

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL

STTEFANY NAYARA SANT'ANA DE FARIA

Proteínas diferencialmente expressas no cérebro após dieta rica em  
carboidratos refinados e tratamento com glibenclamida

Ituiutaba - MG  
Novembro - 2023

STTEFANY NAYARA SANT'ANA DE FARIA

Proteínas diferencialmente expressas no cérebro após dieta rica em  
carboidratos refinados e tratamento com glibenclamida

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da  
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção  
do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Karen Calábria

Ituiutaba - MG  
Novembro - 2023

STTEFANY NAYARA SANT'ANA DE FARIA

Proteínas diferencialmente expressas no cérebro após dieta rica em carboidratos refinados e  
tratamento com glibenclamida

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da  
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção  
do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba, 10 de novembro de 2023

Banca Examinadora:

---

Dra. Luciana Karen Calábria (UFU)

---

Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau (UFMG)

---

Ms. Alexandre Santos Bruno (UFMG)

---

Ms. Leticia Rodrigues Pinheiro (UNESP)

*Dedico este trabalho ao meu avô Noecio  
Divino Sant'Ana (in memoriam)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por toda porta que ele abriu em meu caminho e todo o discernimento para tomar as decisões certas.

Agradeço aos meus pais por todo o apoio durante essa trajetória que sabemos que não foi fácil, por me amarem e cuidarem de mim.

Aos meus avós Ana e Noécio que cuidaram de mim desde o meu primeiro minuto de vida, escolheram meu nome, viram meu primeiro passo, primeira palavra, sempre cuidaram e me amaram. Sou grata a vocês por todo o apoio e amor, e mesmo que meu avô nos tenha deixado tão cedo sei que ele estaria orgulhoso dessa conquista tão importante para a minha vida e formação acadêmica, a qual ele sempre incentivou e apoiou. Te amo, vovô, sinto sua falta a todo momento e a cada conquista.

Agradeço às minhas irmãs, Mariana e Kathylen, por mesmo não tendo o mínimo interesse pelo assunto, me ouviram falar tantas vezes sobre esse trabalho e pelo apoio incondicional de vocês.

Ao meu tio/padrinho Nixon, por ter me apoiado durante toda a minha vida e também cuidado de mim. A minha tia/madrinha Gracielen, por ter me apoiado ao longo dessa jornada.

Agradecimento aos amigos, a Paula por ser minha companheira de laboratório, sou grata por termos uma a outra em cada um dos surtos; Elyab por me aguentar por esses longos quase quatorze anos de amizade; Sarah Maria por ter entrado na minha vida e por termos compartilhado tantas alegrias; Ana Clara por estar presente em tantos momentos decisivos da minha vida; Vitoria te agradeço por ser sempre companheira e pelos nossos papos de quarta e Vitor por todas as risadas e palhaçadas ao longo desses últimos anos. Vocês tornaram essa trajetória mais leve.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Luciana Karen Calábria, por toda a paciência, ensinamentos e apoio ao longo dessa trajetória, pelo incentivo a cada vez que era necessário repetir o experimento, a cada palavra amiga em momentos em que me sentia perdida. Meus sinceros agradecimentos, sem você nada disso seria possível. Também não poderia deixar de agradecer ao Prof. Dr. Alexandre Azenha que esteve presente em vários momentos dessa caminhada.

Agradeço ao grupo PET Bio Pontal, que me ajudou em diversos aspectos da minha vida. Sou grata a cada membro, atividade e momento que tivemos de lidar com as nossas diferenças, pois esses momentos ajudaram todos a amadurecerem. Não poderia deixar de agradecer a nossa

tutora Prof. Dra. Gabriela Lícia, por todo o apoio e carinho que nos foi dado, por sempre estar presente quando eu precisava de ajuda.

Agradeço também ao Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau (UFMG) por ter doado os cérebros dos camundongos que foram utilizados na realização deste trabalho, ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola (UFU) pelos equipamentos de eletroforese unidimensional e à Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Avila pelos reagentes para confecção do gel de poliacrilamida (UFU).

À UFU, agradeço pela oportunidade de estudar aqui e por ter oferecido um ambiente criativo e amigável, bem como pela bolsa concedida ao nosso grupo PET.

Aos animais utilizados neste trabalho, minha mais profunda gratidão e respeito.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigado!

## **APRESENTAÇÃO**

O formato deste Trabalho de Conclusão de Curso cumpre as normas aprovadas pelo Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia (Portaria COBIP N° 18, de 13 de setembro de 2023).

Este trabalho foi redigido no formato de artigo científico, em português, respeitando as normas da Bioscience Journal, as quais podem ser acessadas no endereço eletrônico <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/about/submissions>. O manuscrito representa o estudo na íntegra e será submetido para publicação somente após as considerações dos membros da banca examinadora.

## RESUMO

O consumo mundial de açúcar está acima do recomendado, segundo a Organização Mundial da Saúde. No entanto, pouco se sabe sobre seus efeitos no sistema nervoso central quanto à expressão de proteínas. A fim de investigar a expressão diferencial de proteínas no cérebro de camundongos Balb/c alimentados com uma dieta rica em carboidratos refinados e tratados com glibenclamida, ensaio bioquímico foi realizado com o sobrenadante desse tecido. Camundongos machos foram alimentados com dieta *high carbohydrate* durante oito semanas e tratados ou não com glibenclamida (20 mg/kg) por 4 semanas. Os animais foram eutanasiados por decapitação sob anestesia. Os cérebros foram homogeneizados em solução tampão Tris-HCl pH 7,5 seguido de centrifugação. Alíquota do sobrenadante foi submetida à dosagem de proteína total e o restante da amostra foi tratada com tampão desnaturante. Para SDS-PAGE 12,5%, 10 µg/µL de proteína foram aplicadas em cada poço e após a corrida, o gel foi corado e descorado. A medida de referência das bandas do gel foi feita usando padrão de massa molecular relativa (MW, SDS-7B2). As bandas diferenciais foram analisadas no programa Scion e a expressão em pixel foi analisada em médias e pelo teste *t* utilizando o software BioEstat, sendo valores de  $p < 0,05$  considerados significativos. A comparação do perfil eletroforético revelou as mesmas bandas proteicas nos grupos controle e tratado com glibenclamida, porém com expressão diferencial, sendo elas estimadas com massa molecular (em kDa) de 91,4; 86,2; 72,1; 58,6; 53,6; 44,8; 42,2; 39,8; 27,1 e 18,9. As proteínas estimadas em 44,8; 42,2 e 39,8 KDa estão mais significativamente expressas no cérebro dos indivíduos tratados com glibenclamida, uma sulfonilureia indicada no tratamento da hiperglicemia e do diabetes *mellitus*. Essas proteínas diferenciais são candidatas à análise proteômica e são alvo de futuros estudos de predição e biologia computacional.

**Palavras-chave:** Sulfonilureia. Dieta isocalórica. Perfil eletroforético.

## ABSTRACT

The global consumption of sugar is above the recommended, according to the World Health Organization. However, little is known about its effects on the central nervous system as the expression of proteins. In order to investigate the differential expression of proteins on mice Balb/c brain fed with a diet rich in refined carbohydrates and treated with glibenclamide, a biochemical assay has been performed with the supernatant of this tissue. Male mice were fed with high carbohydrate diet for eight weeks and treated or not with glibenclamide (20 mg/kg) for four weeks. The animals were euthanized by decapitation under anesthesia. The brains were homogenized in buffer solution Tris-HCl pH 7.5 followed by centrifugation. Aliquot of the supernatant was submitted to dosage of total protein and the remaining sample were treated with buffer denaturant. To SDS-PAGE 12.5%, 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  of protein were loaded in which well and after the process is over, the gel was stained and discolored. The reference measure of the gel bands was made using relative molecular mass pattern (MW, SDS-7B2). The differential bands were analyzed in the software Scion and the expression in pixel were analyzed in averages and by the teste *t* using the software BioEstat, whereas values of  $p < 0,05$  were considered significant. The electrophoretic profile comparison revealed the same protein bands in the control group and the treated with glibenclamide, although with differential expression, these being estimated with molecular mass (in kDa) de 91.4, 86.2, 72.1, 58.6, 53.6, 44.8, 42.2, 39.8, 27.1 and 18.9. The proteins estimated in 44.8, 42.2 and 39.8 KDa are more significant expressed in the brain of the specimen treated with glibenclamide, one sulphonylurea indicated in the treatment of hyperglycemia and of diabetes *mellitus*. These differential proteins are candidates for proteomic analysis and are target for futures studies of prediction and computational biology.

**Keywords:** Sulphonylurea. Isocaloric diet. Electrophoretic profile.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 METODOLOGIA.....	13
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4 CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	23

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o consumo de açúcar em todo o mundo está muito acima do recomendado, devido principalmente às bebidas açucaradas (Dhingra *et al.*, 2007; Vartaniam; Schwartz; Brownell, 2007). É de suma importância analisar as consequências desse consumo excessivo de alimentos ricos em carboidratos refinados e, por isso, diversas pesquisas em relação a esse tema têm sido realizadas (Polacow, 2006; Araújo; Silva; Souza, 2022; Dourado *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2023).

Já é confirmado que o consumo excessivo de carboidratos refinados pode levar ao desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, como o diabetes *mellitus* e a obesidade (Sartorelli; Cardoso, 2006; BRASIL, 2022), mas também pode afetar a fisiologia de órgãos e tecidos específicos, como o cérebro. Apesar do estudo realizado por Rosa *et al.* (2014) revelar que o tratamento com a dieta hipercalórica não causa alterações significativas na glicemia e na concentração de glicogênio hepático, esta mesma dieta influenciou na resposta de animais no teste de reconhecimento de objetos e nos níveis séricos aumentados de glicose e leptina, indicando ser prejudicial para a memória (Zanini *et al.*, 2017).

O tratamento do diabetes *mellitus* e da obesidade depende de uma abordagem farmacológica e existem diferentes drogas que podem ser usadas, incluindo a glibenclamida. Esta sulfonilureia é usada no tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 (Riddle, 2003), uma doença caracterizada pela irregularidade no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos em consequência da deficiência de ação e/ou secreção da insulina (McLellan *et al.*, 2007). Além disso, existem evidências de que as sulfonilureias diminuem a secreção de glucagon (Müller, 2000).

A glibenclamida age inibindo canais de íons potássio sensíveis ao ATP (adenosina trifosfato) nas células-beta pancreáticas, despolarizando-as e fazendo com que ocorra um influxo de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), aumentando a sua concentração intracelular, o que promove exocitose dos grânulos de insulina (Ashcroft, 2005).

Os efeitos do tratamento com a glibenclamida, independente da condição sustentada ao animal, já foram investigados em diferentes estruturas (Diego, 2007; Silva *et al.*, 2007; Castor, 2019; Rosado, 2019; Costa, 2020). Por exemplo, no coração, em que a dieta rica em carboidratos refinados causou dano morfofuncional, sendo revertido com a administração da glibenclamida, sem alterar o teste de resistência à insulina. Isso mostra que essa droga é promissora para evitar o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Castor, 2019). Nos rins, a glibenclamida atenua agudamente a agressão renal (Diego, 2007), enquanto em gestantes essa

droga foi efetiva no tratamento do diabetes *mellitus* e menor ganho de peso durante a gestação (Silva, 2007).

Já no cérebro, não foram observadas diferenças no desfecho cognitivo e funcional em pacientes com aneurisma tratados com glibenclamida (Costa, 2020). Porém no estudo realizado por Costa *et al.* (2014) revelou que alterações estruturais no hipocampo e no córtex pré-frontal em decorrência da hiperglicemia são reversíveis após o tratamento com a sulfonilureia, influenciando na expressão da proteína miosina-IIb, uma forma de miosina predominante no cérebro envolvida no transporte de vesículas nos neurônios, na migração celular e citocinese durante a divisão celular, dentre outras funções.

A glibenclamida pode exercer efeitos sobre a neuroinflamação e aspectos comportamentais induzidos pelo estresse. Rosado (2019) revelou que a droga é capaz de prevenir comportamentos do tipo depressivo e reverter o aumento de IL-1 $\beta$ , bem como nos níveis dos receptores de glicocorticoides no córtex pré-frontal.

Apesar de todas as confirmações quanto ao efeito prejudicial da dieta rica em carboidratos refinados e dos inúmeros benefícios do uso da glibenclamida, para o cérebro ainda pouco se conhece sobre as vias metabólicas envolvidas e que são afetadas pela ação da droga associada ou não a dieta ou a patologias. Nesse sentido, esse trabalho investigou o cérebro de camundongos Balb/c alimentados com uma dieta rica em carboidratos refinados e tratados com glibenclamida, utilizando ferramentas de análise bioquímica e biologia computacional para predizer proteínas diferencialmente expressas.

## 2 METODOLOGIA

### *Animais e delineamento experimental*

Os ensaios com camundongos machos da linhagem Balb/c com seis semanas de idade foram realizados no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em 2017. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia com temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) controladas, com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o número de protocolo 389/2016.

O estudo inicial foi conduzido para avaliar se a dieta isocalórica leva à disfunção cardíaca e à ativação do inflamassoma NLRP3 (*NOD-like receptor family pyrin-domain-containing-3*) realizado por Castor (2019). Essa dieta é composta de 45% de ração padrão para roedores moída, 45% de leite condensado Nestlé e 10% de açúcar refinado União (Oliveira *et al.*, 2013). Essa dieta é isocalórica em relação à padrão com adição de 30% de sacarose, que não está presente na dieta padrão. A fim de avaliar o envolvimento direto do inflamassoma NLRP3 nas alterações cardíacas induzidas pela dieta hipercalórica, os animais foram tratados com glibenclamida, inibindo a ativação de inflamassoma NLRP3 (Lamkanfi *et al.*, 2009) nas doses de 5 e 20 mg/kg.

Os animais consumiram a dieta rica em carboidratos refinados por quatro semanas e foram divididos aleatoriamente em grupo controle (tratado com o veículo - salina 0,9% e carboximetilcelulose 0,5%) e grupo tratado (tratado com 20 mg/kg de glibenclamida) (Cai *et al.*, 2014), diariamente por gavagem, e foram alimentados com a dieta isocalórica por mais quatro semanas). A glibenclamida foi administrada em suspensão veículo constituído de salina 0,9% e carboximetilcelulose 0,5%. Os cérebros foram dissecados após os animais serem eutanasiados por decapitação sob anestesia geral com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e congelados em freezer a  $-30^\circ\text{C}$  até o momento do processamento.

### *Homogeneização dos tecidos*

As amostras de quatro cérebros dos camundongos Balb/c, de cada grupo, foram homogeneizadas separadamente, em gelo, com auxílio de mini pistilo, em solução tampão contendo 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 2 mM DTT e 0,5 mM PMSF, com volume final de 750  $\mu\text{L}$  por cérebro, por 3 vezes de 1 minuto, cada. Em seguida, o homogeneizado foi

centrifugado a 4500 rpm por 10 minutos, sendo separado o sobrenadante e descartado o precipitado.

Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$ , diluído em água e acrescentado o tampão da amostra (TA) [10X] (SDS 75%, sacarose 20%, tampão de equilíbrio 31 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 19%, 11 mM EGTA-K e bromofenol blue 0,25%) na proporção de 20  $\mu\text{L}$  TA para 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, sendo a amostra posteriormente aquecida a 100 °C por 2 minutos. Também foi retirada uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  para a realização da dosagem de proteína total.

### ***Dosagem de proteínas***

Para determinar a concentração total de proteína de cada amostra (Bradford, 1976) foi utilizada uma concentração proteica de albumina como padrão em uma curva padrão crescente variando de 0 a 20  $\mu\text{g}$ , com intervalos de 2  $\mu\text{g}$  entre os pontos. As determinações foram feitas em duplicata e a absorbância medida a 595 nm. A concentração final de proteína total em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  foi determinada a partir de cálculo de regressão linear baseado nos valores obtidos a partir da curva-padrão de albumina utilizando o programa Microsoft Excel.

### ***Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS***

A eletroforese foi realizada utilizando o sistema de tampão descontínuo. Os géis com gradiente de acrilamida de 12,5% foram utilizados no gel de separação e 3% no gel de empilhamento. Os géis de separação foram preparados com tampão de separação 1,5M Tris, pH 8,8, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida (30:0,8), H<sub>2</sub>O, TEMED 100% e PSA 10%. O gel de empilhamento foi preparado com tampão de empilhamento 0,5M Tris, pH 6,8, SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida 3% (30:1,6), TEMED 100% e PSA 10% (Laemmli; Teaff; D'Ambrosia, 1976).

A eletroforese foi realizada com tampão eletrodo (100 mM Tris, 7,8 mM EDTA, 770 mM glicina, SDS 3% pH 8,3) e corrente constante de 24 mA. Amostras de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  foram aplicadas em cada poço, após a corrida, o gel foi corado em solução corante (Coomassie Brilliant Blue R 0,125%, metanol 50% e ácido acético 9%) por 1 hora e descorado em solução descorante (metanol 5% e ácido acético 9%). Os géis foram armazenados em ácido acético 4%. A medida de R<sub>f</sub> das bandas de cada *gel lane* foi feita usando padrão de massa molecular relativa (MW).

### ***Aquisição e análise de imagens e dados***

Os géis foram acondicionados em películas de transparência (3 mm). As imagens digitalizadas dos géis foram processadas no formato “BMP” (Bitmap) e a intensidade das bandas foi analisada e comparada por meio do *software* Scion Image, versão Alpha 4.0.3.2, sendo os resultados expressos em porcentagem do teor de IOD (índice de densidade óptica).

### ***Predição das proteínas***

A partir de revisão na literatura, usando como referência Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003), Taga (2015) e Medvedev *et al.* (2015), as bandas destacadas tiveram suas proteínas preditas. Utilizou-se como critério de inclusão a variação de  $\pm 0,5$  kDa. Para identificação da função, realizou-se acesso ao banco de dados UniProtKB (<https://www.uniprot.org>), restringindo a busca para o organismo *Mus musculus* e depósitos revisados, quando possível.

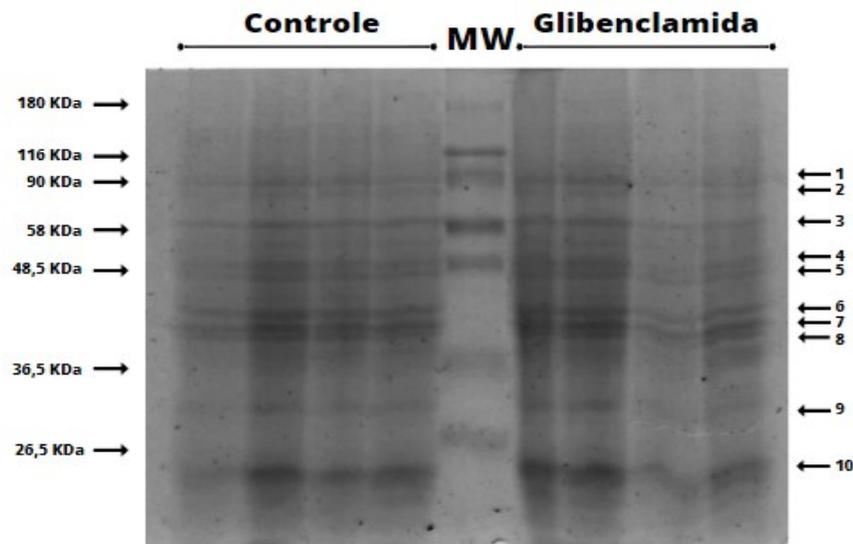
### ***Análise estatística***

A análise estatística foi realizada com o teste *t* Student avaliando as duas amostras relacionadas utilizando o software BioEstat 5.0 e um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Além disso, análise estatística descritiva foi realizada utilizando média, desvio padrão.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação do perfil eletroforético revelou apenas 10 bandas proteicas visivelmente expressas em modo diferencial nas amostras de sobrenadante de cérebro dos camundongos após dieta rica em carboidratos refinados sem tratamento (controle) e após tratamento com glibenclamida (Figura 1).

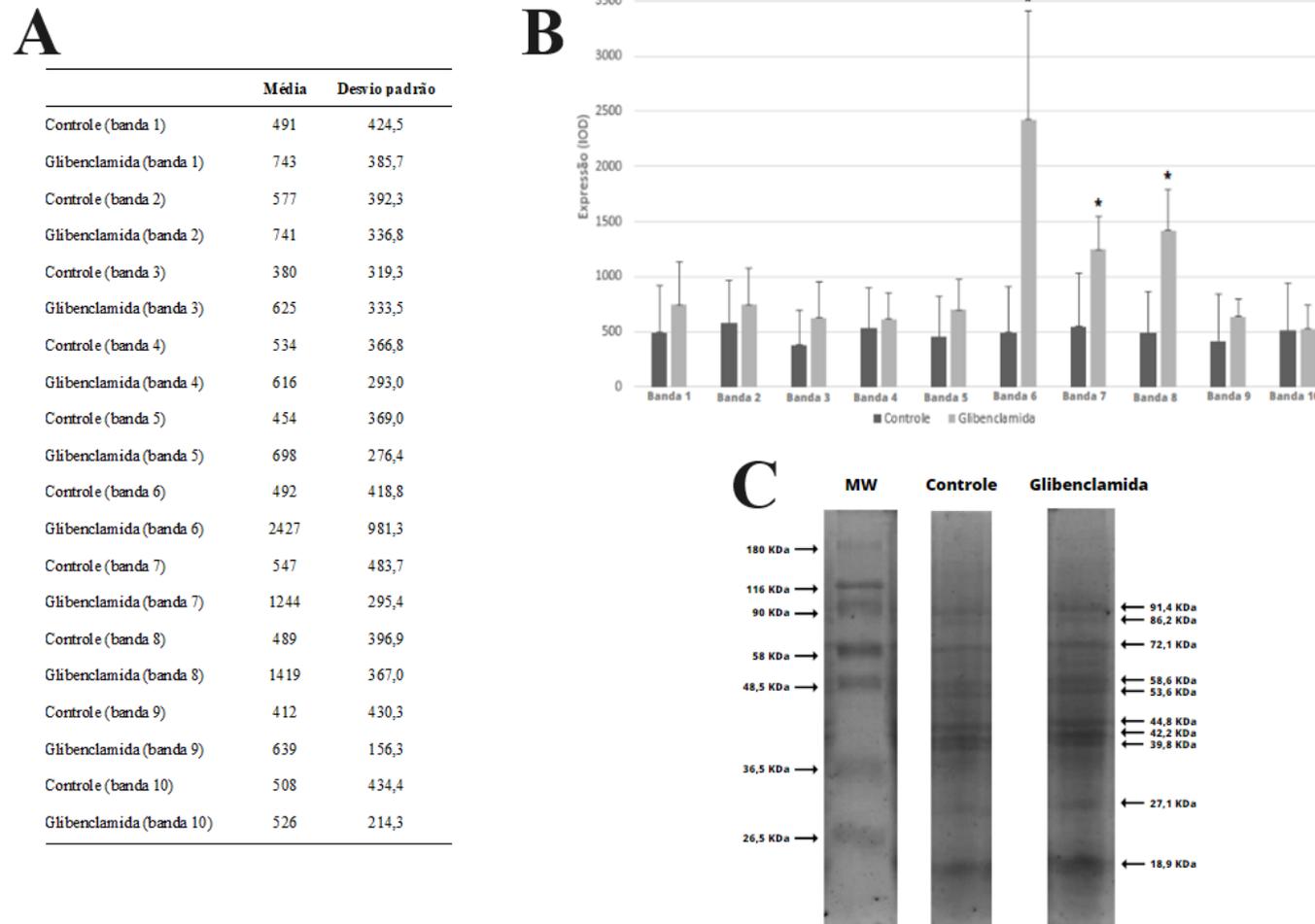
**Figura 1** - Perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) das amostras de sobrenadante de cérebro de camundongos submetidos à dieta rica em carboidratos refinados dos grupos não tratado (controle) e tratado com glibenclamida



(setas) bandas diferenciais. (MW) padrão de peso molecular SDS-7B2. Fonte: Autoria própria.

A eletroforese pode ser uni e bidimensional, sendo que a primeira consiste na separação das proteínas por meio da sua massa molecular, migrando verticalmente, sem passar pela etapa da separação por ponto isoelétrico. A eletroforese bidimensional é um método de separação eficiente, fornecendo informações sobre o seu ponto isoelétrico, massa molecular, expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética (Pandey; Mann, 2000) e muito utilizado na proteômica (Barbosa *et al.* 2012). Por outro lado, a eletroforese unidimensional é um método com menor sensibilidade e acurácia na separação das proteínas, porém ainda muito útil na análise de proteases (Davis, 2012), no diagnóstico clínico laboratorial (Naoum, 2009) e em ensaios de predição proteica (Calábria *et al.*, 2008). Embora capaz de gerar muitas informações, essas técnicas eletroforéticas possuem limitações, como por exemplo a presença de algumas proteínas em concentrações elevadas, dificultando a migração das menos abundantes.

**Figura 2** - Expressão diferencial de proteínas no cérebro de camundongos submetidos à dieta rica em carboidratos refinados dos grupos não tratado (controle) e tratado com glibenclamida com base nos valores de média obtidos pelo índice de densidade óptica (IOD)



(\*) Significativo comparando controle e tratado com glibenclamida,  $p < 0,05$ , em B. (setas) bandas diferenciais com MW estimado. (MW) padrão de peso molecular SDS-7B2. Fonte: Autoria própria.

A expressão diferencial foi quantificada a partir do índice de densidade óptica, considerando a média por grupo, conforme consta na figura 2.

A massa molecular das bandas mais visivelmente aparentes foram estimadas em kDa, sendo elas correspondentes à 91,4; 86,2; 72,1; 58,6; 53,6; 44,8; 42,2; 39,8; 27,1 e 18,9 (Figura 3). Por meio do teste *t*, a expressão dessas proteínas foi comparada entre os grupos controle e tratado com glibenclamida, sendo as com 44,8 kDa ( $p < 0,05$ ); 42,2 kDa ( $p < 0,05$ ) e 39,8 kDa ( $p < 0,01$ ) mais significativamente expressas no cérebro dos indivíduos tratados com glibenclamida (Figura 2B).

A glibenclamida e muitas dessas drogas atuam por meio da subunidade dos canais de potássio ATP-dependentes expressos no receptor nas células-beta pancreáticas, também chamado de SUR, atuando como secretagogos de insulina ao induzir o seu fechamento (Burke; Mutharasan; Ardehali, 2008).

Na depleção de ATP, o efluxo de  $K^+$  causa hiperpolarização da célula. A glibenclamida inibe a hiperpolarização nas células-beta pancreáticas, resultando no aumento da liberação intracelular de cálcio e insulina. Os canais SUR (Sur1-Trpm4) se formam no sistema nervoso central após condição patológica e quando se abrem, o influxo de  $Na^+$  causa a despolarização da membrana. Na ausência de ATP para fechar o canal, o influxo desregulado de  $Na^+$  causa edema citotóxico, porém a glibenclamida inibe a abertura deste canal (Boggs *et al.*, 2014; Simard *et al.*, 2012).

Dados preliminares sugerem que a glibenclamida reduz significativamente o edema cerebral, bem como a taxa de conversão hemorrágica após acidente vascular cerebral isquêmico (Khanna *et al.*, 2014). Entretanto, Jha *et al.* (2018) confirmaram os efeitos do tratamento com a glibenclamida na eliminação deste edema cerebral.

A partir de revisão na literatura e validação por bioinformática, as proteínas destacadas nas amostras analisadas foram preditas utilizando a margem de erro para predição da massa molecular de +/- 0,5, conforme apresentado na Tabela 1, com sua função em sistemas biológicos. A proteína identificada com 91,4 kDa não foi predita considerando as referências de proteômica de cérebro encontradas na literatura científica.

Apesar de mais de 1.500 proteínas já terem sido identificadas no cérebro humano (Park *et al.*, 2006), poucos estudos proteômicos foram realizados neste tecido que pudessem servir de base para a predição das proteínas diferencialmente expressas, restringindo a lista, considerando o critério de massa molecular referência e estimada.

**Tabela 1** - Proteínas preditas majoritariamente expressas no cérebro de camundongos submetidos à dieta rica em carboidratos refinados dos grupos não tratado (controle) e tratado com glibenclamida, com identificação do código de acesso, nome, função e massa molecular e referência

Uniprot ID	Nome da proteína	Função da proteína	MW (em kDa)	
			Estimado no gel / Referência	Referência da predição
Q99KI0	Aconitato hidratase	Isomerização do citrato em isocitrato	86,2 / 86,34	Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)
P20029	Chaperona do retículo endoplasmático	Dobramento de proteínas e controle de qualidade no retículo endoplasmático	72,1 / 72,18	Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)
Q99MN9	Cadeia-b da propionil-CoA carboxilase	Carboxilação de propionil-CoA/propanoil-CoA em D-metilmalonil-CoA/(S)-metilmalonil-CoA	58,6 / 58,795	Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)
P31930	Complexo Ubiquinol-citocromo C redutase	Impulsiona a fosforilação oxidativa na cadeia transportadora de elétrons	53,6 / 53,26	Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)
P09041	Fosfoglicerato quinase	Participa da glicólise e gliconeogênese	44,8 / 44,91	Souza (2016)
P21279	Subunidade- $\alpha$ da proteína Gs ligante do nucleotídeo guanina	Modulador ou transdutor em vários sistemas de sinalização transmembrana	42,2 / 42,38	Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)
P05064	Frutose bifosfato aldolase	Participa da glicólise e gliconeogênese	39,8 / 39,72	Lubec; Krapfenbauer; Fountoulakis (2003)
P17751	Triose-fosfato isomerase	Interconversão da diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído-3-fosfato	27,1 / 27,35	Souza (2016)
P97493	Tioredoxina mitocondrial	Controle da homeostase das espécies reativas de oxigênio, regulação da apoptose e viabilidade celular	18,9 / 18,2	Medvedev <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Autoria própria.

A tabela 1 revela que a maioria das proteínas preditas está envolvida no metabolismo de glicose (44,4%), seguida de outras vias (33,3%), metabolismo de lipídeos (11,1%), ciclo do ácido cítrico (11,1%) e cadeia transportadora de elétrons (11,1%).

Uma das principais fontes de energia do organismo é a glicose, porém quando em excesso pode ser prejudicial à saúde, tendo seus níveis plasmáticos regulados hormonalmente pela insulina (Bertrand; Valet; Castan-laurell, 2015). Como descrito anteriormente, os secretagogos de insulina podem ser classificados em iniciadores, que são capazes de estimular a secreção de insulina, como a glibenclamida; e potencializadores, que estimulam o metabolismo de substrato (Ashcroft, 1988). No entanto, apesar de se tratar de um secretagogo de insulina, a glibenclamida não interferiu na homeostasia da glicose dos camundongos Balb/c tratados nesse trabalho, considerando o teste de resistência à insulina e a glicemia em jejum (Castor, 2019). Entretanto, no cérebro apresentou expressão diferencial para as proteínas correspondentes às massas moleculares 44,8; 42,2 e 39,8 KDa, preditas como fosfoglicerato quinase, subunidade- $\alpha$  da proteína Gs ligante do nucleotídeo guanina e frutose bifosfato aldolase.

A fosfoglicerato quinase e a frutose bifosfato aldolase são enzimas reversíveis, não apresentando regulação alostérica na via glicolítica. Sendo assim, seus níveis não são alterados por meio da expressão gênica. O tratamento com a glibenclamida protege efetivamente contra a ativação glial, disfunção de memória e contra sequelas cognitivas crônicas (Stokum *et al.*, 2017), além disso também está associada ao aumento de neurônios no córtex e hipocampo, bem como da angiogênese no hipocampo, estando associado a um melhor resultado comportamental (Ortega *et al.*, 2012).

Considerando que a estrutura histológica do cérebro foi significativamente preservada no acidente vascular cerebral isquêmico após tratamento com glibenclamida quando comparado com apenas a decompressão (Simard *et al.*, 2010), sugere-se que estudos morfométricos sejam realizados no cérebro dos camundongos Balb/c alimentados com dieta rica em carboidratos refinados e tratados com glibenclamida para avaliar se a superpopulação neuronal justificaria a hiperexpressão proteica encontrada no presente trabalho.

A glibenclamida atua por meio da subunidade dos canais de  $K^+$ -ATP-dependentes expressos no seu receptor nas células-beta pancreáticas, chamado de SUR, atuando como secretagogo de insulina ao induzir o fechamento do canal (Burke *et al.*, 2008). Essa droga se destaca mundialmente, entretanto possui efeitos colaterais, como qualquer outro fármaco, sendo um deles a exaustão das células- $\beta$  pelo seu forte efeito secretagogo (Sulis, 2021). Apesar da sua relevância e associação, o receptor de sulfonilureia 1 (SUR1; +/- 43,56 kDa; Q61743 – Uniprot, 2023) que desempenha um papel fundamental em várias formas de lesão do sistema nervoso

central e tem sua função alterada pela ação da glibenclamida (Burke; Mutharasan; Ardehali, 2008), não compôs esta lista de proteínas preditas e diferencialmente expressas no cérebro de camundongos.

Por outro lado, a subunidade- $\alpha$  da proteína Gs ligante do nucleotídeo guanina foi predita e sua maior expressão foi revelada no cérebro de camundongos tratados com glibenclamida. O estudo de Wada *et al.* (2000) revelou uma nova visão do mecanismo de regulação do canal SUR pelas proteínas G, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho.

Em relação ao aprendizado, Patel *et al.* (2010) mostraram que o tratamento com a glibenclamida gera um melhor desempenho no Labirinto de Morris, mas piora para neurônios degenerados no hilo hipocampal, concluindo que a droga pode ter efeitos protetores de longo prazo no hipocampo após lesão traumática cerebral leve a moderada. Além disso, Esmacili; Hosseini; Rastak (2017) confirmaram o efeito positivo da glibenclamida na memória e aprendizagem, bloqueando os canais  $K^+$ -ATP ou sensibilizando a insulina no cérebro, melhorando o aprendizado e o armazenamento da memória de maneira dose-dependente.

Outro dado importante a ser discutido é o resultado direto do tratamento com glibenclamida, que mesmo sendo um secretagogo de insulina, não interferiu nos parâmetros de homeostasia da glicose (Castor, 2019), confirmando que sua ação não é justificada por seu efeito hipoglicemiante nesse trabalho, mas sabe-se que esse hormônio regula diversas enzimas alostéricas do metabolismo de glicose e lipídeos por meio de expressão gênica, aumento seus níveis plasmáticos (Desvergne; Michalik; Wahli, 2006).

## 4 CONCLUSÃO

No presente estudo, a análise comparativa do cérebro de animais submetidos à dieta rica em carboidratos refinados, tratados ou não com glibenclamida, revelou as mesmas bandas proteicas, porém com expressão diferencial em três delas, sendo maior naqueles que receberam o tratamento com a sulfonilureia. Essas proteínas são candidatas à análise proteômica e de futuros estudos de predição e bioinformática, pois sabendo da capacidade dessa droga em aumentar a expressão de algumas proteínas, poderia ser alvo de testes para diminuir ou até eliminar sintomas de doenças resultantes de uma dieta rica em carboidratos refinados.

A partir da caracterização proteômica do cérebro se torna possível compreender tanto sua estrutura quanto sua função, sabendo que é um órgão altamente especializado, organizado e complexo. Além disso, muitas das doenças neurodegenerativas são em regiões específicas e compreender com clareza sua proteômica abre perspectivas de diagnósticos e tratamentos mais direcionados, bem como serve de base para estudos futuros clínicos e aplicados.

## REFERÊNCIAS

- ARAUJO, F. M. L.; SILVA, L. R. B.; SOUZA, M. Modulação dos níveis de insulina pelo consumo de carboidratos e os efeitos no tecido adiposo durante o emagrecimento: uma revisão. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 16, n. 100, p. 200-216, 2022. Disponível em: <http://www.rbone.com.br/index.php/rbone/article/view/1967>. Acesso em: 20 out. 2023.
- ASHCROFT, F. M. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. **Annual review of Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 97-118, 1988. DOI: 10.1146/annurev.ne.11.030188.000525.
- ASHCROFT, F. M. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 8, p. 2047-2058, 2005. DOI: 10.1172/JCI25495.
- BARBOSA, E. B. *et al.* Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 58, n. 3, p. 366–375, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300019>.
- BERTRAND, C.; VALET, P.; CASTAN-LAURELL, I. Apelin and energy metabolism. **Frontiers in physiology**, v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fphys.2015.00115.
- BOGGS, D. H. *et al.* Potential of glyburide to reduce intracerebral edema in brain metastases. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 14, n. 4, p. 379-388, 2014. DOI: 10.1586/14737175.2014.890891.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- BRASIL. **Vigitel Brasil 2021: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 128p. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2021-estimativas-sobre-frequencia-e-distribuicao-sociodemografica-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas/view>. Acesso em: 17 out. 2023.
- BURKE, M. A.; MUTHARASAN, R. K.; ARDEHALI, H. The sulfonylurea receptor, an atypical ATP-binding cassette protein, and its regulation of the K<sub>ATP</sub> channel. **Circulation Research**, v. 102, n. 2, p. 164–176, 2008. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165324.
- CAI, J. *et al.* Glibenclamide attenuates myocardial injury by lipopolysaccharides in streptozotocin-induced diabetic mice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 13, n. 1, 2014. DOI: 10.1186/s12933-014-0106-y.
- CALÁBRIA, L. K. *et al.* Identification of calmodulin-binding proteins in brain of worker honeybees. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 151, n. 1, p. 41-45, 2008. DOI: 10.1016/j.cbpb.2008.05.006.

- CASTOR, R. G. M. **Efeitos da glibenclamida sobre a ativação cardíaca de inflamassoma Nlrp3 induzida por dieta rica em carboidratos refinados.** 2019. 64f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- COSTA, B. B. S. **Glibenclamida na hemorragia subaracnoide aneurismática: estudo prospectivo e randomizado.** 2020. 121f. Tese (Doutorado em Neurologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5138/tde-21072021-121843/publico/BRUNOBRAGASISNANDODACOSTAVC.pdf>. Acesso em: 17 out. 2023.
- DA COSTA, A. V. et al. Glibenclamide treatment modulates the expression and localization of myosin-IIB in diabetic rat brain. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 340, n. 1-2, p. 159-164, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.03.020>.
- DAVIS, R. A. H. **Aspectos proteômicos e determinação de elementos-traço em bÍlis de peixe: potencial marcador biológico de exposição ambiental?** 2012. 138f. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. DOI: <https://doi.org/10.17771/PUCRio.acad.19596>.
- DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Transcriptional regulation of metabolism. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 465-514, 2006. DOI: [10.1152/physrev.00025.2005](https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2005).
- DHINGRA, R. *et al.* Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. **Circulation**, v. 116, n. 5, p. 480-488, 2007. DOI: [10.1161/CIRCULATIONAHA.107.689935](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.689935).
- DIEGO, L. A. S. **Efeitos da glibenclamida na função e histologia renais, em ratos submetidos à hemorragia aguda sob anestesia com sevoflurano.** 2007. 131f. Tese (Doutorado em Anestesiologia) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/14bd2ce0-ee42-4291-8393-629f75884c63/content>. Acesso em: 17 out. 2023.
- DOURADO, C. S. *et al.* A associação entre uma alimentação rica em carboidratos e o desenvolvimento de gastroenteropatias: revisão integrativa da literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 4772-4790, 2022. DOI: <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n2-066>.
- ESMAEILI, M. H.; HOSSEINI, S.-S.; RASTAK, S. Glibenclamide improves learning and memory in streptozotocin- induced diabetic rats. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 8, n. 1, p. 244-253, 2017. Disponível em: <https://bipublication.com/files/ijabr20178132Hossein.pdf>. Acesso em: 13 out. 2023.
- JHA, R. M. *et al.* Glibenclamide produces region-dependent effects on cerebral edema in a combined injury model of traumatic brain injury and hemorrhagic shock in mice. **Journal of Neurotrauma**, v. 35, n. 17, p. 2125-2135, 2018. DOI: [10.1089/neu.2016.4696](https://doi.org/10.1089/neu.2016.4696).
- KHANNA, A. *et al.* Effect of glibenclamide on the prevention of secondary brain injury following ischemic stroke in humans. **Neurosurgical Focus**, v. 36, n. 1, p. E11, 2014. DOI: [10.3171/2013.10.FOCUS13404](https://doi.org/10.3171/2013.10.FOCUS13404).

- LAEMMLI, U. K.; TEAFF, N.; D'AMBROSIA, J. Maturation of the head of bacteriophage T4. III. DNA packaging into preformed heads. **Journal of Molecular Biology**, v. 88, n. 4, p. 749-765, 1974. DOI: 10.1016/0022-2836(74)90397-0.
- LAMKANFI, M. *et al.* Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. **The Journal of Cell Biology**, v. 187, n. 1, p. 61–70, 2009. DOI: 10.1083/jcb.200903124.
- LUBEC, G.; KRAPPENBAUER, K.; FOUNTOULAKIS, M. Proteomics in brain research: potentials and limitations. **Progress in Neurobiology**, v. 69, n. 3, p. 193–211, 2003. DOI: 10.1016/s0301-0082(03)00036-4.
- MCLELLAN, K. C. P. *et al.* Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 515-524, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732007000500007>.
- MEDVEDEV, A. E. *et al.* The effects of endogenous non-peptide molecule isatin and hydrogen peroxide on proteomic profiling of rat brain amyloid- $\beta$  binding proteins: relevance to Alzheimer's disease?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 476-495, 2014. DOI: 10.3390/ijms16010476.
- MÜLLER, G. The molecular mechanism of the insulin-mimetic/sensitizing activity of the antidiabetic sulfonylurea drug amaryl. **Molecular Medicine**, v. 6, n. 11, p. 907-933, 2000.
- NAOUM, P. C. **Doenças que alteram os exames bioquímicos**. São Paulo: Atheneu Editora, 2009. 168p.
- OLIVEIRA, M. C. *et al.* Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, v. 21, n. 9, p. 396-406, 2013. DOI: 10.1002/oby.20230.
- ORTEGA, F. J. *et al.* Glibenclamide enhances neurogenesis and improves long-term functional recovery after transient focal cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 33, n. 3, p. 356-364, 2012. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.166.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837–846, 2000. DOI: 10.1038/35015709.
- PARK, Y. M. *et al.* Profiling human brain proteome by multi-dimensional separations coupled with MS. **Proteomics**, v. 6, n. 18, p. 4978-4986, 2006. DOI: 10.1002/pmic.200600098.
- PATEL, A. D. *et al.* Glibenclamide reduces hippocampal injury and preserves rapid spatial learning in a model of traumatic brain injury. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 69, n. 12, p. 1177-1190, 2010. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3181bf6d6.
- POLACOW, V. O; JUNIOR, A. H. L. Dietas hiperglicídicas: efeitos da substituição isoenergética de gordura por carboidratos sobre o metabolismo de lipídios, adiposidade corporal e sua associação com atividade física e com o risco de doença cardiovascular.

**Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 3, p. 389-400, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302007000300006>.

RIDDLE, M. C. Sulfonylureas differ in effects on ischemic preconditioning - is it time to retire glyburide? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 528-530, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021971>.

ROSA, P. *et al.* **Metabolismo do glicogênio no sistema nervoso central de ratos tratados com dieta hipercalórica e DHEA**. Simpósio de Atualização em Fisiologia do Sistema Nervoso 4., 2014., Porto Alegre. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/163371/001024203.pdf?sequence=1>. Acesso em: 13 nov. 2023.

ROSADO, A. C. **Efeito da glibenclamida sobre a neuroinflamação e alterações comportamentais induzidas pelo estresse crônico imprevisível em camundongos fêmea**. 2019. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/203304>. Acesso em: 18 out. 2023.

SANTOS, L. C. *et al.* Suplementação de carboidratos e aumento de rendimento em corredores de Endurance. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 4, n. 3, p. 340-345, 2023. DOI: <https://doi.org/10.51161/conais2023/21971>.

SARTORELLI, D. S.; CARDOSO, M. A. Associação entre carboidratos da dieta habitual e diabetes mellitus tipo 2: evidências epidemiológicas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 3, p. 415-426, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000300003>.

SILVA, J. C. *et al.* Tratamento do diabetes mellitus gestacional com glibenclamida: fatores de sucesso e resultados perinatais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 11, p. 555-560, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-72032007001100002>.

SIMARD, J. M. *et al.* Glibenclamide is superior to decompressive craniectomy in a rat model of malignant stroke. **Stroke: A Journal of Cerebral Circulation**, v. 41, n. 3, p. 531-537, 2010. DOI: [10.1161/STROKEAHA.109.572644](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.572644).

SIMARD, J. M. *et al.* Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: A focused review. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 9, p. 1699-1717, 2012. DOI: [10.1038/jcbfm.2012.91](https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.91).

SOUZA, V. C. O. **Análise proteômica de tecidos de ratos expostos às diferentes formas de mercúrio**. 2016. 120f. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. DOI: [10.11606/T.60.2016.tde-06102016-141337](https://doi.org/10.11606/T.60.2016.tde-06102016-141337).

STOKUM, J. A. *et al.* Glibenclamide pretreatment protects against chronic memory dysfunction and glial activation in rat cranial blast traumatic brain injury. **Behavioural Brain Research**, v. 333, p. 43-53, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.038>.

SULIS, P. M. **Efeito e mecanismo de ação de compostos sintéticos na homeostasia da glicose: derivados da glibenclamida e de chalconas.** 2021. 113f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/231159>. Acesso em: 28 ago. 2023.

TAGA, M. L. L. **Análise proteômica em cérebro de ratos submetidos a tratamento subcrônico com chumbo: influência da suplementação com ferro.** 2015. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, Universidade de São Paulo, Bauru, 2015. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.25.2016.tde-26042016-105747>.

VARTANIAN, L. R.; SCHWARTZ, M. B. ; BROWNELL, K. D. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Public Health**, v. 97, n. 4, p. 667-675, 2007. DOI: 10.2105/AJPH.2005.083782.

WADA, Y. *et al.* A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by G-protein betagamma-subunits. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 18, p. 4915–4925, 2000. DOI: 10.1093/emboj/19.18.4915.

ZANINI, P. *et al.* Diet-induced obesity alters memory consolidation in female rats. **Physiology & Behavior**, v. 180, p. 91-97, 2017. DOI: 10.1016/j.physbeh.2017.08.011.