

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

CHRISTABEL AKORFA AFUA DZIMABI

O DIABETES COMO MODELO DE ENVELHECIMENTO PRECOCE EM
GLIÓCITOS CORTICAIS EM CAMUNDONGOS

Uberlândia -MG
Dezembro, 2019

CHRISTABEL AKORFA AFUA DZIMABI

O DIABETES COMO MODELO DE ENVELHECIMENTO PRECOCE EM
GLIÓCITOS CORTICAIS EM CAMUNDONGOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes.

Uberlândia -MG

Dezembro, 2019

CHRISTABEL AKORFA AFUA DZIMABI

O DIABETES COMO MODELO DE ENVELHECIMENTO PRECOCE EM
GLIÓCITOS CORTICAIS EM CAMUNDONGOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito para obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes

Msc. Henrique Ferreira Rodrigues

Bel. Anaíra Ribeiro Guedes Fonseca Costa

Uberlândia –MG

Dezembro, 2019

RESUMO

O diabetes mellitus é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz quantidades suficientes da insulina (tipo 1) ou quando o corpo não consegue utilizar, de forma adequada a insulina que produz, caracterizando uma resistência à insulina (tipo 2). Evidências mostram que tanto os cérebros de animais idosos quanto os de animais mais jovens com diabetes, apresentam alterações no nível de expressão de genes associados às alterações na estrutura da cromatina. O objetivo do presente trabalho foi analisar e comparar os padrões de organização da cromatina em gliócitos corticais de camundongos diabéticos jovens e adultos e camundongos não diabéticos jovens, adultos e pré-idosos. Para este fim, foram analisadas imagens capturadas de núcleos de gliócitos isolados de camundongos de fêmeas Balb/c, de fêmeas *NOD*, tanto normoglicêmicas quanto hiperglicêmicas de diferentes idades, utilizando o *software* ImageJ para obtenção de medidas de parâmetros geométricos, absorciométricos e texturais. Os camundongos *NOD* hiperglicêmicos apresentaram núcleos mais descondensados em relação aos camundongos *NOD* normoglicêmicos. Áreas anteriormente compactas da cromatina sofreram descompactação, sugerindo que a hiperglicemia induziu uma reorganização e redistribuição da cromatina nos gliócitos. Além disso, os núcleos dos animais hiperglicêmicos, apresentaram um desvio do estado círculo perfeito. Assim como a hiperglicemia, o envelhecimento também foi caracterizado pela descondensação da cromatina e pelo desvio do estado círculo perfeito dos núcleos e afetou os valores Feulgen (estimativa de DNA) tanto nos animais normoglicêmicos como nos hiperglicêmicos. Os resultados obtidos mostram que tanto o envelhecimento quanto a hiperglicemia causam alterações cromatínicas e estas alterações são semelhantes.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, envelhecimento, cromatina, gliócitos.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease that occurs when the pancreas does not produce enough insulin (type 1) or when insulin produced cannot be adequately used by the body, characterizing insulin resistance (type 2). Evidence shows that both brains of older animals and younger animals with diabetes present changes in the level of gene expression associated with changes in chromatin structure. The aim of the present study was to analyze and compare the patterns of chromatin organization in cortical gliocytes of young and adult diabetic mice as well as in young, adult and pre-elderly non-diabetic mice. To this end, images captured from nuclei of gliocytes isolated from female Balb/c mice and both normoglycemic and hyperglycemic female NOD mice of different ages were analyzed using ImageJ, to obtain geometric, absorbance and textural parameters. Hyperglycemic mice presented more decondensed nuclei than normoglycemic mice. Previously compact of chromatin were decompacted, suggesting that hyperglycemia induced reorganization and redistribution of chromatin in gliocytes. In addition, the nuclei of hyperglycemic animals showed a deviation from the perfect round form. Like hyperglycemia, aging was also characterized by chromatin decondensation and deviation from the perfect round form of nuclei. Aging also affected Feulgen values (estimate of DNA) in both normoglycemic and hyperglycemic animals. The results of this study show that both aging and hyperglycemia cause chromatin changes and these changes are similar.

Keywords: Diabetes mellitus, aging, chromatin, gliocytes.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
JUSTIFICATIVA	14
OBJETIVOS	15
Geral	15
Específico.....	15
MATERIAS E MÉTODOS	15
Animais.....	15
Delineamento Experimental	15
Dissecação de cérebro e córtices dos camundongos.....	15
Isolamento dos núcleos de gliócitos a partir de córtices dissecados.....	16
Citoquímica e análise de imagem dos núcleos isolados	16
RESULTADOS	17
Áreas nucleares	17
Densidade Óptica Integrada (IOD)	18
Absorbância Média (OD), Contraste e Entropia.....	19
<i>Roundness</i>	19
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	23

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) e suas complicações constituem as principais causas da mortalidade precoce na maioria dos países no mundo. Em 2015, aproximadamente 5 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos de idade morreram por diabetes, o que é equivalente a um óbito a cada 6 segundos. O DM atinge proporções epidêmicas, com estimativa de 415 milhões (8,8% da população mundial) de portadores de DM mundialmente, sendo que cerca de 75% dos casos são de países em desenvolvimento. Essa estimativa foi projetada para ser superior a 642 milhões em 2040 se as tendências atuais persistirem, com o maior aumento dos casos nas próximas décadas acontecendo em países em desenvolvimento (Diretrizes da SBD 2017-2018).

No Brasil, o DM acomete cerca de 14,3 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos, com o Brasil ocupando o quarto lugar entre os países com maior número de portadores. A estimativa é de que em 2040 o número de pessoas com DM no Brasil aumente para 23,3 milhões.

O DM é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz quantidades suficientes de insulina devido a destruição das células beta-pancreáticas pelas células T (diabetes tipo 1) ou quando o corpo não consegue utilizar de forma adequada a insulina produzida pelo corpo (diabetes tipo 2). O DM do tipo 1 geralmente é diagnosticado na infância enquanto o tipo 2 aparece na fase adulta, normalmente associado à obesidade e sedentarismo (YI, HUANG, ZHOU, 2016).

As complicações do DM são categorizadas como distúrbios macro e microvasculares, que resultam em doenças cardiológicas, renais e cerebrais, além de contribuir para agravos (diretamente ou indiretamente) em doenças no sistema musculoesquelético e no sistema digestório, na função cognitiva, na saúde mental e em diversos tipos de câncer (Diretrizes da SBD 2017-2018).

O DM é a causa principal da doença renal terminal através da fibrose e consequentemente a falência dos rins. Em adultos, a retinopatia associada ao DM é a principal causa de cegueira. Além disso, os estados de inflamação, neovascularização, apoptose e a hipercoagulabilidade associada à hiperglicemia persistente contribuem para exacerbar a aterosclerose, desde a síndrome metabólica até a doença avançada, ruptura da placa e a trombose coronária.

A geração de energia através da síntese ATP dentro da mitocôndria requer energia obtida de um gradiente de voltagem na membrana mitocondrial. Este gradiente de

voltagem é criada pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial que consiste em 4 complexos proteicos (complexos I-IV). Durante a metabolização de glicose e seus produtos finais, doadores de elétrons são gerados. NADH, o principal doador de elétrons, e FADH₂, doam elétrons para os complexos I e II, respectivamente, e estes elétrons são transferidos para a coenzima Q. Em seguida, os elétrons são transferidos sucessivamente para os complexos III, citocromo C, complexo IV e finalmente para o O₂, que é reduzido em H₂O. A energia resultante deste transporte de elétrons dentro da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é usada para o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial, resultando no gradiente de voltagem usado para a síntese de ATP, como já mencionado (STIRBAN et al, 2008).

Dessa forma, a hiperglicemia causa uma superprodução de elétrons e um aumento no gradiente de voltagem. Quando um limite crítico é atingido, os elétrons escapam da cadeia de transporte de elétrons e podem ser transferidos diretamente ao O₂, resultando na produção de ânions superóxido. Em condições normais tais moléculas são degradadas pela superóxido dismutase mitocondrial e a catalase em H₂O e O₂. Há um acúmulo de espécies reativas de oxigênio quando a produção de ânions superóxido excede seu limite ou quando a capacidade da sua degradação pela superóxido dismutase é diminuída, como acontece no diabetes. O resultado disso é um estresse oxidativo nas células, o que leva à oxidação do DNA, resultando em danos e consequentemente à morte da célula. O estresse oxidativo também é causado pela capacidade antioxidativa reduzida no plasma e dentro das células em diabéticos (STIRBAN et al, 2008).

Uma outra consequência do estresse oxidativo é a ativação do fator nuclear KB (NF-KB), um fator de transcrição importante que ativa outras vias pró-inflamatórias, induz apoptose (ou seja, há uma perda de células endoteliais e células musculares), instabilidade de células progenitoras, impede vários mecanismos de reparo e favorece a geração de produtos finais de glicação avançada (*Advanced Glycation End Products - AGEs*). Estas moléculas por sua vez, danificam proteínas intracelulares que regulam a transcrição gênica, atravessam a membrana da célula e modificam outras moléculas na matriz extracelular e no sangue, alterando as funções delas. Proteínas modificadas pelos *AGEs* podem se ligar e ativar os receptores destes e alterar a produção das citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. Essa alteração na produção de citocinas e fatores de crescimento causam danos celulares (STIRBAN et al, 2008).

A morte celular resultante dos danos sofridos pelas células, culmina na perda de função dos tecidos e consequentemente a perda progressiva da função dos órgãos nos

sistemas do organismo. O aumento da morbidade e a redução da qualidade de vida, juntos com a elevação da taxa de mortalidade associada ao diabetes destacam a importância de estudos voltados ao entendimento deste distúrbio, afim de que terapias possam ser desenvolvidos para amenizar ou curar a doença.

Por mais que os modelos humanos sejam os mais apropriados para tal fim, existem várias questões que fazem com que o uso destes modelos seja complexo ou até proibitivo. Assim, para estudos *in vivo*, os modelos animais são os mais empregados, sendo os camundongos da linhagem *NOD* (*Non-obese diabetic*) um dos modelos mais utilizados para o estudo do DM (PEARSON et al, 2015). Os camundongos da linhagem *NOD*, diferentemente de outros modelos, são susceptíveis ao desenvolvimento do DM tipo 1 de forma espontânea, como resultado de uma insulite causada pela destruição das ilhotas pancreáticas pelos próprios leucócitos destes animais (PEARSON et al, 2015).

Os camundongos da linhagem *NOD*, assim, apresentam algumas vantagens aos outros modelos, visto que o desenvolvimento do DM nestes animais é espontâneo e semelhante ao DM do tipo 1 em humanos. Os modelos de indução de diabetes através do tratamento dos animais com compostos químicos como aloxana ou estreptozotocina (*STZ*, do inglês *streptozotocin*), por outro lado, apresentam uma hiperglicemia que não é suficientemente estável na maioria das vezes e que pode ser revertida. Além disso, por serem compostos que induzem o diabetes através da geração de espécies reativas de oxigênio, a aloxana e a *STZ* têm efeitos tóxicos em outros tecidos que possuem receptores para esses compostos. Tais efeitos, assim como os efeitos do diabetes induzido, variam muito nos animais, mesmo em animais da mesma espécie (IGHODARO et al, 2018).

Estudos neurofisiológicos vêm mostrando que no sistema nervoso central, por mais que a falta de glicose seja extremamente perigosa, o excesso ou a hiperglicemia também levam a consequências igualmente graves. A hiperglicemia, através de vários mecanismos, leva literalmente a um caos no sistema nervoso central (SNC), pois altera as concentrações de insulina, de metabólitos e de água, de forma que a estrutura e consequentemente as funções do SNC são afetadas (MALONE, 2016).

Há um certo retardo no desenvolvimento cognitivo causado pela hiperglicemia em crianças e adolescentes que desenvolvem diabetes do tipo 1 quando comparados com crianças e adolescentes normais, devido ao comprometimento do desenvolvimento de estruturas cerebrais. Crianças com diabetes apresentam um crescimento lento tanto da substância branca como da substância cinzenta no período de maturação rápida do cérebro (POURABBASI et al, 2017).

A taurina é um osmólito orgânico envolvido na regulação do volume celular. No SNC, ela é essencial para o seu desenvolvimento e a sua citoproteção. A sua deficiência está associada à cardiomiopatia, disfunção renal, anormalidades no desenvolvimento e danos graves aos neurônios da retina (RIPPS, SHEN 2012). O inositol é um açúcar essencial para vários processos celulares, como a sua incorporação nos fosfolípidios por exemplo. Assim como a taurina, o inositol também é um osmólito importante (DAI et al, 2016) e, além disso, desempenha um papel importante na captação de insulina (CROZE, SOULAGE 2013). Já foi relatado que a hiperglicemia leva a uma diminuição de taurina e um aumento de inositol no cérebro tanto em humanos como em animais, sugerindo que a hiperglicemia causa um estresse osmótico, uma redução da citoproteção, retardo do desenvolvimento celular e uma diminuição da sobrevivência celular (RIPPS, SHEN 2012).

Apesar de tópico pouco explorado, os níveis de insulina sérica estão associados ao nível anormal de glicose que causa danos teciduais. A insulina, a qual regula vários processos celulares no SNC, quando se liga ao seu receptor (IR), leva a autofosforilação e ativação da sua atividade tirosina quinase, que recruta e fosforila substratos diferentes como o IR-1. O substrato do IR fosforilado em tirosina-1, assim, exibe locais para outros sinalizadores da cascata, dos quais a PI3K é o principal. A ativação da PI3K por fosforilação leva à ativação de outras vias como as vias da proteína B quinase (AKT) e a MAP quinase (MAPK) (DENG et al, 2009). Assim, a insulina estimula crescimento neural, diferenciação, plasticidade sináptica, proliferação celular, bem como a neurotransmissão. No diabetes do tipo 1, os níveis de insulina são mantidos exogenamente, em níveis variáveis e arbitrários, sem qualquer relação à necessidade fisiológica (MALONE, 2016).

O influxo e o efluxo de substâncias dentro do sistema nervoso central, diferentemente dos outros tecidos, são rigorosamente controlados pela barreira hematoencefálica, uma barreira composta pelas células endoteliais dos capilares, a lâmina basal dessas células, os pericitos e os pés vasculares dos astrócitos. Além de limitar e regular a troca de substâncias entre o sangue e o SNC, a barreira hematoencefálica também protege o tecido neural contra substâncias neurotóxicas que possam estar presentes no sangue (GRAY, BARRETT 2018).

O transporte da glicose do sangue para o SNC se dá através dos transportadores de glicose do tipo GLUT1, presentes na membrana das células endoteliais dos capilares e independentes da insulina. No entanto, a forma pela qual a insulina adentra o SNC ainda não está muito clara, mas acredita-se que os processos de transporte vesicular podem ser

importantes na liberação da insulina, leptina, IGF-1 e outros peptídeos produzidos periféricamente para o SNC. Os efeitos da hiperglicemia na barreira hematoencefálica também ainda não estão claros. Entretanto, os estudos mostram que há um aumento da permeabilidade da barreira. Por outro lado, em animais diabéticos, há um aumento da espessura da membrana basal, mas o mecanismo pelo qual esse aumento de espessura altera a permeabilidade da barreira não está claro (GRAY, BARRETT 2018).

Em condições fisiológicas, a glicose é utilizada para a conversão de energia e produção de ATP através da glicólise e o ciclo de Krebs. A glicose-6-fosfato, gerada nessa via, também pode ser oxidada na via das pentoses-fosfato para produção de NADPH e de ribose. O excesso de glicose é armazenado como glicogênio e/ou convertido em ácidos graxos. Em condições de hiperglicemia persistente, cerca de 30% da glicose são convertidos em frutose através da via dos polióis (YAN, 2018).

A via dos polióis consiste em duas reações: a primeira reação, catalisada pela enzima aldose redutase, envolve a redução da glicose em sorbitol e a segunda reação envolve a conversão do sorbitol em frutose. Essa segunda reação é catalisada pela enzima sorbitol desidrogenase que produz NADH a partir de NAD^+ . Assim, os produtos finais dessa via são sorbitol, frutose e NADH. O acúmulo do sorbitol dentro das células leva a um estresse osmótico (YAN, 2018). O resultado disso é a saída de alguns osmólitos como a taurina para fora das células, como uma tentativa de regular o volume celular.

A superprodução da frutose leva à glicação não enzimática de proteínas e consequentemente à perda da função destas. Além disso, a frutose pode ser metabolizada em 3-deoxiglicose e frutose-3-fosfato, que são agentes de glicação não enzimática de proteínas. Um excesso de frutose também pode levar o seu metabolismo a uma reação que consome ATP, de tal forma que essa via ultrapassa a via glicolítica. Como consequência, há uma superprodução do acetil-CoA e uma depleção de ATP. Uma superprodução da acetil-CoA pode levar à acetilação de mais proteínas que o normal, o que resulta na perda da função dessas proteínas e o consumo de ATP pode levar à morte celular. A produção excessiva da NADH a partir da NAD^+ na via dos polióis, poderia levar a um desequilíbrio NADH/NAD^+ , cujo resultado seria o estresse oxidativo e a produção de espécies reativas de oxigênio e consequentemente morte celular (YAN, 2018).

Uma outra via permite a produção de inositol partir da glicose-6-fosfato. Na presença da NAD^+ , a glicose-6-fosfato é transformada em inositol-1-fosfato. Em seguida, o fosfato é hidrolisado por uma fosfatase, resultando na formação de inositol e piruvato.

De fato, ocorre um aumento do inositol no cérebro e alguns estudos associam esse aumento à gliose (proliferação fibrosa das células da glia em áreas lesadas do sistema nervoso central (MCATEER et al, 2009, MALONE, 2016)). No entanto, o mecanismo exato pelo qual isso acontece não está claro.

A amilina é um peptídeo de 37 aminoácidos produzido pelo pâncreas juntamente com a insulina, e também no sistema nervoso central. Em condições fisiológicas, a amilina regula a glicemia pós-prandial através do controle do esvaziamento gástrico e da redução da liberação de glucagon. No sistema nervoso central, a amilina suprime a ingestão de alimentos pois promove a saciedade (MIETLICKI-BAASE et al, 2018). Estudos mostram que em condições de hiperglicemia, há um acúmulo da amilina no sistema nervoso central (MALONE, 2016), provavelmente porque essa consegue atravessar a barreira hematoencefálica. Quando acumulada no sistema nervoso central, a amilina pode se dobrar e formar oligômeros e fibrilas que podem agregar e induzir toxicidade celular e apoptose (MIETLICKI-BAASE et al, 2018). Estudos sugerem que o acúmulo da amilina proveniente da hiperglicemia está associado com o desenvolvimento do mal de Alzheimer (MIETLICKI-BAASE et al, 2018).

Estes efeitos da hiperglicemia em termos funcionais estão associados ao declínio cognitivo progressivo (ZILLIOX et al, 2016), perda progressiva de função motora (ANDERSON, 2012) e a apresentação de um fenótipo idoso mesmo em indivíduos jovens (FORMISON-NURSE et al, 2018).

O SNC é a região mais complexa do corpo, modulando e controlando todas as suas atividades. Ele é dividido em duas partes: o encefálo que se encontra protegido dentro do crânio e a medula espinhal que está localizada no forame das vertebbras até a lombar. O encefálo, por sua vez, é dividido anatomicamente em três áreas: o cérebro, o cerebelo e o tronco encefálico. O SNC é composto por bilhões de dois tipos celulares: as células nervosas, chamadas neurônios e as células da glia ou neuroglia. Os neurônios são a unidade funcional do SNC, formando uma rede de comunicação que transmite informações entre eles e deles aos outros sistemas.

As células da glia, geralmente chamadas neuroglia ou gliócitos, são células não neuronais do sistema nervoso central. Elas mantêm a homeostase cerebral, formam mielina, regulam o desenvolvimento e fornecem suporte estrutural e metabólico para os neurônios. Além disso, elas contribuem para a recuperação após lesões neuronais (JHA, MORRISON, 2018). As células da glia são suscetíveis a qualquer alteração ou desequilíbrio no cérebro. Especificamente, os microgliócitos e os astrócitos regulam a

imunidade inata, fazem a limpeza e a retirada de células mortas e protegem os neurônios, dessa forma regulando e mantendo a transmissão sináptica e a integração de informações com os neurônios. Em condições adversas, elas mudam sua morfologia e proliferam para combater estas condições (NAGAYACH et al, 2014).

No cerebelo, os microglíócitos são prontamente ativados em situações de injúria, inflamação ou distúrbios metabólicos, e no caso do diabetes, essa ativação poderia acontecer em resposta à morte celular, ou à ativação destas células em si. Deste modo, estariam induzindo morte celular via geração de vários mediadores imunológicos. Além disso, com o diabetes avançado, os astrócitos apresentam uma redução de transportadores glutamatérgicos (GLT-1). Os astrócitos participam ativamente na transmissão sináptica e modulam o processamento da informação através destes transportadores. Os transportadores glutamatérgicos também ajudam regular o nível de glutamato extracelular e minimizar a excitação glutamatérgica. Uma redução desses transportadores, portanto, resulta em uma ativação excessiva de receptores de glutamato, atividade neural anormal, e degeneração excitotóxica dos astrócitos. A redução dos *mRNAs* desses transportadores já foi relatada em distúrbios cerebrais como a isquemia, na esclerose lateral amiotrófica, no mal de Alzheimer, assim como na doença de Huntington (NAGAYACH et al, 2014).

O envelhecimento é um fenômeno natural aos seres vivos e representa um fator importante de risco ao desenvolvimento de várias doenças crônicas como o DM do tipo 2, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e muitos tipos de câncer (HARRIES et al, 2012). Ele está associado a uma série de alterações bioquímicas e estruturais ao nível celular que culminam em alterações teciduais que afetam o funcionamento dos órgãos. Essas alterações incluem o acúmulo de metabólitos citotóxicos que resultam em alterações no metabolismo de macromoléculas, alterações na síntese proteica, proteínas mal dobradas, capacidade reduzida de reparo, acúmulo de erros e danos no DNA (VAN BEEK et al, 2016).

O núcleo é uma das organelas mais afetadas e de fato, estudos vêm associando o envelhecimento às modificações na estrutura da cromatina que levam ao acúmulo de erros e alterações epigenéticas, bem como alterações no nível de expressão de vários genes (RODRIGUES et al, 2014).

A reação de Feulgen, desenvolvido pelo pesquisador Roberte Feulgen em 1924 foi um marco importante para o estudo e a compreensão da estrutura do DNA (KASTEN, 2003). Ela é uma reação citoquímica em que o DNA na primeira etapa é submetido a um hidrólise ácida para se separa as bases purinas do DNA de fita dupla. O resultado disso é

um ácido apurínico que apresenta grupos aldeídos reativos na posição C₁. Numa segunda etapa, o reagente de Schiff se liga a esses grupos aldeídos e produz uma cor avermelhada ou a violeta-azulada com uma absorção máxima de 545nm. A reação de Feulgen é a técnica padrão ouro utilizada para coloração e quantificação do conteúdo de DNA presente num núcleo (BIESTERFELD et al, 2011).

A utilização da análise de imagem como uma técnica para melhor visualização e quantificação de estruturas microscópicas em pesquisas biomédicas tem aumentado nos últimos anos. Com o auxílio de uma variedade de softwares é possível fazer uma identificação seletiva e estudos morfológicos de moléculas em larga escala. A análise de imagem pode ser empregada para pesquisas em várias áreas, como por exemplo na microbiologia, na genética, na histologia, na citologia entre outras (NATTKEMPER, 2004).

Assim como o envelhecimento, um estado crônico da hiperglicemia não controlada também pode alterar a cromatina em alguns tecidos, como por exemplo no tecido neural, e essa alteração provavelmente está relacionada às mudanças sutis nas interações de proteínas com o DNA (MOORADIAN, 1992). Com base nas similaridades genéticas e epigenéticas observadas tanto no diabetes como no envelhecimento, a hipótese deste projeto foi de que as alterações na cromatina em glóbulos de animais diabéticos estejam similares às alterações em glóbulos de animais idosos.

JUSTIFICATIVA

Apesar do diabetes mellitus ser uma doença muito estudada no mundo inteiro, ainda faltam estudos epigenéticos e estruturais que expliquem os eventos moleculares que levam às alterações estruturais da cromatina. Estas alterações são alvo de estudo, visto que, estas influenciam na expressão de diversos genes. Curiosamente, estudos recentes mostram que de fato, tanto animais idosos não diabéticos como animais diabéticos jovens apresentam alterações na expressão de diversos genes. O papel destas alterações na estrutura da cromatina e os efeitos delas no genoma como um todo não estão claros, bem como os mecanismos envolvidos nestas alterações. Além disso, ainda faltam estudos para o esclarecimento das similaridades das alterações estruturais que acontecem na cromatina de animais diabéticos e animais idosos e se de fato os animais diabéticos podem ser utilizados como modelos de envelhecimento precoce. Sendo assim, este projeto visou preencher algumas das lacunas no conhecimento sobre o DM.

OBEJETIVOS

Geral

Analisar e comparar os padrões de organização da cromatina em gliócitos corticais de camundongos diabéticos jovens e adultos e camundongos não diabéticos jovens, adultos e pré-idosos.

Específico

O diabetes e o envelhecimento causam as mesmas alterações cromatínicas em gliócitos de camundongo?

MATERIAS E MÉTODOS

Animais

Para a análise mencionada acima, foram utilizados núcleos isolados previamente e provenientes de córtices cerebrais de camundongos Balb/c fêmeas jovens com 8 semanas de idade, adultas de meia idade entre 19 e 29 semanas e pré-idosas entre 55 e 65 semanas, sendo estes animais os controles (não diabéticos). Os animais diabéticos eram fêmeas da linhagem *NOD*, de mesma faixa de idade das fêmeas Balb/c. Foram também utilizadas fêmeas *NOD* dos mesmos grupos etários, mas que não expressaram a doença, apresentando níveis glicêmicos normais. A utilização das fêmeas se justifica pela maior incidência da doença nas fêmeas *NOD* (60,0-80,0%) comparativamente aos machos (20,0-30%). Este material biológico foi obtido do grupo de pesquisa em Cromatina e Cromossomos coordenado pela Profa. Maria Luiza Silveira Melo, do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia, Unicamp ou, no caso das fêmeas Balb/c, também do REBIR (Rede de Biotérios da UFU). A glicemia das fêmeas *NOD* foi dosada na Unicamp. Os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Unicamp (protocolo 1608-1/2008).

Para obtenção de quantidade suficiente de núcleos para todos os ensaios, entre 15 a 30 animais por grupo foram sacrificados.

Delineamento Experimental

Dissecação de cérebro e córtices dos camundongos

Os animais foram sacrificados por decapitação, seguida pela dissecação dos cérebros. As regiões corticais dos cérebros foram separadas da substância branca e das meninges para o isolamento dos núcleos de neurônios e de gliócitos.

Isolamento dos núcleos de gliócitos a partir de córtices dissecados

Os núcleos dos neurônios foram separados dos núcleos dos gliócitos segundo a metodologia proposta por Thompson (1973) e modificado por Pearson et al (1983). Esta metodologia envolve a homogeneização manual dos córtices cerebrais no homogeneizador do tipo Potter em solução de sacarose 0,32 M, contendo $MgCl_2$ e PMSF, seguida de filtração do material homogeneizado em uma camada de musselina. O filtrado é então centrifugado a 12.000xg por 15 minutos para obter um precipitado nuclear cru, que por sua vez foi submetido a duas ultracentrifugações, no laboratório do Prof. Foued Salmen Espíndola do Instituto de Biotecnologia. No final deste processo, são obtidas duas populações de núcleos: uma população rica em núcleos de neurônios e outra rica em núcleos de gliócitos. Os núcleos isolados foram armazenados a $-20^{\circ}C$ em solução de sacarose 0,32M, contendo DMSO a 10,0% como crioprotetor para a manutenção da morfologia dos núcleos congelados.

Citoquímica e análise de imagem dos núcleos isolados

Para a avaliação dos parâmetros morfológicos de organização nuclear e cromatínicas, os núcleos foram citocentrifugados em lâminas histológicas, fixados em etanol acético e submetidos à reação de Feulgen, para coloração específica do DNA. Depois as lâminas foram secadas ao ar e montadas em Bálsamo do Canadá. Imagens dos núcleos foram capturadas em microscópio equipado com câmera, sendo diretamente digitalizadas via USB para um microcomputador. Os parâmetros da captura foram os seguintes: exposição 8 ms, ganho 1,5x, gama 1,4, e saturação de 100,00. Sob as condições ópticas utilizadas, 1mm correspondeu a 15,9 pixels. Estas imagens foram posteriormente analisadas no software ImageJ para a obtenção de medidas de parâmetros geométricos (área nuclear e *roundness*), absorvométricos (absorbância média (OD), densidade óptica integrada), e texturais (contraste e entropia) dos núcleos dos gliócitos. O *roundness* é um parâmetro que mede o quanto uma dada forma geométrica se assemelha a um círculo perfeito. A absorbância média mede a capacidade do núcleo em absorver radiação (luz). A densidade óptica mede a estimativa do conteúdo do DNA presente em cada núcleo. O contraste é o parâmetro que mede a diferença de absorbância entre as áreas mais compactas (escuras) e as áreas descompactas (mais claras) dos núcleos. A entropia mede o nível de desordem nos núcleos.

RESULTADOS

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, tanto o envelhecimento quanto a hiperglicemia foram capazes de causar algum tipo de alteração nos diversos parâmetros morfométricos nucleares avaliados. É importante salientar que, o simples fato de um animal ser da linhagem NOD já induziu alterações nesses parâmetros com relação aos animais balb/c. Por isso os controles NOD normoglicêmicos, que são os animais NOD que até o momento de uso não desenvolveram hiperglicemia, são extremamente importantes na presente análise.

Tabela 1. Parâmetros utilizados na análise de imagem no software ImageJ

	Área nuclear (mm ²)	OD	IOD	Roundness	Contraste	Entropia
Balb/c jovem	20,87 ± 0,36	0,43 ± 0,00	8,76 ± 0,18	0,73 ± 0,00	15,95 ± 0,25	7,18 ± 0,00
NOD jovem normo	21,59 ± 0,26	0,37 ± 0,00	7,93 ± 0,09	0,84 ± 0,00	10,19 ± 0,10	7,04 ± 0,00
NOD jovem hiper	20,33 ± 0,26	0,34 ± 0,00	7,18 ± 0,08	0,83 ± 0,00	9,66 ± 0,10	6,88 ± 0,01
NOD meia-idade normo	17,62 ± 0,36	0,49 ± 0,00	8,46 ± 0,16	0,81 ± 0,00	21,46 ± 0,33	7,20 ± 0,00
NOD meia-idade hiper	21,07 ± 0,22	0,32 ± 0,00	6,82 ± 0,09	0,85 ± 0,00	9,87 ± 0,08	6,92 ± 0,00
Balb/c meia idade	23,36 ± 0,24	0,32 ± 0,00	7,30 ± 0,08	0,84 ± 0,00	8,79 ± 0,09	7,03 ± 0,00
Balb/c pré-idoso	20,13 ± 0,27	0,38 ± 0,00	7,69 ± 0,10	0,73 ± 0,00	14,36 ± 0,21	7,21 ± 0,01
Comparações						
G1xG2	sim	sim	sim	sim	sim	sim
G1xG3	-	sim	sim	sim	sim	sim
G1xG4	sim	sim	-	sim	sim	-
G1xG5	-	sim	sim	sim	sim	sim
G1xG6	sim	sim	sim	sim	sim	sim
G1xG7	-	sim	sim	-	sim	-
G2xG3	sim	sim	sim	-	sim	sim
G2xG4	sim	sim	sim	sim	sim	sim
G2xG5	sim	sim	sim	-	-	sim
G2xG6	sim	sim	sim	-	sim	sim
G2xG7	-	sim	-	sim	sim	sim
G3xG4	-	sim	sim	sim	sim	sim
G3xG5	-	sim	-	sim	sim	sim
G3xG6	sim	sim	sim	-	sim	sim
G3xG7	sim	sim	sim	sim	sim	sim
G4xG5	sim	sim	sim	sim	sim	sim
G4xG6	sim	sim	sim	sim	sim	sim
G4xG7	sim	sim	sim	sim	sim	-
G5xG6	sim	sim	sim	sim	sim	sim
G5xG7	-	sim	sim	sim	sim	sim
G6xG7	sim	sim	-	sim	sim	sim

IOD, densidade óptica integrada; NOD, *non-obese diabetic*; norm e hiper, normo e hiperglicêmico, respectivamente; OD, densidade óptica média; valores expressos em mediana e erro padrão da mediana; sim, significância estatística para $p < 0.05$ (Anova de Welch seguida de post-hoc Games-Howell).

Áreas nucleares

Quase todas as comparações estatísticas mostram alteração significativa das áreas nucleares, sendo que o envelhecimento está associado num primeiro momento (a partir dos jovens) com aumento e posteriormente (para os pré-idosos) com diminuição das áreas nucleares. Os animais NOD por si só já apresentam áreas nucleares diferentes das observadas nos controles de idade balb/c, e a hiperglicemia tende a alterar esse parâmetro,

novamente, de forma diferente em animais jovens ou mais velhos. Nos animais NOD jovens, a hiperglicemia está associada com áreas nucleares ligeiramente menores, enquanto nos NOD de meia-idade, as áreas aumentam consideravelmente.

Densidade Óptica Integrada (IOD)

O envelhecimento afeta os valores Feulgen-DNA (IOD) (estimativa do conteúdo de DNA) como se pode ver na Tabela 1. Adicionalmente, pelos resultados apresentados na Figura 1, parece que os adultos meia-idade Balb/c tiveram algum estímulo para proliferação glial, como pode ser visto pelo aumento da população nuclear com valores Feulgen de DNA mais altos (lado direito da linha vermelha tracejada). Este estímulo parece ser perdido à medida que os animais se tornam mais velhos. O envelhecimento afetou os animais *NOD* de forma semelhante, mas nesse caso, a hiperglicemia estimulou a proliferação celular nos animais *NOD* jovens e adultos meia-idade, como pode ser visto nos histogramas na Figura 1, da proporção aumentada de núcleos com valores Feulgen de DNA mais altos (lado direito da linha vermelha tracejada) nos camundongos *NOD* hiperglicêmicos.

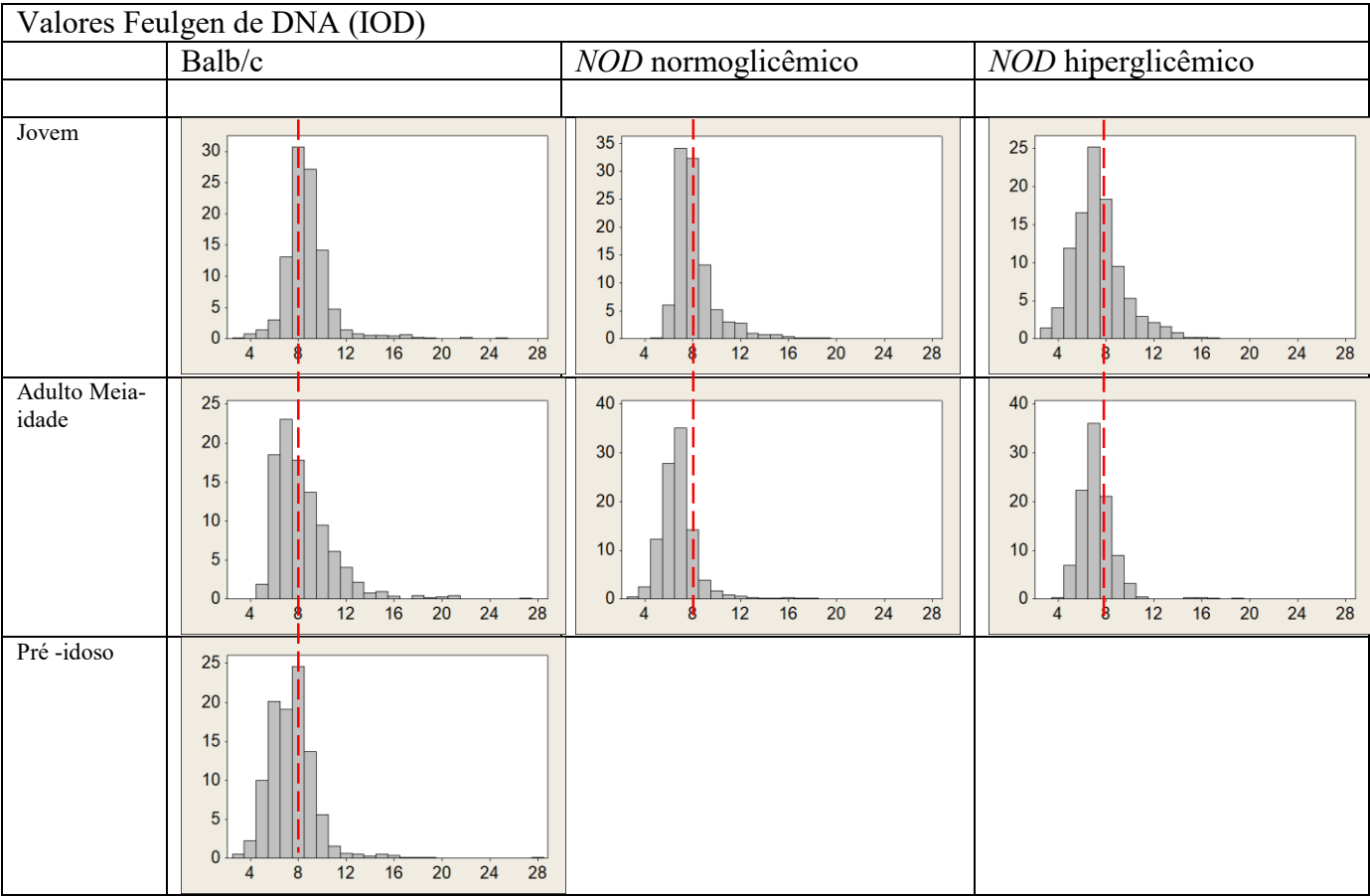


Figura 1: Histogramas mostrando valores Feulgen de DNA.

Absorbância Média (OD), Contraste e Entropia

O envelhecimento nos camundongos Balb/c foi caracterizado pela descondensação da cromatina (OD). Em níveis mais baixos, o mesmo padrão foi observado assim que os camundongos *NOD* se tornaram adultos de meia-idade (grupo 2 versus grupo 4), e também após o início da hiperglicemia nos camundongos *NOD* jovens (grupo 3 versus grupo 2). Portanto, embora em grau menor, o diabetes pode simular o fenótipo de envelhecimento nos gliócitos.

As alterações na OD foram seguidas por alterações no contraste. O contraste mede a quantidade de variabilidade dos valores de absorbância na estrutura nuclear. Neste trabalho, a descompactação da cromatina correlacionou-se positivamente com os níveis menores de contraste, implicando que as regiões anteriormente compactas nesses núcleos estavam descondensando em direção ao nível de condensação normalmente observado em regiões menos compactas.

Similarmente ao observado no envelhecimento, a hiperglicemia foi capaz de induzir alterações entrópicas nos núcleos de camundongos *NOD*.

Roundness

O *roundness* é um parâmetro que mede o quanto uma dada forma geométrica se assemelha a um círculo perfeito (*roundness* =1). Mudanças nesse parâmetro poderiam estar associadas às mudanças na organização do envoltório nuclear, e de fato, a literatura descreve o conceito da organização nuclear com impacto na morfologia nuclear em células senescentes (FLIPPI-CHIELA et al, 2012). Neste trabalho, foi possível notar que inicialmente os animais Balb/c tem uma população nuclear mais heterogênea com núcleos mais redondos (maiores valores de *roundness* – entre 0,72 e 0,96). Nos adultos de meia-idade, a maioria dos núcleos elípticos ou irregulares desapareceram. À medida que os animais envelhecem até a idade adulta pré-senescente, há uma mudança observável na distribuição dos núcleos para a esquerda (menos *roundness*). Portanto, o envelhecimento está associado às mudanças na morfologia nuclear, com desvio do estado do círculo perfeito. Com um grau menor, as mesmas alterações foram observadas após o início da hiperglicemia nos camundongos *NOD* jovens e adultas maduras. Estes dados mostram um paralelo entre o envelhecimento e o diabetes.

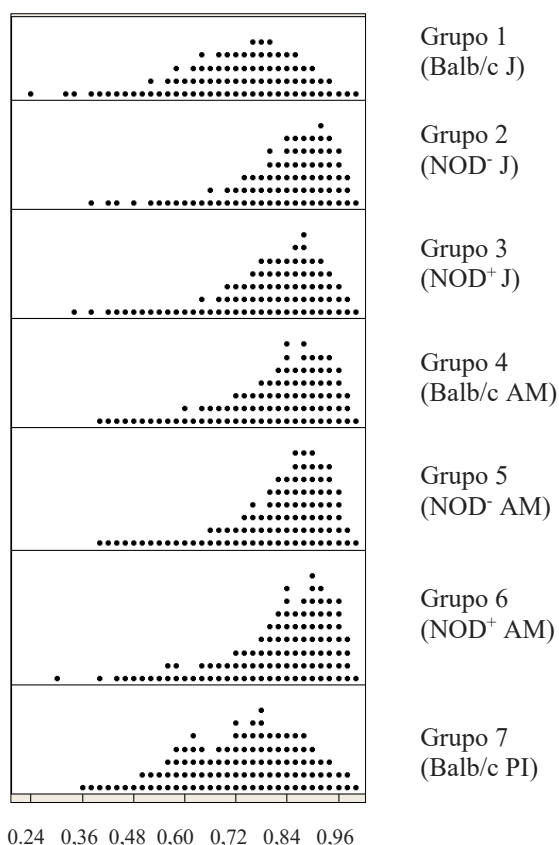


Figura 2: Distribuição dos valores de *roundness*. J- jovem; AM- adulto maduro; PI- pré-idoso; normoglicêmico (-); hiperglicêmico (+).

Tabela 2. Resumo das alterações nucleares e comparação dos efeitos da hiperglicemia com a idade

	Área nuclear (mm ²)	OD	IOD	<i>Roundness</i>	Contraste	Entropia
Hiperglicemia	Diminui nos jovens e aumenta nos adultos de meia-idade	Diminui	Diminui	Não muda nos jovens, mas aumenta nos adultos de meia-idade	Diminui	Diminui
Idade (adulto de meia-idade x pré-idoso)	Diminui	Aumenta	Não muda	Diminui	Aumenta	Aumenta
Idade (jovem x adulto de meia-idade)	Aumenta	Diminui	Diminui	Aumenta	Diminui	Diminui

DISCUSSÃO

Estudos sobre as alterações que ocorrem na cromatina devido ao envelhecimento ou às condições patológicas são importantes, visto que o DNA é a macromolécula na qual toda informação que codifica todos os genes está contido.

No presente trabalho, análises de parâmetros geométricos, absorvométricos e texturais de núcleos isolados de camundongos normo e hiperglicêmicos, mostram que, de fato, a hiperglicemia não somente altera o envelope nuclear, mas também altera a organização do seu conteúdo. Os camundongos *NOD* hiperglicêmicos apresentaram núcleos mais descondensados em relação aos camundongos *NOD* normoglicêmicos. Áreas anteriormente compactas da cromatina sofreram descompactação, sugerindo que a hiperglicemia induziu uma reorganização e redistribuição da cromatina nos gliócitos. Além disso, os núcleos dos animais hiperglicêmicos, apresentaram um desvio do estado círculo perfeito, uma alteração que reflete alterações estruturais importantes no envoltório nuclear associadas à organização cromatínica e à expressão gênica.

Assim como a hiperglicemia, o envelhecimento também foi caracterizado pela descondensação da cromatina e pelo desvio do estado círculo perfeito dos núcleos e afetou os valores Feulgen (estimativa de DNA) tanto nos animais normoglicêmicos como nos hiperglicêmicos.

Os mecanismos específicos que levaram a estas alterações ainda não estão muito claros, requerendo mais estudos e experimentos complementares. No entanto, é possível que estas modificações estruturais que correram na cromatina de gliócitos de camundongos adultos meia-idade normoglicêmicos e jovens hiperglicêmicos estejam ligadas ao estresse oxidativo, um fenômeno característico que ocorre tanto no diabetes como no envelhecimento.

Em 2012, Ghiraldini, Silva e Mello em um trabalho com hepatócitos de camundongos e utilizando a mesma metodologia do presente trabalho, mostraram um aumento no poliploidia, associada a níveis crescente de glicemia, sendo que a tendência à poliploidia foi encontrado mesmo sob condições normoglicêmicas em camundongos *NOD*. A magnitude da poliploidia nos hepatócitos dos camundongos Balb/c idosos não foi a mesma que a dos camundongos diabéticos. Além disso, esses pesquisadores relataram um aumento da homogeneidade da empacotamento da cromatina com o aumento da poliploidia no camundongos *NOD* e uma relação inversa nos camundongos Balb/c idosos.

Herencia-Bueno et al. (2018), também em um trabalho parecido relataram que os núcleos das células epiteliais da córnea de ratos diabéticos apresentaram cromatina compactas, aumento em tamanho, modificações no formato nuclear e um aumento do conteúdo do DNA. Esses resultados mostram que de fato o diabetes causa alterações na

cromatina. No entanto, estas alterações podem ser diferentes nos diferentes tipos de tecido.

Nos resultados do presente trabalho, parece que os adultos meia-idade Balb/c e os adultos meia-idade *NOD* tiveram algum estímulo para proliferação glial enquanto que este estímulo parece ser perdido à medida que os animais se tornam mais velhos. Deste modo, esses resultados corroboram com os de Moreno-Blas et al. (2019) os quais indicam que envelhecimento causa uma autofagia celular desregulada em células neuronais, essa, por sua vez, poderia explicar tal perda de estímulo proliferativo durante o envelhecimento dos gliócitos em camundongos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que tanto o DM quanto o envelhecimento causam alterações cromáticas importantes nos núcleos gliais de camundongos. Essas alterações são semelhantes e podem ter consequências na expressão gênica destes animais. Para adotar o diabetes como modelo de envelhecimento precoce há a necessidade de mais estudos e experimentos complementares.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, H. Motor dysfunction in diabetes. **Diabetes Metab Res Rev** v. 28, p. 89-92, 2012.

BIESTERFELD, S. et al. Feulgen Staining Remains the Gold Standard for Precise DNA Image Cytometry. **Anticancer Research** v. 31, p. 53-58, 2011.

CROZE, M.L.; SOULAGE, C.O. Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. **Biochimie** v. 95, p. 1811-1827, 2013.

CUI, X. et al. Multi-scale glycemic variability: a link to gray matter atrophy and cognitive decline in type 2 diabetes. **PLoS ONE** v. 9, 2014.

DAI, G. et al. Osmoregulatory inositol transporter SMIT1 modulates electrical activity by adjusting PI(4,5)P2 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* v 113, p.335, 2016.

DENG, Y. et al. Dysregulation of Insulin Signaling, GlucoseTransporters, O-GlcNAcylation, and Phosphorylation of Tau and Neurofilaments in the Brain; Implication for Alzheimer's Disease. **Neurobiology** v. 175, 2009.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018.

DUARTE, J.M.N. Metabolic Alterations Associated to Brain Dysfunction in Diabetes. **Aging and Disease** v. 6, p. 304-321, 2015.

EBELING, P. et al. Insulin-independent glucose transport regulates insulin sensitivity. **FEBS Letters** v. 436, p. 301-303, 1998.

FILIPPI-CHIELA, E.C. et al. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. **PLoS One** v. 7(8), 2012.

FISHER-WELLMAN, K.H.; NEUFER, D.P. Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. **Trends Endocrin Metab** v. 23, p. 142-153, 2012.

FOMISON-NURSE, I. et al. Diabetes induces the activation of pro-ageing miR-34a in the heart, but has differential effects on cardiomyocytes and cardiac progenitor cells. **Cell Death & Differentiation** v. 25, p. 1336-1349, 2018.

GHIRALDIN, F.G.; SILVA, I.S.; MELLO, M.L. Polyploidy and chromatin remodeling in hepatocytes from insulin-dependent diabetic and normoglycemic aged mice. **Cytometry A** v. 81, p. 755-764, 2012.

GRAY, S.M.; BARRETT, E.J. The Blood–Brain Barrier in Diabetes Mellitus. **Type 2 Diabetes and Dementia**, 2018.

GUNASEKARANA, V. et al. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research** v. 9, 2015.

HARRIES, L.W. et al. Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. **Aging Cell** v. 10(5), p. 868-878, 2011.

HERENCIA-BUENO, K.E. et al. Reduction in Histone H3 Acetylation and Chromatin Remodeling in Corneas of Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Cornea** v. 37, p. 624-632, 2018.

HOFER, R.E.; LANIER, W.L. Effects of insulin on blood, plasma, and brain glucose in hyperglycemic diabetic rats. **Stroke** v. 22, p. 505–509, 1991.

HÖHN, A. et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. **Redox Biology** v. 11, p. 482-501, 2017.

HU, Y.M. et al. Association of glycaemic variability evaluated by continuous glucose monitoring with diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetic patients. **Endocrine** v. 60, p. 292-300, 2018.

IGHODARO, O.M. et al. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. **Medicina** v. 210, 2018.

JACOB, R.J. et al. Brain glucose levels are elevated in chronically hyperglycemic diabetic rats: No evidence for protective adaptation by the blood brain barrier. **Metabolism** v. 51, 1522–1524, 2002.

JHA, M.K.; MORRISON, B.M. Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: New insights into the role of nervous system metabolic transporters. **Exp Neurol** v. 309, p. 23-31, 2018.

KASTEN, F.H. Robert Feulgen and his histochemical reaction for DNA. **Biotechnic & Histochemistry** v. 78(1), p. 45-49, 2003.

KINOSHITA, T. et al. Association of GA/HbA1c ratio and cognitive impairment in subjects with type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Complication**. v. 30, 1452-1455, 2016.

MALONE, J.I. Diabetic Central Neuropathy: CNS Damage Related to Hyperglycemia. **Diabetes** v. 65, p. 355-357, 2016.

MIETLICKI-BAASE, E.G. Amylin in Alzheimer's disease: Pathological peptide or potential treatment? **Neuropharmacology**, 2018

MOORADIAN, A.D. Altered Chromatin Structure of Cerebral Nuclei in Experimental Diabetes Mellitus. **P.S.E.B.M** v. 199, 1991.

MORENO-BLAS, D. et al. Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy. **Aging**. v. 11, p. 6175–6198, 2019.

NAGAYACH, A. et al. Experimentally induced diabetes causes glial activation, glutamate toxicity and cellular damage leading to changes in motor function. **Frontiers in Cellular Neuroscience** v. 8, 2014.

NATTKEMPER, T.W. Multivariate image analysis in biomedicine. **Journal of Biomedical Informatics** v. 37, p. 380-391, 2004.

PEARSON, J.A. et al. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. **Journal of Autoimmunity** p. 1-13, 2015.

POURABBASI, A. et al. Association of diabetes mellitus and structural changes in the central nervous system in children and adolescents: a systematic review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, 2017.

RIPPS, H.; SHEN, W. Review: Taurine: A “very essential” amino acid. **Molecular Vision** v. 18, p. 2673-2686, 2012.

SATIO, S. et al. Glucose fluctuations increase the incidence of atrial fibrillation in diabetic rats. **Cadiovasc Res.** v. 104, p. 5-14, 2014.

SHAH, K.; DESILVA, S.; ABBRUSCATO, T. The Role of Glucose Transporters in Brain Disease: Diabetes and Alzheimer’s Disease. **Int. J. Mol. Sci.** v. 13, p. 12629-12655, 2012.

SHRAM, N.F. et al. Brain glucose: Voltammetric determination in normal and hyperglycaemic rats using a glucose microsensor. **Neuroreport** v.8, p. 1109–1112, 1997.

STIRBAN, A.; RÖSEN, P.; TSCHOEPE, D. Complications of Type 1 Diabetes: New Molecular Findings. **Mount Sanai Journal of Medicine** v.75, p 328-351, 2008.

THOMPSON, R.J. Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex. **J Neurochem** v. 21, p.19-40, 1973.

VAN BEEK, J.H.G.M.; KIRKWOOD T.B.L.; BASSINGTHWAIGHTE J.B. Understanding the physiology of the ageing individual: computational modelling of changes in metabolism and endurance. **Interface focus** v. 6, 2016.

WANG, W. et al. Effects of acute and chronic hyperglycemia on the neurochemical profiles in the rat brain with streptozotocin-induced diabetes detected using in vivo ¹H MR spectroscopy at 9.4 T. **J Neurochem** v. 121, p. 407-417, 2012.

YAGIHASHI, S. Advances in pathology of diabetes from pancreatic islets to neuropathy-a tribute to Paul Langerhans. **Pathology International** v. 65, p. 157-169, 2015.

YAN, L. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. **Anim Models Exp Med** v. 1, p. 7-13, 2018.

YANG, H. et al. Long-term streptozotocin-induced diabetes in rats leads to severe damage of brain blood vessels and neurons via enhanced oxidative stress. **Mol Med Rep** p. 431- 440, 2012.

YAU, J.W. et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. **Diabetes Care** v. 35, p. 556-564, 2012.

YI, B.; HUANG, G.; ZHOU, Z. Different role of zinc transporter 8 between type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus. **Journal Of Diabetes Investigation**, v. 7, n. 4, p.459-465, 2016.

ZILLIOX, L.A. et al. Diabetes and Cognitive Impairment. **Curr Diab Rep**, 2016.

ZHANG, X. et al. The effects of glucose fluctuation on the severity of coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Res**, 2013.