dias de idade são comparados a fetos humanos no terço final da gestação, assim as células gliais ainda não estão totalmente diferenciadas e a BHE ainda não está completamente desenvolvida. Além disso, a hiperglicemia plasmática aumenta a ligação de leucócitos ao endotélio, com isso há um aumento da permeabilidade vascular, pela produção de citocinas inflamatórias (Kim *et al.*, 1994; Willis *et al.*, 2004). Outro aspecto que pode potencializar a permeabilidade da barreira é o dano

aos astrócitos, que estimula a produção de citocinas inflamatórias as quais podem potencializar a permeabilidade da BHE (Ousman and David, 2001). Com isso a S100B do SNC pode atravessar com maior facilidade a barreira, resultando em altos níveis séricos dessa proteína (Gazzolo *et al.*, 2005).

O grupo de Portela demonstrou que níveis séricos de S100B em humanos hígidos são mais elevados em jovens e decrescem de acordo com a idade, devido a uma intensa proliferação e maturação glial nos juvenis (Netto *et al.*, 2006; Portela *et al.*, 2002). Essa mudança associada ao desenvolvimento também foi observada em nosso estudo, em filhotes de ratas controle e diabéticas, do nascimento aos 28 dias. Adicionalmente, nossos resultados mostraram no grupo PoD, com idade de 14 dias, uma queda de S100B sérica, em relação aos controles. Isto pode estar relacionado com menor quantidade de células da glia devido ao quadro de hiperglicemia pré-natal, pois, conforme o achado no estudo de Li *et al.* (1998), a hiperglicemia pode causar danos à células da glia.

No entanto, a S100B sérica reflete os níveis de secreção da proteína tanto do tecido cerebral como do tecido adiposo (Gonçalves *et al.*, 2010). Devido a limitações técnicas para a avaliação da secreção de S100B no tecido adiposo de ratos neonatos e pré-púberes, optamos por analisar a secreção de S100B no líquido. Na literatura, existem poucos estudos analisando a S100B no líquido cefalorraquidiano em ratos neonatos. Porém, há relatos de que esta proteína tem níveis liquóricos maiores em ratos de 15 dias, quando comparados com ratos de 30 dias de idade (Tramontina *et al.*, 2002; Vicente *et al.*, 2004). Nesta análise, os nossos grupos experimentais seguiram um perfil ontogenético similar, sem variação do nascimento aos 28 dias. Sugerindo que

queda sérica observada na proteína S100B deve envolver uma variação de secreção extracerebral (e.g. tecido adiposo) e talvez da permeabilidade da BHE.

Para melhor compreensão, analisamos os níveis de S100B no tecido hipocampal, que refletem a produção da proteína nesta região cerebral. No hipocampo, o perfil dos níveis de S100B se mostrou contrário ao que ocorreu no soro e no líquido cefalorraquidiano. Os animais mais jovens apresentam conteúdo menor de proteína no hipocampo, o qual aumenta de acordo com a idade, sendo o mesmo perfil observado em culturas primárias de astrócitos (Tramontina *et al.*, 2002). Esta proteína está diretamente relacionada com a sinaptogênese, processo que, em ratos, tem um pico na segunda semana de vida, sendo este evento metabólico um dos acontecimentos mais importantes para o desenvolvimento do SNC e indispensável para o processo de aprendizado e memória (Rice and Barone, 2000).

Vafaei-Nezhad *et al.* (2016), estudando as proles de ratas diabéticas, observaram um impacto negativo do DM na sinaptogênese em animais de 7 e 14 dias de idade. Estes achados corroboram com os resultados encontrados em nosso estudo, onde os valores de S100B foram baixos desde o nascimento, em ambos os grupos. Embora, o grupo PoD com 14 dias de idade tenha apresentado valores de S100B diminuídos, este quadro sofreu uma inversão no grupo PoD com 28 dias, ficando superior ao grupo PoC. Assim, podemos inferir que a hiperglicemia materna interferiu no desenvolvimento do número de células produtoras de S100B, diminuindo, talvez, sua ação neurotrófica durante as primeiras semanas de vida. Porém, podemos especular que na tentativa de compensar este déficit inicial, houve um aumento na produção de S100B a

partir dos 21 dias, sendo significativo apenas aos 28 dias. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, variações das concentrações da S100B extracelular podem afetar a sinaptogênese. Assim, a redução hipocampal da S100B no pico da sinaptogênese (15 dias) e/ou um aumento aos 28 dias podem ter contribuído ao prejuízo cognitivo observado.

A fim de compreender melhor os resultados e avaliar possíveis danos durante a sinaptogênese, analisamos a proteína GFAP, por ser um marcador específico de astrócitos. Em estudo com prole de ratas prenhes submetidas à dieta de baixa proteína foi observado um atraso no aparecimento e maturação de células GFAP-positivas no hipocampo, sugerindo que a diminuição desta proteína está associada com um atraso na astrocitogênese (Gressens *et al.*, 1997). No nosso estudo, os grupos PoD com 7 e PoD com 14 dias de vida apresentaram uma diminuição níveis de GFAP, e após este período os níveis começaram a subir. O mesmo comportamento foi observado nos níveis de S100B no hipocampo, conforme descrito anteriormente. A redução desses marcadores, particularmente GFAP, sugere um atraso do desenvolvimento astrogliar, também observado em outras condições de injúria pré-natal, como na desnutrição (Feoli *et al.*, 2008), intoxicação com metil-Hg (Vicente *et al.*, 2004) e exposição ao etanol (Brolese *et al.*, 2015).

Além dos testes bioquímicos, realizamos também testes comportamentais para avaliar o dano cognitivo causado pelo DM materno na prole. O teste do campo aberto é utilizado tanto para avaliar a capacidade motora, como a ansiedade dos animais. A capacidade motora é avaliada através da distância percorrida e do tempo em movimento. Em situações normais os animais preferem explorar a periferia da arena à região central.

Este comportamento, comum da natureza de roedores, é chamado de tigmotaxia. Por outro lado, o aumento do tempo gasto na parte central, bem como da relação da locomoção central/total são indicativos de comportamento ansioso (Prut and Belzung, 2003).

Em nosso estudo, avaliamos a capacidade motora dos animais a fim de comprovar se os resultados encontrados nos outros testes comportamentais não sofreriam interferência de possíveis alterações físicas dos animais. Não houve diferença estatística entre os grupos em relação aos parâmetros de tempo em movimento e distância percorrida. Já para avaliação da ansiedade, analisamos o tempo na periferia e o tempo no centro. Os animais oriundos de fêmeas diabéticas permaneceram mais tempo no centro, quando comparados aos animais oriundos de fêmeas controles. Este comportamento demonstra um perfil ansioso dos animais do grupo PoD.

Para avaliar o dano cognitivo causado nos animais PoD, realizamos o teste do reconhecimento de objetos. Este teste é bastante utilizado para avaliar o comportamento exploratório, percepção e memória de reconhecimento em modelos de roedores. Neste estudo, podemos observar que os animais PoD exploraram significativamente menos um novo objeto quando comparados com os animais do grupo PoC. Esses dados mostram que os animais PoD tem menor capacidade de reconhecer o objeto familiar. Assim, podemos inferir que os animais oriundos de fêmeas diabéticas apresentam um déficit cognitivo, indicado tanto pelos marcadores gliais (S100B e GFAP) como pelo teste cognitivo. Entretanto, não podemos excluir que o comportamento ansioso destes animais tenha afetado o desempenho na tarefa cognitiva.

Sabendo-se que o DM1 é uma patologia que atinge principalmente indivíduos infanto-juvenis, é importante a investigação da suscetibilidade dos animais oriundos de mães diabéticas ao DM1. O início precoce da doença é um forte preditor do grau dos prejuízos cognitivos na infância, na fase jovem e adulta (Biessels, 2013). O déficit de memória e aprendizado são observados em ratos na tarefa do labirinto aquático de Morris (*Water Maze*) e do reconhecimento do novo objeto (RO). Apresentando maior tempo de latência e maior deslocamento para alcançar a plataforma do *Water Maze*, e menor tempo de exploração no novo objeto no RO (Piazza *et al.*, 2011; Senna *et al.*, 2011), da mesma maneira que observamos em nosso estudo.

Em análises neuromorfológicas em animais adultos com DM1 são encontradas alterações neurais correlacionadas com disfunções cognitivas, como por exemplo, diminuição da neurogênese, da proliferação celular e apoptose neural, bem como diminuição da expressão da proteína GFAP (Li *et al.*, 2002; Malone *et al.*, 2008). A suscetibilidade a danos estruturais e cognitivos é maior na infância, devido ao desenvolvimento acelerado do SNC e na senilidade, pela presença de alterações neurodegenerativas (Biessels *et al.*, 2008).

O quadro de disfunção cognitiva e estrutural pode ser agravado pela presença de comorbidades que estão associadas a complicações a longo prazo, que afetam os olhos, rins, coração, vasos sanguíneos e nervos em pacientes diabéticos. O desenvolvimento dessas complicações depende da duração do diabetes e da qualidade do controle metabólico (McCall, 1992). Em casos de desequilíbrio metabólico e distúrbios vasculares o SNC pode apresentar maior suscetibilidade a doenças como o Alzheimer. As alterações

observadas nos animais do grupo PoD induziram a alterações moleculares que podem causar danos irreversíveis à plasticidade glial, aumentando a suscetibilidade desse indivíduos a insultos futuros, como trauma, isquemia, doença de Alzheimer e de Parkinson (Gispen and Biessels, 2000).

Dessa forma, nossas perspectivas envolvem a investigação de possíveis alterações intra e extracerebrais que possam ocorrer na vida adulta da prole oriunda de mães diabéticas. Juntamente com a avaliação da plasticidade sináptica pela dosagem de sinaptofisina, e da resistência insulínica pela avaliação do grau de fosforilação do substrato do receptor de insulina, objetivando melhor compreender os efeitos causados pelo DM1 durante a gestação em filhotes, tanto na infância como na fase adulta e senil.

6. Conclusões

Os dados obtidos através deste estudo nos permitiram:

- (i) padronizar o modelo de *diabetes* mellitus tipo I em ratas da linhagem isogênica Wistar-Kyoto;
- (ii) demonstrar que animais oriundos de mães diabéticas tipo I têm baixo peso ao nascer e até o final do período de lactação;
- (iii) inferir que, com 1 dia de idade, os neonatos oriundos de ratas hiperglicêmicas apresentam reflexos dos níveis glicêmicos maternos;
- (iv) confirmar, através de dosagem de proteínas ligadas à plasticidade neuroglial (S100B e GFAP) e de testes comportamentais, que o diabetes mellitus tipo I materno causa alterações ao SNC, podendo induzir déficit cognitivo.

7. Referências

Abdelmalik, P.A., Burnham, W.M., and Carlen, P.L. (2005). Increased seizure susceptibility of the hippocampus compared with the neocortex of the immature mouse brain in vitro. *Epilepsia* *46*, 356–366.

Andreollo, N.A., Santos, E.F. dos, Araújo, M.R., and Lopes, L.R. (2012). Rat's age versus human's age: what is the relationship? *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig. São Paulo* *25*, 49–51.

Aragno, M., Parola, S., Tamagno, E., Brignardello, E., Manti, R., Danni, O., and Boccuzzi, G. (2000). Oxidative derangement in rat synaptosomes induced by hyperglycaemia: restorative effect of dehydroepiandrosterone treatment. *Biochem. Pharmacol.* *60*, 389–395.

Austin, E.J., and Deary, I.J. (1999). Effects of repeated hypoglycemia on cognitive function: a psychometrically validated reanalysis of the Diabetes Control and Complications Trial data. *Diabetes Care* *22*, 1273–1277.

Bailey, C.H., and Chen, M. (1991). Morphological Aspects of Synaptic Plasticity in *Aplysia* An Anatomical Substrate for Long-Term Memory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *627*, 181–196.

Baptista, A.B., Morita, E.L., Passos, C.C., Ferreira, A.O., Alves, F.R., Alves, A.J., Miglino, M.A., and Guerra, R.R. (2011). Efeito da fotoperiodicidade na taxa de prenhez em ratos isogênicos (F344). *Ciênc. Rural* *41*, 171–175.

Barbosa, J., and Santamaria, P. (1989). Diabetes mellitus type I. The present and the future. *Acta Médica Port. Suppl* *1*, 51S – 55S.

Baydas, G., Canatan, H., and Turkoglu, A. (2002). Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. *J. Pineal Res.* *32*, 225–230.

Bayer, S.A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J. Comp. Neurol.* *190*, 115–134.

Benavides, F.J., and Guénet, J.-L. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio. Princ. Básicos Apl. Univ. AlcaláLinks.

Biessels, G.J. (2013). Sweet memories: 20 years of progress in research on cognitive functioning in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* *719*, 153–160.

Biessels, G.-J., Kamal, A., Urban, I.J.A., Spruijt, B.M., Erkelens, D.W., and Gispen, W.H. (1998). Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res.* *800*, 125–135.

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

Bonilla, C., Lawlor, D.A., Ben-Shlomo, Y., Ness, A.R., Gunnell, D., Ring, S.M., Smith, G.D., and Lewis, S.J. (2012). Maternal and offspring fasting glucose and type 2 diabetes-associated genetic variants and cognitive function at age 8: a Mendelian

randomization study in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *BMC Med. Genet.* 13, 90.

Borsoi, M., Antonio, C.B., Viana, A.F., Nardin, P., Gonçalves, C.-A., and Rates, S.M.K. (2015). Immobility behavior during the forced swim test correlates with BDNF levels in the frontal cortex, but not with cognitive impairments. *Physiol. Behav.* 140, 79–88.

ter Braak, E.W.M.T., Evers, I.M., Willem Erkelens, D., and Visser, G.H.A. (2002). Maternal hypoglycemia during pregnancy in type 1 diabetes: maternal and fetal consequences. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 18, 96–105.

Brolese, G., Lunardi, P., de Souza, D.F., Lopes, F.M., Leite, M.C., and Gonçalves, C.-A. (2015). Pre- and postnatal exposure to moderate levels of ethanol can have long-lasting effects on hippocampal glutamate uptake in adolescent offspring. *PLoS One* 10, e0127845.

Byravan, S., Foster, L.M., Phan, T., Verity, A.N., and Campagnoni, A.T. (1994). Murine oligodendroglial cells express nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 8812–8816.

Calderon, I.M.P., Rudge, M.V.C., Brasil, M.A.M., and Henry, M.A.C.A. (1992). Diabetes e gravidez experimental em ratas: I. Indução do diabetes, obtenção e evolução da prenhez. *Acta Cirúrgica Bras.* 7, 142–146.

Chmiel-Perzyńska, I., Perzyński, A., and Urbańska, E.M. (2014). Experimental diabetes mellitus type 1 increases hippocampal content of kynurenic acid in rats. *Pharmacol. Rep. PR* 66, 1134–1139.

Chu, Y., Jin, X., Parada, I., Pesic, A., Stevens, B., Barres, B., and Prince, D.A. (2010). Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 7975–7980.

Claycomb, K.I., Johnson, K.M., Winokur, P.N., Sacino, A.V., and Crocker, S.J. (2013). Astrocyte Regulation of CNS Inflammation and Remyelination. *Brain Sci.* 3, 1109–1127.

Dekaban, A.S., and Sadowsky, D. (1978). Changes in brain weights during the span of human life: Relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann. Neurol.* 4, 345–356.

Dobbing, J., and Sands, J. (1971). Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Biol. Neonate* 19, 363–378.

Dobbing, J., and Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3, 79–83.

Donato, R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 637–668.

Donato, R., Sorci, G., Riuizi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., and Giambanco, I. (2009). S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 1008–1022.

Dörner, G., and Plagemann, A. (1994). Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 26, 213–221.

Eagleson, K.L., Lillien, L., Chan, A.V., and Levitt, P. (1997). Mechanisms specifying area fate in cortex include cell-cycle-dependent decisions and the capacity of progenitors to express phenotype memory. *Dev. Camb. Engl.* 124, 1623–1630.

Elsayed, M., and Magistretti, P.J. (2015). A New Outlook on Mental Illnesses: Glial Involvement Beyond the Glue. *Front. Cell. Neurosci.* 468.

Ennis, K., Tran, P.V., Seaquist, E.R., and Rao, R. (2008). Postnatal age influences hypoglycemia-induced neuronal injury in the rat brain. *Brain Res.* 1224, 119–126.

Feoli, A.M., Leite, M.C., Tramontina, A.C., Tramontina, F., Posser, T., Rodrigues, L., Swarowsky, A., Quincozes-Santos, A., Leal, R.B., Gottfried, C., et al. (2008). Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition. *Brain Res.* 1187, 33–41.

Furlan, M.M.D.P. (2001). A estreptozotocina como agente diabetogênico. *Arq Ciênc. Saúde UNIPAR* 5, 197–201.

Gauthier, E.L. (2014). *Streptozotocin: Uses, Mechanism of Action and Side Effects* (Nova Science Publishers, Incorporated).

Gazzolo, D., Lituania, M., Bruschetini, M., Ciotti, S., Sacchi, R., Serra, G., Calevo, M.G., Corvino, V., Buonocore, G., and Michetti, F. (2005). S100B protein levels in saliva: correlation with gestational age in normal term and preterm newborns. *Clin. Biochem.* 38, 229–233.

Georgieff, M.K. (2007). Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 614S – 620S.

Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., and Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 7.

Gispén, W.H., and Biessels, G.-J. (2000). Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci.* 23, 542–549.

Glaser, N., Lo, W., Tancredi, D., Orgain, M., Puvenna, V., Janigro, D., and O'Donnell, M. (2015). Levels of S100B in brain and blood of rats with diabetic ketoacidosis. *Brain Res.* 1624, 536–544.

Gonçalves, C.A., Leite, M.C., and Guerra, M.C. (2010). Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* 2010, 790431.

Greenwood, C.E., and Winocur, G. (2005). High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiol. Aging* 26, 42–45.

Gressens, P., Muaku, S.M., Besse, L., Nsegbe, E., Gallego, J., Delpech, B., Gaultier, C., Evrard, P., Ketelslegers, J.-M., and Maiter, D. (1997). Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Dev. Brain Res.* 103, 21–35.

- Groen, B., Links, T.P., Lefrandt, J.D., van den Berg, P.P., de Vos, P., and Faas, M.M. (2013). Aberrant Pregnancy Adaptations in the Peripheral Immune Response in Type 1 Diabetes: A Rat Model. *PLoS ONE* 8.
- Haroutunian, V., Katsel, P., Roussos, P., Davis, K.L., Altshuler, L.L., and Bartzokis, G. (2014). Myelination, oligodendrocytes, and serious mental illness. *Glia* 62, 1856–1877.
- Hawkins, B.T., Lundeen, T.F., Norwood, K.M., Brooks, H.L., and Egleton, R.D. (2006). Increased blood–brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia* 50, 202–211.
- Jacobson, M. (1991). Formation of Dendrites and Development of Synaptic Connections. In *Developmental Neurobiology*, (Springer US), pp. 223–283.
- Kamiyama, S., Ishiguro, K., Kawakami, Y., Kobayashi, S., Yamada, F., and Takahashi, E. (1965). Experimental studies of the effect of calcium deficient diet on the development of cerebrovascular diseases. *Tohoku J. Exp. Med.* 86, 51–64.
- Kelly, L., Evans, L., and Messenger, D. (2005). Controversies around gestational diabetes. *Can. Fam. Physician* 51, 688–695.
- Kim, J.A., Berliner, J.A., Natarajan, R.D., and Nadler, J.L. (1994). Evidence that glucose increases monocyte binding to human aortic endothelial cells. *Diabetes* 43, 1103–1107.
- Kirsten, V.R., Sesterheim, P., and Saitovitch, D. (2010). Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. *Med. Ribeirao Preto Online* 43, 3–10.
- Knopp, R.H., Warth, M.R., Charles, D., Childs, M., Li, J.R., Mabuchi, H., and Van Allen, M.I. (1986). Lipoprotein Metabolism in Pregnancy, Fat Transport to the Fetus, and the Effects of Diabetes. *Neonatology* 50, 297–317.
- Lau, D.C.W., Douketis, J.D., Morrison, K.M., Hramiak, I.M., Sharma, A.M., and Ur, E. (2007). 2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children [summary]. *CMAJ Can. Med. Assoc. J.* 176, S1–S13.
- Leite, M.C., Galland, F., Brolese, G., Guerra, M.C., Bortolotto, J.W., Freitas, R., Almeida, L.M.V. de, Gottfried, C., and Gonçalves, C.-A. (2008). A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J. Neurosci. Methods* 169, 93–99.
- Li, P.A., Gisselsson, L., Keuker, J., Vogel, J., Smith, M.L., Kuschinsky, W., and Siesjö, B.K. (1998). Hyperglycemia-exaggerated ischemic brain damage following 30 min of middle cerebral artery occlusion is not due to capillary obstruction. *Brain Res.* 804, 36–44.
- Li, Z.-G., Zhang, W., Grunberger, G., and Sima, A.A.F. (2002). Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res.* 946, 221–231.
- Liedtke, W., Edelman, W., Bieri, P.L., Chiu, F.C., Cowan, N.J., Kucherlapati, R., and Raine, C.S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17, 607–615.
- Macintosh, M.C.M., Fleming, K.M., Bailey, J.A., Doyle, P., Modder, J., Acolet, D., Golightly, S., and Miller, A. (2006). Perinatal mortality and congenital anomalies in

babies of women with type 1 or type 2 diabetes in England, Wales, and Northern Ireland: population based study. *BMJ* 333, 177.

Malone, J.I., Hanna, S., Saporta, S., Mervis, R.F., Park, C.R., Chong, L., and Diamond, D.M. (2008). Hyperglycemia not hypoglycemia alters neuronal dendrites and impairs spatial memory. *Pediatr. Diabetes* 9, 531–539.

Mathiesen, E.R., Ringholm, L., and Damm, P. (2011). Stillbirth in diabetic pregnancies. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25, 105–111.

Mazzini, G.S., Schaf, D.V., Oliveira, Á.R., Gonçalves, C.A., Belló-Klein, A., Bordignon, S., Bruch, R.S., Campos, G.F., Vassallo, D.V., Souza, D.O., et al. (2005). The ischemic rat heart releases S100B. *Life Sci.* 77, 882–889.

McCall, A.L. (1992). The Impact of Diabetes on the CNS. *Diabetes* 41, 557–570.

McConnell, S.K. (1990). The specification of neuronal identity in the mammalian cerebral cortex. *Experientia* 46, 922–929.

McElduff, A., Ross, G.P., Lagström, J.A., Champion, B., Flack, J.R., Lau, S.-M., Moses, R.G., Seneratne, S., McLean, M., and Cheung, N.W. (2005). Pregestational Diabetes and Pregnancy An Australian experience. *Diabetes Care* 28, 1260–1261.

McEwen, B.S., Magariños, A.M., and Reagan, L.P. (2002). Studies of hormone action in the hippocampal formation: possible relevance to depression and diabetes. *J. Psychosom. Res.* 53, 883–890.

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

Michael Weindling, A. (2009). Offspring of diabetic pregnancy: Short-term outcomes. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 14, 111–118.

Miller, D.J., Duka, T., Stimpson, C.D., Schapiro, S.J., Baze, W.B., McArthur, M.J., Fobbs, A.J., Sousa, A.M.M., Šestan, N., Wildman, D.E., et al. (2012). Prolonged myelination in human neocortical evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 16480–16485.

Mills, J.L. (1982). Malformations in infants of diabetic mothers. *Teratology* 25, 385–394.

Moore, L.L., Bradley, M.L., Singer, M.R., Rothman, K.J., and Milunsky, A. (2002). Chromosomal anomalies among the offspring of women with gestational diabetes. *Am. J. Epidemiol.* 155, 719–724.

Herschkowitz, N., Kagen, J., and Zilles, K. (1997). Neurobiological bases of behavioral development in the first year. *Neuropediatrics* 28, 296–306.

Nardin, P., Tortorelli, L., Quincozes-Santos, A., de Almeida, L.M.V., Leite, M.C., Thomazi, A.P., Gottfried, C., Wofchuk, S.T., Donato, R., and Gonçalves, C.-A. (2009). S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K(+). *Neurochem. Res.* 34, 1603–1611.

Nelson, R.W., and Reusch, C.E. (2014). Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *J. Endocrinol.* 222, T1–T9.

- Netto, C.B.O., Portela, L.V., Félix, T.M., Souza, D.O., Gonçalves, C.-A., and Giugliani, R. (2006). Serum S100B levels in patients with neural tube defects. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 364, 275–278.
- Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S., and Itohara, S. (2002). Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 4037–4042.
- Norton, W.T., Aquino, D.A., Hozumi, I., Chiu, F.C., and Brosnan, C.F. (1992). Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem. Res.* 17, 877–885.
- O'Rourke, N.A., Dailey, M.E., Smith, S.J., and McConnell, S.K. (1992). Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. *Science* 258, 299–302.
- Orthmann-Murphy, J.L., Abrams, C.K., and Scherer, S.S. (2008). Gap Junctions Couple Astrocytes and Oligodendrocytes. *J. Mol. Neurosci.* 35, 101–116.
- Ousman, S.S., and David, S. (2001). MIP-1 α , MCP-1, GM-CSF, and TNF- α Control the Immune Cell Response That Mediates Rapid Phagocytosis of Myelin from the Adult Mouse Spinal Cord. *J. Neurosci.* 21, 4649–4656.
- Piazza, F.V., Pinto, G.V., Trott, G., Marcuzzo, S., Gomez, R., and Fernandes, M. da C. (2011). Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behav. Brain Res.* 217, 16–20.
- Plagemann, A. (2011). Maternal diabetes and perinatal programming. *Early Hum. Dev.* 87, 743–747.
- Portela, L.V.C., Tort, A.B.L., Schaf, D.V., Ribeiro, L., Nora, D.B., Walz, R., Rotta, L.N., Silva, C.T., Busnello, J.V., Kapczinski, F., et al. (2002). The Serum S100B Concentration Is Age Dependent. *Clin. Chem.* 48, 950–952.
- Prut, L., and Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.
- Quinn, R. (2005). Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition* 21, 775–777.
- Rajkowska, G., and Miguel-Hidalgo, J.J. (2007). Gliogenesis and Glial Pathology in Depression. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 6, 219–233.
- Ramírez-López, M.T., Vázquez, M., Bindila, L., Lomazzo, E., Hofmann, C., Blanco, R.N., Alén, F., Antón, M., Decara, J., Ouro, D., et al. (2016). Exposure to a Highly Caloric Palatable Diet During Pregestational and Gestational Periods Affects Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Adiposity and Anxiety-Like Behaviors in Male Rat Offspring. *Front. Behav. Neurosci.* 339.
- Rice, D., and Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 Suppl 3, 511–533.
- Saito, F.H., Damasceno, D.C., Kempinas, W.G., Morceli, G., Sinzato, Y.K., Taylor, K.N., and Rudge, M.V. (2010). Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2, 26.

Sakata, N., Yoshimatsu, G., Tsuchiya, H., Egawa, S., and Unno, M. (2012). Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation. *Exp. Diabetes Res.* 2012, 256707.

Salazar García, M., Reyes Maldonado, E., Revilla Monsalve, M.C., Villavicencio Guzmán, L., Reyes López, A., and Sánchez-Gómez, C. (2015). Importance of Maternal Diabetes on the Chronological Deregulation of the Intrauterine Development: An Experimental Study in Rat. *J. Diabetes Res.* 2015.

Saleem Mir, M., Maqbool Darzi, M., Khalil Baba, O., Khan, H.M., Kamil, S.A., Sofi, A.H., and Wani, S.A. (2015). Streptozotocin Induced Acute Clinical Effects in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Iran. J. Pathol.* 10, 206–213.

Sengupta, P. (2015). A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age? *Biomed. Int.* 2.

Senna, P.N. de, Ilha, J., Baptista, P.P.A., Nascimento, P.S. do, Leite, M.C., Paim, M.F., Gonçalves, C.A., Achaval, M., and Xavier, L.L. (2011). Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab. Brain Dis.* 26, 269–279.

Sesterheim, P., Saitovitch, D., and Staub, H.L. (2007). Diabetes Mellitus Tipo 1: multifatores que conferem susceptibilidade à patogénia autoimune. *Sci. Medica* 17, 212–217.

Sima, A.A.F. (2010). Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol.* 47, 279–293.

Song, Y., Li, J., Zhao, Y., Zhang, Q., Liu, Z., Li, J., Chen, X., Yang, Z., Yu, C., Xiao, X., et al. (2012). Severe Maternal Hyperglycemia Exacerbates the Development of Insulin Resistance and Fatty Liver in the Offspring on High Fat Diet, Severe Maternal Hyperglycemia Exacerbates the Development of Insulin Resistance and Fatty Liver in the Offspring on High Fat Diet. *J. Diabetes Res.* 2012, 2012, e254976.

Suzuki, T., Sekido, H., Kato, N., Nakayama, Y., and Yabe-Nishimura, C. (2004). Neurotrophin-3-induced production of nerve growth factor is suppressed in Schwann cells exposed to high glucose: involvement of the polyol pathway. *J. Neurochem.* 91, 1430–1438.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50, 537–546.

Tramontina, F., Conte, S., Gonçalves, D., Gottfried, C., Portela, L.V., Vinade, L., Salbego, C., and Gonçalves, C.-A. (2002). Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 373–378.

Tramontina, F., Leite, M.C., Cereser, K., de Souza, D.F., Tramontina, A.C., Nardin, P., Andreazza, A.C., Gottfried, C., Kapczinski, F., and Gonçalves, C.-A. (2007). Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J. Neurosci. Methods* 162, 282–286.

Vafaei-Nezhad, S., Hami, J., Sadeghi, A., Ghaemi, K., Hosseini, M., Abedini, M.R., and Haghiri, H. (2016). The impacts of diabetes in pregnancy on hippocampal synaptogenesis in rat neonates. *Neuroscience*.

Vallés, S., Sancho-Tello, M., Miñana, R., Climent, E., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (1996). Glial fibrillary acidic protein expression in rat brain and in radial glia culture is delayed by prenatal ethanol exposure. *J. Neurochem.* 67, 2425–2433.

Van Belle, T.L., Taylor, P., and von Herrath, M.G. (2009). Mouse models for Type 1 Diabetes. *Drug Discov. Today Dis. Models* 6, 41–45.

Van Eldik, L.J., and Wainwright, M.S. (2003). The Janus face of glial-derived S100B: Beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor. Neurol. Neurosci.* 21, 97–108.

Ventura, R.E., and Goldman, J.E. (2006). Telencephalic oligodendrocytes battle it out. *Nat. Neurosci.* 9, 153–154.

Vicente, É., Boer, M., Leite, M., Silva, M., Tramontina, F., Porciúncula, L., Dalmaz, C., and Gonçalves, C.-A. (2004). Cerebrospinal Fluid S100B Increases Reversibly in Neonates of Methyl Mercury-Intoxicated Pregnant Rats. *NeuroToxicology* 25, 771–777.

Vlassara, H., and Palace, M. r. (2002). Diabetes and advanced glycation endproducts. *J. Intern. Med.* 251, 87–101.

Vorhees, C.V. (1986). Principles of Behavioral Teratology. In *Handbook of Behavioral Teratology*, E.P. Riley, and C.V. Vorhees, eds. (Springer US), pp. 23–48.

Watson, R.E., Desesso, J.M., Hurtt, M.E., and Cappon, G.D. (2006). Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 77, 471–484.

Willis, C.L., Nolan, C.C., Reith, S.N., Lister, T., Prior, M.J.W., Guerin, C.J., Mavroudis, G., and Ray, D.E. (2004). Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia* 45, 325–337.

Xue, H., Wang, J., Zhuang, Y., and Gao, G. (2014). [Hippocampal neuron damage and cognitive dysfunction of diabetic Wistar rats]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi J. Biomed. Eng. Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 31, 1305–1309.

Zhang, K., and Sejnowski, T.J. (2000). A universal scaling law between gray matter and white matter of cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 5621–5626.

Zhou, W., Li, W., Qu, L.-H., Tang, J., Chen, S., and Rong, X. (2015). Relationship of plasma S100B and MBP with brain damage in preterm infants. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 16445–16453.

Zhu, H., Yu, L., He, Y., and Wang, B. (2014). Nonhuman primate models of type 1 diabetes mellitus for islet transplantation. *J. Diabetes Res.* 2014, 785948.

(2015). Introduction. *Diabetes Care* 38, S1–S2.