

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CRISTIANE LOPES CORAL

**EFEITO DO SEXO BIOLÓGICO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AO
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO EM RATOS
WISTAR INDUZIDOS AO DIABETES MELLITUS**

**CRICIÚMA
2025**

CRISTIANE LOPES CORAL

**EFEITO DO SEXO BIOLÓGICO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AO
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO EM RATOS
WISTAR INDUZIDOS AO DIABETES MELLITUS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Fabrícia Cardoso
Petronilho

CRICIÚMA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C787e Coral, Cristiane Lopes.

Efeito do sexo biológico na resposta inflamatória ao acidente vascular cerebral isquêmico em ratos *Wistar* induzidos ao Diabetes Mellitus / Cristiane Lopes Coral. - 2025.

64 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2025.
Orientação: Fabrícia Cardoso Petronilho.

1. Diabetes Mellitus. 2. AVC isquêmico. 3. Caracteres sexuais. 4. Neuroinflamação. 5. Hiperglicemia. I. Título.

CDD. 22. ed. 616.462

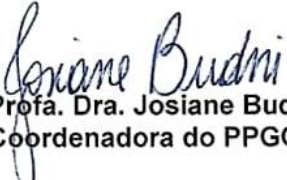
Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

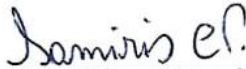


UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 488

Com início às 14 (quatorze) horas e 30 (trinta) minutos do dia 3 (três) de dezembro de 2025 (dois mil e vinte e cinco), realizou-se, na Sala 106/Bloco R1, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **CRISTIANE LOPES CORAL**, sob a orientação da **Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho**, intitulada “**EFEITO DO SEXO BIOLÓGICO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AO ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO EM RATOS WISTAR INDUZIDOS AO DIABETES MELLITUS**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Tamy Colonetti (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Profa. Dra. Lucineia Gainski Danielski (The University of Texas Medical Branch) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezessete) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Profa. Dra. Josiane Budni, Coordenadora do Programa. Criciúma, 3 (três) de dezembro de 2025 (dois mil e vinte e cinco).


Profa. Dra. Josiane Budni
Coordenadora do PPGCS


Samiris Albano Pereira
Secretária do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada conforme as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Doenças Cerebrovasculares do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico esta dissertação à minha **querida mãe**, que já não está mais neste plano, mas cuja presença continua a iluminar minha vida. Você foi minha conselheira, amiga e a maior fonte de inspiração. Sua crença em mim e em meu potencial me impulsionou a buscar e alcançar lugares inimagináveis. Agradeço por cada ensinamento, por cada palavra de encorajamento e por todo o amor que sempre me deu. Esta conquista é tão sua quanto minha.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação não seria possível sem o apoio incondicional de pessoas muito especiais em minha vida.

Primeiramente, agradeço ao meu marido, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo amor, compreensão e encorajamento em cada passo desta jornada. Sua força e apoio foram fundamentais para que eu pudesse enfrentar os desafios e seguir em frente.

Ao meu filho, a luz da minha vida, que me inspira todos os dias a ser uma pessoa melhor. Sua alegria e inocência me lembram do propósito maior de tudo o que faço. Obrigada por ser meu maior motivador e por me encher de amor.

À minha família, que sempre acreditou na minha força e potencial. Vocês foram meu alicerce, sempre me incentivando a sonhar grande e a lutar pelos meus objetivos. Sou eternamente grata por cada palavra de apoio e por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos meus colegas de mestrado, que tornaram essa jornada mais leve e cheia de aprendizado. Compartilhar experiências, desafios e conquistas com vocês foi enriquecedor e me ajudou a crescer tanto pessoal quanto academicamente.

Por fim, um agradecimento especial à minha orientadora, que com paciência, empatia e acolhimento, me guiou neste projeto. Sua orientação e sabedoria foram essenciais para que eu pudesse desenvolver meu trabalho com confiança e clareza. Sou grata por cada conselho e por acreditar em mim, mesmo nos momentos de dúvida.

A todos vocês, o meu sincero agradecimento, que possamos sempre sonhar e realizar!

RESUMO

Introdução: O diabetes mellitus (DM) é um importante fator de risco para o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi). Entretanto, os mecanismos que interligam essas condições, assim como a influência dos gêneros entre essas interações, permanecem insuficientemente caracterizadas. **Objetivo:** Este estudo investigou a resposta inflamatória sexo-específica em ratos Wistar submetidos a um modelo experimental de AVCi após indução do DM. **Métodos:** Ratos Wistar de 60 dias (28 machos e 28 fêmeas) foram submetidos à indução de DM com aloxana (150 mg/kg, via intraperitoneal) e, 72 horas depois, à indução de isquemia por oclusão da artéria cerebral média (MCAO). Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: sham+sham, DM+sham, sham+AVCi e DM+AVCi. Os déficits neurológicos foram avaliados 1 hora e 24 horas após a MCAO. Após 24 horas, estruturas cerebrais - cerebelo, hipocampo, estriado, córtex pré-frontal e córtex total - foram coletadas para quantificação de citocinas inflamatórias e mensuração do volume de infarto. **Resultados:** O DM exacerbou a resposta inflamatória e agravou os desfechos neurológicos após o AVCi; entretanto, esses efeitos foram dependentes do sexo. Machos apresentaram níveis mais elevados de citocinas inflamatórias, maior comprometimento neurológico e volumes de infarto mais extensos quando comparados às fêmeas. Em contraste, as fêmeas demonstraram uma resposta inflamatória atenuada e menor dano tecidual, sugerindo um efeito relativamente neuroprotetor. **Conclusão:** O sexo biológico modula de forma significativa a suscetibilidade ao dano isquêmico no contexto do DM. Esses achados reforçam a importância de considerar características sexo-específicas no desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas a pacientes diabéticos com risco de AVCi.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Acidente Vascular Cerebral Isquêmico; Características sexuais; Neuroinflamação; Hiperglicemia.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes mellitus (DM) is an important risk factor for ischemic stroke (IS). However, the mechanisms linking these conditions, as well as the influence of sex on these interactions, remain insufficiently characterized. **Objective:** This study investigated the sex-specific inflammatory response in Wistar rats subjected to an experimental model of IS following DM induction. **Methods:** Sixty-day-old Wistar rats (28 males and 28 females) were subjected to DM induction with alloxan (150 mg/kg, intraperitoneally) and, 72 hours later, ischemia induction by middle cerebral artery occlusion (MCAO). Animals were allocated into the following groups: sham+sham, DM+sham, sham+IS, and DM+IS. Neurological deficits were assessed 1 hour and 24 hours after MCAO. After 24 hours, brain structures - cerebellum, hippocampus, striatum, prefrontal cortex, and total cortex - were collected for quantification of inflammatory cytokines and measurement of infarct volume. **Results:** DM exacerbated the inflammatory response and worsened neurological outcomes after IS; however, these effects were sex-dependent. Males exhibited higher levels of inflammatory cytokines, greater neurological impairment, and larger infarct volumes compared to females. In contrast, females showed an attenuated inflammatory response and reduced tissue damage, suggesting a relatively neuroprotective effect. **Conclusion:** Biological sex significantly modulates susceptibility to ischemic injury in the context of DM. These findings highlight the importance of considering sex-specific characteristics in the development of targeted therapeutic strategies for diabetic patients at risk of IS.

Keywords: Diabetes Mellitus; Ischemic Stroke; Sex Characteristics; Neuroinflammatory; Hyperglycemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental do estudo pré-clínico.....	30
Figura 2 – Esquema representativo do modelo experimental de indução do DM.....	31
Figura 3 – Esquema representativo do modelo experimental de AVCi por MCAO.....	33
Figura 4 – Ilustração dos principais vasos do pescoço do rato.....	34
Figura 5 – Níveis de TNF- α quantificados em pg/ml no cerebelo (5-A), córtex pré-frontal (5-B), hipocampo (5-C), estriado (5-D) e córtex total (5-E).....	39
Figura 6 – Níveis de IL-1 β quantificados em pg/ml no cerebelo (6-A), córtex pré-frontal (6B), hipocampo (6-C), estriado (6-D) e córtex total (6-E).....	40
Figura 7 – Níveis de IL-6 quantificados em pg/ml no cerebelo (7-A), córtex pré-frontal (7-B), hipocampo (7-C), estriado (7-D) e córtex total (7-E).....	42
Figura 8 – Níveis de IL-10 quantificados em pg/ml no cerebelo (8-A), córtex pré-frontal (8-B), hipocampo (8-C), estriado (8-D) e córtex total (8-E).....	43
Figura 9 – Escore Neurológico nas fêmeas.....	45
Figura 10 – Escore Neurológico nos Machos.....	46
Figura 11 – Área de infarto cerebral (%) em ratos Wistar machos e fêmeas.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mensuração da glicemia no modelo experimental do sexo feminino.....	37
Tabela 2 - Mensuração da glicemia no modelo experimental do sexo masculino.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA	Artéria cerebral anterior
ACC	Artéria carótida comum
ACE	Artéria carótida externa
AchA	Artéria coroideia anterior
ACI	Artéria carótida interna
ANOVA	Análise de variância
AO	Artéria occipital
Arg1	Arginase tipo 1
ATP	Trifosfato de adenosina
ATS	Artéria tireoidea superior
AVC	Acidente vascular cerebral
AVCi	Acidente vascular cerebral isquêmico
AVCh	Acidente vascular cerebral hemorrágico
BA	Artéria basilar
BHE	Barreira hematoencefálica
Ca ²⁺	Íon cálcio
CD16	Molécula de diferenciação 16 (marcador microglial M1)
CD206	Molécula de diferenciação 206 (marcador microglial M2)
CV1	Clípe vascular 1
CV2	Clípe vascular 2
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EPM	Erro padrão da média

ER α	Receptor alfa de estrogênio
ER β	Receptor beta de estrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GLUT1	Transportador de glicose tipo 1
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
GLUT3	Transportador de glicose tipo 3
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GPER	Receptor acoplado à proteína G (do inglês: <i>G-protein coupled estrogen receptor</i>)
HbA1c	Hemoglobina glicada
HTA	Artéria hipotalâmica
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M1	Macrófagos tipo 1
M2	Macrófagos tipo 2
MCAO	Oclusão da artéria cerebral média
MIA	Morte indolor assistida
MMP-9	Metaloproteinase-9
Mn-SOD	Superóxido dismutase de manganês
MPO	Mieloperoxidase
NLRP3	Receptor tipo NOD, contendo domínio pirina 3 (do inglês: <i>NOD- and pyrin domain-containing protein 3</i>)
O ₂	Oxigênio
OlfA	Artéria olfatória

OPhA	Artéria oftálmica
p-MLKL	Proteína quinase-like mista fosforilada (do inglês: <i>Mixed Lineage Kinase Domain-Like phosphorylated</i>)
p-RIP1	Proteína quinase 1 de interação com o receptor fosforilada (do inglês: <i>receptor-Interacting Protein Kinase 1 phosphorylated</i>)
PCA	Artéria cerebral posterior
PcomA	Artéria comunicante posterior
PPA	Artéria pterigopalatina
SNC	Sistema nervoso central
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
Th2 CD4 ⁺	Linfócitos T auxiliares do tipo 2 CD4 ⁺
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Linfócitos T reguladores
TTC	Trifeniltetrazólio
UNESC	Universidade do Extremo Sul Catarinense
VTA	Artéria talâmica ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Diabetes mellitus: aspectos fisiopatológicos e complicações vasculares	17
1.2 Epidemiologia do diabetes mellitus	18
1.3 Acidente vascular cerebral: bases fisiopatológicas e implicações clínicas	19
1.4 Epidemiologia do acidente vascular cerebral	21
1.5 Diabetes mellitus e mecanismos fisiopatológicos da lesão cerebral isquêmica	21
1.5.1 Transporte de glicose e vulnerabilidade neuronal em condições isquêmicas	22
1.6 Neuroinflamação	24
1.7 Dimorfismo sexual na vulnerabilidade ao AVCi associado ao DM	26
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Tipo de estudo	28
3.2 Aprovação ética	28
3.3 Modelo experimental	28
3.4 Delineamento do estudo	28
3.5 Ensaios, testes e técnicas	30
3.5.1 Modelo experimental de diabetes mellitus	30
3.5.2 Modelo experimental de AVCi	31
3.5.3 Glicemia capilar	34
3.5.4 Escore de avaliação de déficit neurológico	35
3.5.5 Avaliação da área infartada	35
3.5.6 Dosagem de marcadores inflamatórios	36

3.6 Análise estatística	36
4 RESULTADOS	36
4.1 Diabetes mellitus induzido por aloxana em ratos por meio da promoção de hiperglicemia	36
4.2 Machos demonstram maiores alterações em citocinas do que fêmeas	38
4.3 Escore neurológico após MCAO: comparação entre machos e fêmeas diabéticos.....	43
4.4 Análise da área infartada	46
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	63
ANEXO A – Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	63
ANEXO B – Escala para avaliação do déficit neurológico	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus: aspectos fisiopatológicos e complicações vasculares

O Diabetes Mellitus (DM) consiste em um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica, resultando principalmente da deficiência da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas (Diabetes Mellito tipo 1 - DM1) ou da resistência periférica à ação da insulina (Diabetes Mellito tipo 2 - DM2) (Zhang et al., 2020). A hiperglicemia pode ocorrer em indivíduos que não são diabéticos, mas que apresentam níveis elevados de glicose no sangue, o que pode ser um fator de risco para diversas condições, incluindo acidente vascular cerebral (AVC) (Zhu et al., 2019).

Nos últimos anos, o DM evoluiu de uma preocupação médica centrada em distúrbios metabólicos para uma condição complexa, levando a complicações graves, como doenças cardiovasculares, neuropatias, retinopatias e nefropatias (Aderinto et al., 2023). Trata-se de uma condição crônica que compromete a metabolização da glicose (Youn et al., 2024), sendo diagnosticada por valores ocasionais de glicose sérica ≥ 200 mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L) ou glicose sérica ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L) após jejum de 8 a 12 horas (American Diabetes Association, 2018; Petersmann et al., 2019). Da mesma forma, níveis elevados de hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$ também fazem parte do diagnóstico de DM (Shepard, 2019).

O DM1 é reconhecido na literatura como diabetes insulino dependente (Lovic et al., 2020). Embora seja mais prevalente na infância e adolescência, seus sintomas também podem surgir na vida adulta ou em idades mais avançadas (Katsarou et al., 2017). A etiologia do DM1 permanece incerta; no entanto, fatores genéticos e ambientais estão intimamente associados como desencadeadores do processo imunológico envolvido na fisiopatologia da doença (Dimeglio Evans-Molina; Oram, 2018). Apesar de sua gravidade e impacto na saúde pública, o DM1 representa uma parcela menor da totalidade dos casos de DM, sendo significativamente menos prevalente do que o DM2 (American Diabetes Association, 2017).

A fisiopatologia do DM2 é a resistência à insulina, que resulta na incapacidade parcial de resposta dos tecidos periféricos à insulina produzida pelo organismo. Dessa forma, na medida em que a doença progride, as células β -pancreáticas são afetadas pela condição sistêmica de hiperglicemia e a disfunção na secreção desse hormônio pode aumentar, causando complicações crônicas semelhantes às ocorridas no DM1 (American Diabetes Association, 2017; Defronzo, 2009). Outros mecanismos adicionais envolvidos na progressão do DM2

envolvem a inflamação, o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial (Hoogwerf, 2020; Rojas et al., 2021).

A etiologia do DM2 é multifatorial e está intimamente relacionada a uma combinação de fatores genéticos e ambientais, associados a fatores de risco modificáveis, como sobrepeso, obesidade, sedentarismo e dietas altamente calóricas. A obesidade é considerada um dos principais fatores de risco modificáveis, pois está associada a anormalidades metabólicas que cursam com inflamação e lipotoxicidade, dois mecanismos responsáveis por promover a resistência à insulina (Galicia-Garcia et al., 2020). Além disso, fatores psicossociais e socioeconômicos também podem impactar os mecanismos relacionados à fisiopatologia do DM2, assim como outras afecções (Blüher, 2019).

Estudos prospectivos focados na prevenção do DM2, como o “Diabetes Prevention Program” e o “Diabetes Prevention Study”, demonstram que mudanças no estilo de vida podem reduzir em 39% o risco de desenvolvimento da doença e que essa talvez seja a principal intervenção na redução do risco a longo prazo, assim como nas complicações microvasculares e macrovasculares decorrentes da mesma (Haw et al., 2017; Yu; Suissa, 2016) que configuram como principais causas de morbimortalidade em indivíduos acometidos (Cole; Florez, 2020; Koenen et al., 2021).

As lesões microvasculares associadas à comorbidade incluem retinopatia, neuropatia e nefropatia diabética, causadas devido à hiperglicemia crônica, condições que resultam de danos cumulativos ao endotélio vascular (Faselis et al., 2020), além das complicações macrovasculares, manifestadas predominantemente como doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (Olesen et al., 2019; Verma et al., 2019). No entanto, o comprometimento vascular não é o único fator responsável pelos resultados negativos da doença, há também um conjunto de disfunções metabólicas associadas ao DM, entre as quais se destacam os efeitos tóxicos das concentrações cronicamente elevadas de glicose (Kouviri et al., 2022).

1.2 Epidemiologia do diabetes mellitus

O DM configura-se como um grande problema de saúde pública no século XXI, com um aumento alarmante de casos nos últimos anos em todos os continentes. Segundo dados do Atlas de Diabetes da Federação Internacional de Diabetes (2025a), existem atualmente 589 milhões de pessoas com a comorbidade no mundo, o que corresponde a aproximadamente um em cada nove adultos, entre 20 e 79 anos. Destes, quase metade desconhece que possui a condição. As projeções indicam que até 2050 mais de 853 milhões de pessoas (uma em cada

oito) viverão com o DM (International Diabetes Federation, 2025a).

Além da obesidade, o envelhecimento populacional, o sedentarismo e as mudanças no padrão alimentar têm desempenhado papel central na elevação da incidência e prevalência do DM2 na escala mundial (Blüher, 2019). Em 2010 existiam mais de 285 milhões de pessoas, com mais de 20 anos de idade, convivendo com algum tipo de DM, e as expectativas são que para 2030 os números possam chegar a 439 milhões de portadores (Shaw; Sicree; Zimmet, 2010).

De modo geral, mulheres adultas apresentam maior predisposição ao desenvolvimento da obesidade, enquanto os homens tendem a ter maior propensão à ocorrência de DM2 (Flegal, 2010). No entanto, estudos mais recentes indicam que essa diferença entre os sexos pode não ser estatisticamente significativa, indicando que múltiplos fatores — genéticos, hormonais e ambientais — influenciam essa associação (Khan et al., 2019).

Indivíduos com diagnóstico de DM apresentam risco aumentado de mortalidade quando comparados à população não diabética, em decorrência de complicações metabólicas, cardiovasculares e infecciosas (Taylor et al., 2013). Esse cenário se reflete nas estatísticas globais: a mortalidade por DM tem aumentado significativamente nos últimos anos. Em 2024, a doença foi responsável por 3,4 milhões de mortes em todo o mundo, o que equivale a uma morte a cada seis segundos (International Diabetes Federation, 2025b).

No Brasil, os dados de 2023 da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) indicavam que 10,2% da população adulta conviviam com DM, representando um aumento em relação a 2021, quando o índice era de 9,1% (Brasil, 2023). Entre as 27 capitais avaliadas, a prevalência do diagnóstico médico foi maior entre mulheres (11,1%) do que entre homens (9,1%), e observou-se uma redução da frequência à medida que aumentava o nível de escolaridade. As projeções apontam que até 2050, o número de brasileiros acometidos poderá chegar a 24 milhões (International Diabetes Federation, 2025c).

1.3 Acidente vascular cerebral: bases fisiopatológicas e implicações clínicas

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) ou derrame cerebral (Turner et al., 2021) é caracterizado pela morte celular neuronal súbita, devido à interrupção do fluxo sanguíneo geralmente causada pela obstrução (por êmbolo ou trombo) ou ruptura de uma artéria cerebral. Essa interrupção leva à hipóxia tecidual, provocando danos neuronais irreversíveis e desencadeando uma série de respostas moleculares (Su et al., 2020).

O AVC é classificado em dois tipos principais conforme sua etiologia: acidente

vascular cerebral isquêmico (AVCi) e acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCh) (Correa-Paz et al., 2021; Xu et al., 2021). Indivíduos que já sofreram um episódio de AVC apresentam risco significativamente maior de recorrência (World Health Organization, 2020).

A etiologia do AVCi está majoritariamente associada à trombose ou embolia decorrente de aterosclerose de grandes ou pequenos vasos, além de embolias de origem cardíaca, hipoperfusão sistêmica, trombose venosa, oclusão de pequenos vasos ou causas indefinidas que comprometem a perfusão cerebral (Pandya et al., 2011). As consequências podem ser duradouras, afetando diversos aspectos do funcionamento físico, cognitivo e emocional dos acometidos (Schepers et al., 2007).

A fisiopatologia do AVCi envolve a interrupção súbita do fluxo sanguíneo cerebral, levando à privação de oxigênio e nutrientes, o que resulta em lesão irreversível no núcleo isquêmico e em uma área ao redor potencialmente recuperável, chamada penumbra (Abdullahi; Tripathi; Ronaldson, 2018). Esta oclusão pode ocorrer em uma artéria cerebral de forma local ou distal. Localmente, a obstrução em geral é causada pela formação de um trombo ou pelo acúmulo de placas ateroscleróticas nas paredes vasculares. Já na forma distal, um êmbolo ou coágulo sanguíneo se origina em outra parte do corpo e migra até o cérebro, obstruindo uma artéria cerebral principal ou uma arteríola penetrante (Candelario-Jalil; Paul, 2021; Martínez-Coria et al., 2021; Bsat et al., 2021).

A falta de suprimento sanguíneo desencadeia sintomas como confusão, dificuldade na fala, dormência e fraqueza nos membros, além de ativar mecanismos patológicos como estresse oxidativo, inflamação, disfunção celular e morte neuronal (Lin et al., 2019; Wolska et al., 2021). Esses processos compõem a chamada cascata isquêmica, que se desenvolve em três fases: aguda, subaguda e crônica. Na fase aguda (primeiras horas), ocorre inflamação, desequilíbrio iônico, excitotoxicidade, estresse oxidativo e necrose (Farooq et al., 2020; Zeng et al., 2019). Na fase subaguda (dias seguintes), há liberação de citocinas, inflamação contínua e aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Já na fase crônica, predomina o reparo tecidual e a resolução do processo inflamatório (Farooq et al., 2020).

Pneumonia e infecção do trato urinário são complicações frequentes que afetam os acometidos (Shi et al., 2018). Ademais, possui forte correlação com o aparecimento de transtornos emocionais, com a depressão sendo a condição psiquiátrica mais prevalente no período pós-evento, impactando negativamente na reabilitação e na qualidade de vida (Ferrari; Moretti; Villa, 2022). Além de serem observadas manifestações como ansiedade, instabilidade emocional, irritabilidade, fadiga e alterações de humor (Kim, 2016; Vitturi et al., 2021).

1.4 Epidemiologia do acidente vascular cerebral

O AVC representa um dos maiores desafios de saúde pública no mundo. Segundo a *American Heart Association* (2009), é a principal causa de incapacidade nos Estados Unidos (Sims et al., 2020) e a segunda principal causa de morte global (Sedova et al., 2021). Em 2010, foram registrados 11,6 milhões de casos de AVCi e 5,3 milhões de AVCh, com predominância em países de baixa e média renda (Ornello et al., 2018). Já em 2016, os casos de AVC aumentaram para 13,7 milhões, com 5,5 milhões de óbitos atribuídos à doença — 2,7 milhões por AVCi e 2,8 milhões por AVCh (Saini; Guada; Yavagal, 2021). No Brasil, entre 2008 e 2018, foram registrados 28.625 óbitos por AVC, com aumento das taxas de mortalidade nas regiões Sul e Sudeste (De Moraes Bernal et al., 2020).

A incidência de AVC é maior entre negros e hispânicos nos EUA em comparação com caucasianos (Maida et al., 2020). Em homens, a incidência é de 62,8 por 100.000 habitantes, enquanto nas mulheres é de 59 por 100.000 habitantes, embora mulheres acima de 75 anos tenham maior risco quando comparadas a homens da mesma faixa etária (Mozaffarian et al., 2016). Além disso, são responsáveis por piores desfechos após um quadro de AVC, incluindo aumento da incapacidade e redução da qualidade de vida, potencialmente devido a maiores índices de ansiedade e depressão, além de apresentarem sintomas atípicos com atrasos no tratamento (Bushnell et al. 2018). O risco de AVC aumenta com a idade, afetando 75% dos casos em pessoas acima de 64 anos (Przykaza, 2021), e cerca de um terço dos episódios ocorrem em indivíduos mais jovens (Maida et al., 2020).

1.5 Diabetes mellitus e mecanismos fisiopatológicos da lesão cerebral isquêmica

O DM é um fator de risco significativo para o AVCi (Virani et al., 2021). Estudos demonstram que, para cada aumento de 1% nos níveis de HbA1c, há um acréscimo de 115% no risco relativo (RR) de ocorrência de um episódio de AVC (Folsom et al., 1999; Selvin et al., 2008). Evidências adicionais indicam que indivíduos com DM2 apresentam uma incidência e mortalidade por AVCi de duas a quatro vezes maiores em comparação com não diabéticos, além de maior risco para outras doenças cardiovasculares (Beckman; Creager; Libby, 2002; Haffner et al., 1998; Liu; Sorooshyari, 2021; Luitse et al., 2012).

A hiperglicemia, tanto crônica quanto aguda, está associada a desfechos mais graves no AVCi, independentemente do *status* glicêmico prévio. Uma meta-análise conduzida por Lau et al. (2019) demonstrou que a presença de hiperglicemia durante um episódio de AVCi está correlacionada a maior mortalidade, déficits neurológicos mais intensos, piores desfechos

funcionais e maior probabilidade de recorrência. Esses efeitos adversos são parcialmente explicados pela intensificação da resposta inflamatória, já que a hiperglicemia promove ativação microglial exacerbada e aumento de fenótipos pró-inflamatórios, contribuindo para o agravamento dos comprometimentos cognitivo e funcional (Barić; Dobrivojević Radmilović, 2021).

A interrupção do fluxo sanguíneo cerebral ocasiona hipóxia tecidual, e a subsequente reperfusão, que embora necessária, pode intensificar o dano local, caracterizando a lesão de isquemia-reperfusão (Gong et al., 2017). Este processo desencadeia uma cascata de eventos metabólicos, iniciados pela insuficiência na produção de energia e aumento do influxo intracelular de cálcio, promovendo a liberação exacerbada de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, que contribui para a ativação de vias apoptóticas, culminando em dano neuronal irreversível (He et al., 2021).

No contexto do DM, fatores como disfunção endotelial, aumento da trombogênese, hipertensão e dislipidemia favorecem o desenvolvimento da aterosclerose, que podem levar à interrupção do fluxo sanguíneo cerebral (Wang et al., 2021). O processo inicial da aterosclerose começa com o dano endotelial, que desencadeia o recrutamento de células inflamatórias e adesão leucocitária ao endotélio lesado (Linton et al., 2000). A liberação de citocinas inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), perpetua essa condição, enquanto a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) favorece a formação do fibroateroma. A evolução dessas lesões pode resultar na ruptura da placa, expondo seu conteúdo trombogênico, o que leva à ativação plaquetária, agregação e formação de trombo, culminando na oclusão arterial e na instalação do AVCi (Galicia-Garcia et al., 2020).

Em um estudo de Li et al. (2020), o DM agravou as respostas inflamatórias pós-AVC por meio da ativação do inflamassoma NLRP3, em modelo experimental, o que corrobora o papel da resposta imune inata no agravamento do dano isquêmico em indivíduos com diabetes. De forma semelhante, Zhang et al. (2020) demonstraram que a associação entre DM e isquemia cerebral induzida por oclusão bilateral das artérias carótidas comuns resultou em déficits cognitivos intensificados, morte neuronal e neuroinflamação com ativação microglial exacerbada.

1.5.1 Transporte de glicose e vulnerabilidade neuronal em condições isquêmicas

Apesar de representar apenas 2% da massa corporal, o cérebro consome cerca de 20% do oxigênio inalado, 15% do débito cardíaco e 25% da glicose circulante, refletindo sua alta

demanda energética (De Melo et al., 2021; Luna et al., 2021). A glicose atinge o sistema nervoso central principalmente por meio dos transportadores GLUT1 e GLUT3 nas células endoteliais da BHE, além de GLUT1, GLUT2 e GLUT4 nos astrócitos (Rojas et al., 2021; Mcallister et al., 2001).

Esse transporte pode ocorrer independentemente da insulina, sobretudo em situações de hiperglicemia (Kouvari et al., 2022; Tomlinson; Gardiner, 2008). No entanto, a BHE não consegue impedir totalmente a entrada de glicose em excesso no cérebro, especialmente em condições inflamatórias que comprometem sua integridade e favorecem o transporte passivo de substâncias potencialmente tóxicas (Jacob et al., 2002; Rom et al., 2020). Como consequência, a hiperglicemia persistente pode induzir neurotoxicidade e ativar mecanismos prejudiciais à sobrevivência neuronal (Kawahito; Kitahata; Oshita, 2009).

Nesse cenário de transporte energético cerebral, destaca-se o papel do GLUT1 como o principal transportador de glicose no sistema nervoso central, sendo altamente expresso nos astrócitos, que oferecem suporte metabólico essencial aos neurônios, permitindo a captação direta de glicose da corrente sanguínea (Mcallister et al., 2001; Rojas et al., 2021; Wei et al., 2023). Os neurônios e as células endoteliais da BHE também expressam esse transportador em níveis significativos. Paralelamente, outros membros da família GLUT desempenham funções complementares: o GLUT3, amplamente expresso em neurônios, micróglias, astrócitos e endoteliócitos, e o GLUT4, presente em astrócitos e micróglias, sugerem uma regulação fina da entrada de glicose no cérebro de acordo com a demanda energética e condições fisiopatológicas (Cheng et al., 2021; Nijland et al., 2014).

A glicólise anaeróbica na presença de hipóxia, ocasionada pela obstrução cerebral, ainda produz algum ATP, embora de forma ineficiente, através do metabolismo da glicose e do glicogênio, o que se torna insuficiente e resulta em falha da função celular. Esta situação é agravada pela hiperglicemia, pois o metabolismo anaeróbico é ainda mais ativado com o efeito geral de aumento do lactato e da acidose metabólica tecidual em relação ao nível de glicose no sangue (Ferrari; Moretti; Villa, 2022).

Na normoglicemia, ocorre uma rápida restauração dos metabólitos de fosfato de alta energia (notadamente ATP) dependendo do ambiente metabólico e funcional das mitocôndrias, como mostrado na recuperação pós-isquêmica até 96 h em ratos adultos e idosos (Villa et al., 2013; Ferrari et al., 2018). Em contraste, a hiperglicemia exacerba a acidose cortical e a função mitocondrial, mas ao mesmo tempo retarda a recuperação dos fosfatos de alta energia e do pH. Além disso, foi demonstrado em modelos experimentais que mitocôndrias lesionadas pela isquemia contêm grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente

superóxido, ao passar equivalentes redutores de glicose para o íon oxigênio (O₂) (Kalogeris et al., 2014).

A penumbra é uma área subperfundida na região de isquemia ao redor do núcleo de infarto irreversível, e pode ser recuperável devido a uma menor redução no fluxo sanguíneo, já que pode desfrutar de algum fluxo residual (pela circulação colateral) e fluxo de glicose, no qual pode aliviar a ineficiência energética através da glicólise e piorar a acidose, tornando esta região vulnerável em condições de hiperglicemia (Rosso et al., 2011). Além disso, a acidose, um distúrbio do equilíbrio ácido-base, tem sido identificada como um fator relevante na citotoxicidade e na morte celular, causada pela hiperglicemia.

Pesquisas realizadas por Back et al. (1994) demonstraram que a acidose leva a uma diminuição da contagem de células em modelos experimentais de AVCi, um efeito que também foi observado em pacientes com isquemia cerebral, tanto diabéticos quanto não diabéticos, ressaltando que essa condição está associada a desfechos clínicos desfavoráveis.

A relação entre citotoxicidade e edema cerebral é igualmente significativa. De acordo com os achados de Song et al. (2003), a morte celular induzida pela acidose pode exacerbar o inchaço cerebral, complicando ainda mais o quadro clínico. Além disso, o estresse oxidativo pode comprometer a integridade da BHE. Estudos realizados por Zhang, Yan, Shi (2016) e por Venkat, Chopp, Chen (2017) evidenciam que o aumento da atividade oxidante pode resultar na ruptura desta barreira. Esta condição, por sua vez, não só aumenta a sua permeabilidade, mas também acentua o edema cerebral, contribuindo para um aumento na taxa de transformação hemorrágica dos infartos, como demonstrado em pesquisas de Paciaroni et al. (2009) e Won et al. (2011).

Além disso, na isquemia cerebral, a hiperglicemia leva ao acúmulo extracelular de glutamato no neocórtex, resultando em uma elevação dos níveis intracelulares de Ca²⁺. Este aumento de cálcio é um precursor da liberação de citocromo C no citoplasma, levando à ativação da caspase-3 e, conseqüentemente, intensificando a morte neuronal isquêmica, conforme demonstrado por estudos de Li et al. (2001).

A hiperglicemia também influencia a saúde neurovascular, prejudicando a recanalização e reduzindo o fluxo sanguíneo cerebral, exacerbando o dano isquêmico. As respostas neuroinflamatórias desencadeadas pela hiperglicemia agravam ainda mais a lesão neuronal, destacando a natureza multifacetada da lesão cerebral hiperglicêmica (Ferrari; Moretti; Villa, 2022).

1.6 Neuroinflamação

A neuroinflamação é uma resposta imune caracterizada pela ativação de células imunes do sistema nervoso central (SNC). Esse processo inflamatório tem sido associado a uma ativação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β), que desencadeia uma cascata inflamatória resultando em danos significativos ao cérebro (Eisenhut, 2018; Lin et al., 2021). Níveis elevados de TNF- α estão associados com disfunção cognitiva em pacientes com DM, enquanto a IL-1 β tem se associado com ativação de vias que levam à morte celular, e ambas implicadas na alteração da homeostase do microambiente cerebral, comprometendo funções neurogliciais e sinápticas (Rom et al., 2019; Wei et al., 2023). Essas descobertas destacam a relação direta entre hiperglicemia, neuroinflamação e subsequentes efeitos adversos ao SNC, enfatizando a importância de compreender essa interconexão para desenvolver abordagens terapêuticas mais eficazes.

A hiperglicemia crônica, comum no DM, atua como um sinal de estresse metabólico ao SNC, induzindo a ativação de células gliais, como micróglia e astrócitos, que desempenham papéis fundamentais na resposta imune do cérebro (Amici; Dong; Guerau-De-Arellano, 2017). A ativação das células microgliciais em resposta a esse estresse pode levar ao aumento da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, além da liberação de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), intensificando o quadro inflamatório local (Devanney; Stewart; Gensel, 2020; Na; Jung; Kim, 2014).

Esse ambiente pró-inflamatório também pode comprometer a integridade da BHE, facilitando a entrada de componentes inflamatórios sistêmicos que circulam em indivíduos com hiperglicemia persistente (Rom et al., 2019). À medida que a inflamação progride, as micróglia ativadas podem, paradoxalmente, induzir lesões neuronais na tentativa de restaurar a homeostase. Diante disso, a regulação adequada dessas células é essencial para limitar os efeitos neurotóxicos da resposta inflamatória e preservar a integridade do SNC em pacientes com diabetes (Feldman, 2022; Woodburn; Bollinger; Wohleb, 2021).

As alterações fisiológicas e funcionais desencadeadas pela hiperglicemia crônica no SNC configuram um quadro clínico conhecido como encefalopatia diabética (Luna et al., 2021). Nesse contexto, devido aos altos níveis de glicose no sangue, há comprometimento da integridade da BHE, facilitando a entrada de substâncias potencialmente prejudiciais no SNC e contribuindo para a intensificação da hiperglicemia cerebral (Bahadar; Shah, 2021; Takechi et al., 2017).

1.7 Dimorfismo sexual na vulnerabilidade ao AVCi associado ao DM

O AVCi é uma das principais causas de mortalidade e incapacidade no mundo, e seu risco é amplificado na presença de DM, condição que também apresenta diferenças de impacto entre homens e mulheres. No estudo de Madsen et al. (2018), que avaliou diferenças sexuais nos perfis de risco cardiovascular de pacientes com DM e AVCi, observou-se que mulheres diabéticas apresentaram maior carga de fatores de risco e ocorrência mais precoce de AVC em comparação às mulheres sem diabetes, padrão não identificado entre os homens. Embora o estudo não tenha investigado diretamente o estado menopausal ou os níveis hormonais, esses achados sugerem que o sexo biológico modula de forma distinta os efeitos do diabetes sobre a doença cerebrovascular, levantando a hipótese de que mecanismos biológicos específicos, possivelmente relacionados à perda da proteção hormonal ao longo da vida, possam contribuir para esse agravamento no sexo feminino.

Convergindo com o estudo anterior, Dharmoon et al. (2018) analisaram desfechos pós-AVC em pacientes com DM e observaram que, embora as mulheres apresentem menor mortalidade ajustada, enfrentam maior risco de readmissão por infarto do miocárdio. Esses resultados evidenciam que as diferenças relacionadas ao sexo influenciam não apenas a gravidade da doença, mas também a resposta terapêutica e os desfechos clínicos, refletindo ainda possíveis desigualdades socioeconômicas e no acesso a tratamentos adequados.

Seguindo a mesma linha de evidências, Soriano-Reixach et al. (2018) apontaram que mulheres diabéticas apresentam maior número de fatores de risco vascular e maior mortalidade cardiovascular em comparação àquelas não diabéticas. Segundo os autores, o DM exerce um efeito mais deletério no sexo feminino, possivelmente mediado por fatores hormonais e inflamatórios que amplificam os danos cerebrais.

A revisão de Bushnell et al. (2018) reforça que o sexo biológico modula múltiplos determinantes do AVC, incluindo fatores de risco, respostas terapêuticas e desfechos clínicos, o que é particularmente relevante no contexto de comorbidades como o DM. As autoras apontam que mulheres podem apresentar perfis únicos de risco e responder de maneira diferente às intervenções, sugerindo que mecanismos biológicos intrínsecos ao sexo — potencialmente incluindo influências hormonais e inflamatórias — contribuem para essas diferenças.

Altae & Gibson (2020), ao explorar diferenças sexuais na resposta à isquemia em culturas de hipocampo, demonstraram não apenas maior grau de morte celular em tecido derivado de machos, mas também que esteroides sexuais como estradiol e progesterona modulam a sobrevivência neuronal de forma dimórfica, evidenciando que a eficácia

neuroprotetora de certos hormônios varia entre os sexos. Esses achados sustentam a hipótese de que respostas celulares e moleculares à isquemia não são uniformes entre machos e fêmeas, especialmente no contexto do DM.

Niu et al. (2023) revisaram a literatura sobre diferenças sexuais na regulação imunológica após AVCi e destacaram que homens e mulheres apresentam respostas imunes distintas após o dano isquêmico, influenciadas por fatores biológicos como hormônios sexuais e variáveis cromossômicas. Essas diferenças são percebidas na ativação de células microgлияis e mieloides, além da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, sugerindo que a neuroinflamação pós-AVC é profundamente modulada pelo sexo biológico. Essa lacuna terapêutica reforça a necessidade de estratégias de prevenção e manejo ajustadas conforme o sexo biológico (Coppola et al., 2019).

Diante desse conjunto de evidências, torna-se notável que a relação entre DM e AVCi é complexa e profundamente modulada pelo sexo biológico. Assim, compreender como o sexo influencia a resposta neuroinflamatória em modelos experimentais de AVC associado ao DM representa um passo fundamental para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais específicas, eficazes e personalizadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta inflamatória sexo-específica em ratos Wistar submetidos ao modelo experimental de Acidente Vascular Cerebral Isquêmico, previamente expostos ao modelo de Diabetes Mellitus.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar os níveis de glicemia capilar nos animais diabéticos submetidos ao AVCi;
- Avaliar o impacto do diabetes mellitus sobre o déficit neurológico após o AVCi;
- Determinar as diferenças na extensão da área infartada em animais diabéticos submetidos ao AVCi;
- Quantificar as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 em amostras encefálicas de animais diabéticos submetidos ao AVCi.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Tipo de estudo

Estudo experimental, controlado e randomizado, realizado em modelo animal, utilizando ratos Wistar.

3.2 Aprovação ética

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UNESC e recebeu o parecer de aprovação sob número de protocolo 17/2023 (Anexo A). Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes atuais para os cuidados de animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação da dor experimental em animais conscientes no Brasil: Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), Resolução Normativa nº 30 de 2 de fevereiro de 2016 e Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA).

3.3 Modelo experimental

No presente estudo, foram incluídos ratos Wistar adultos, machos e fêmeas, com 60 dias de idade e peso corporal entre 250 e 300 g, que não foram previamente utilizados em outros experimentos. Os animais foram fornecidos pelo biotério da UNESC, onde permaneceram alojados até o término da fase experimental. O alojamento seguiu os princípios básicos de bem-estar animal, em ambiente fresco e arejado, com exaustão ativa, ciclos de claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada de 23 ± 1 °C, e acesso à ração e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos aos modelos experimentais de DM, induzido por aloxana, e AVCi, induzido pelo método de oclusão da artéria cerebral média (MCAO). Após a indução do AVCi, foi fornecida ração umedecida para garantir a manutenção da ingestão alimentar diária (Crapser et al., 2016). Ao término do experimento, os animais foram submetidos à Morte Indolor Assistida (MIA), por meio da administração de associação anestésica de cetamina e xilazina (Syntec, Brasil), seguida de decapitação em guilhotina, em conformidade com as disposições da Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), de 20 de junho de 2002.

3.4 Delineamento do estudo

Os 56 ratos Wistar adultos foram alocados randomicamente entre os grupos com e sem indução de DM. Após 18 horas de jejum, os animais receberam injeção intraperitoneal de aloxana líquida (150 mg/kg) para indução de DM (Réus et al., 2016; Vieira et al., 2014). No

segundo dia após a administração de aloxana, realizou-se a aferição da glicemia capilar através da veia da cauda, utilizando glicosímetro. Animais com glicemia superior a 200 mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos no protocolo experimental (Pashapoor; Mashhadrafie; Mortazavi, 2015; Sahariah et al., 2023). No terceiro dia, todos os animais (diabéticos e controles) foram submetidos à indução de AVCi pelo método de MCAO (Liu; Mccullough, 2011). Nos grupos placebo (sham), foi realizada cirurgia sem oclusão arterial efetiva.

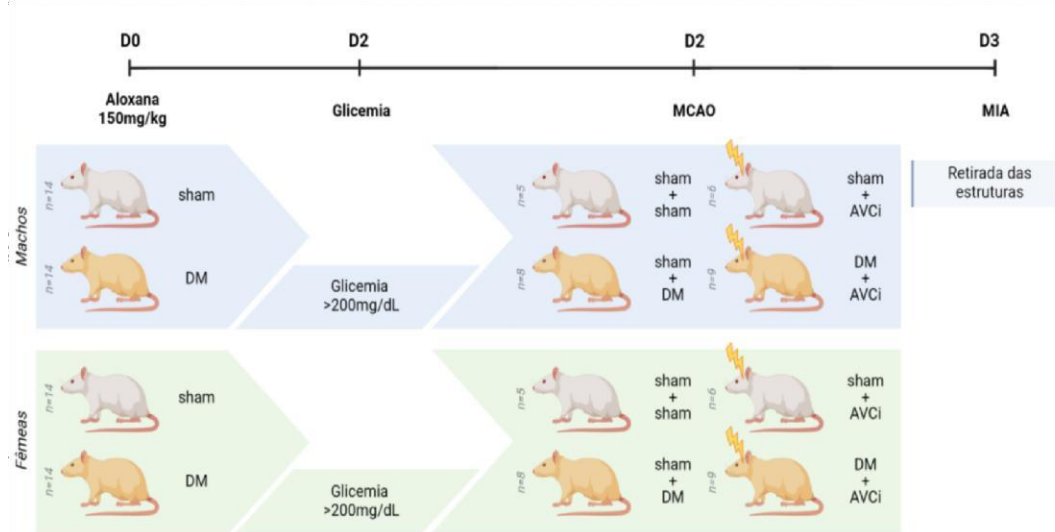
Durante o protocolo experimental, ocorreram as seguintes avaliações:

1. Antes da indução do AVCi: aferição da glicemia.
2. 1 hora após o AVCi: aplicação do escore neurológico de acordo com Chen et al. (2001) (Anexo B).
3. 24 horas após o AVCi: reavaliação do escore neurológico para monitoramento da evolução dos déficits funcionais.

Ao término do experimento, os animais foram submetidos à MIA, realizada por anestesia com cetamina e xilazina (Syntec, Brasil), seguida de decapitação, conforme a Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

No dia 0 (D0), os animais receberam aloxana; no dia 2 (D2), ocorreu a confirmação do diabetes; no dia 3 (D3), a indução de MCAO ou procedimento sham; no dia 4 (D4), a eutanásia para coleta das estruturas cerebrais. Os grupos experimentais foram compostos por: sham + sham (controle), sham + AVCi (apenas AVCi), DM + sham (apenas diabetes) e DM + AVCi (diabetes e AVCi). O delineamento experimental está ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Desenho experimental do estudo pré-clínico.



No D0, ratos machos e fêmeas receberam aloxana (150 mg/kg) para induzir DM. No D2, a glicemia foi aferida para confirmar o diabetes (glicemia > 200 mg/dL). No D3, os animais foram submetidos à oclusão da artéria cerebral média (MCAO) ou sham. No D4, os animais sofreram eutanásia e o encéfalo total retirado para análise. Os grupos experimentais incluíram: sham + sham (controle), sham + AVCi (apenas AVC), DM + sham (apenas diabetes) e DM + AVCi (diabetes e AVCi). *n* representa o número de animais em cada grupo.

Fonte: Da autora, 2025.

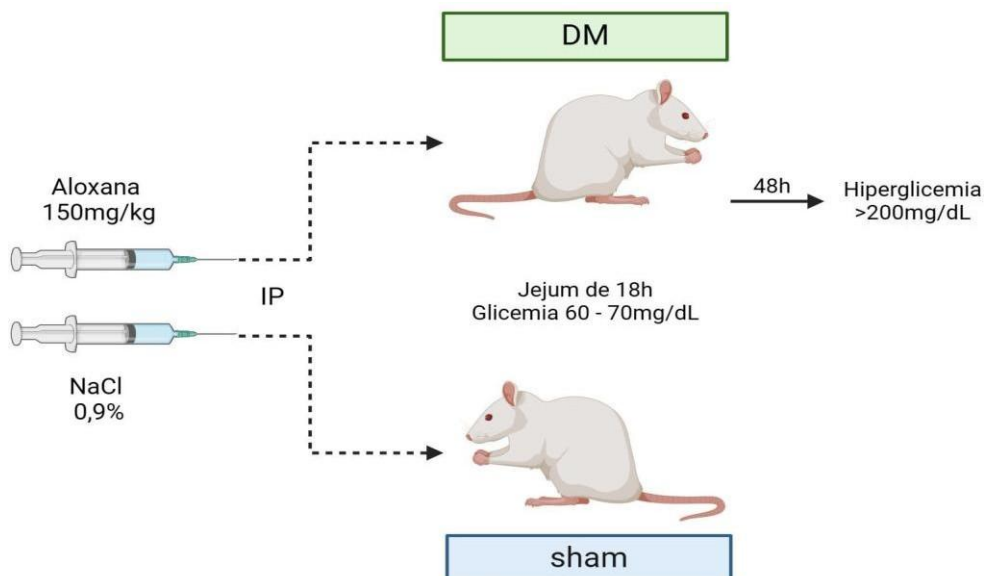
3.5 Ensaios, testes e técnicas

3.5.1 Modelo experimental de diabetes mellitus

A indução experimental do DM foi realizada com aloxana (Sigma Chemical®, EUA), diluída em água para injeção, administrada na dose de 150 mg/kg por via intraperitoneal (IP), conforme descrito por Behr et al. (2008), Réus et al. (2016) e Vieira et al. (2014). Animais do grupo controle receberam apenas solução salina. O mecanismo de ação da aloxana envolve sua rápida captação pelas células β -pancreáticas, promovendo a formação de ERO e dano aos ácidos nucleicos das ilhotas pancreáticas, resultando em hiperglicemia (Lenzen; Munday, 1991).

A administração de aloxana foi realizada após 18 horas de jejum, aumentando a suscetibilidade à ação da droga (Szkudelski, 2001). Após 48 horas, a glicemia foi medida por punção caudal, utilizando kits comerciais, de forma rápida e minimamente invasiva. Animais com glicemia >200 mg/dL foram considerados diabéticos (Pashapoor; Mashhadryafie; Mortazavi, 2015; Sahariah et al., 2023).

Todos os animais submetidos à aloxana atingiram o nível glicêmico esperado, sem descarte de indivíduos.



A administração de aloxana 150mg/kg em dose única é capaz de promover disfunção das células β -pancreáticas e promover o déficit na produção de insulina, culminando em hiperglicemia e condições clínicas do DM.

Fonte: Da autora, 2025.

3.5.2 Modelo experimental de AVCi

O AVCi foi induzido através da técnica de MCAO (Liu; Mccullough, 2011), sob anestesia inalatória com isoflurano (Cristália, Brasil) (1 L/min de O₂ e 1 L/min O₂ ambiente) e mantidos sob anestesia utilizando um fluxo com variação de 1–2% de isoflurano com vaporizador calibrado de kit de anestesia inalatória (Hipnos 50 I® Previtex, Brasil).

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, com uma seringa de 10 mL colocada sob o pescoço para facilitar o acesso às artérias carótidas. Para a preparação do campo operatório, foi realizada tricotomia da região cervical ventral e antisepsia com solução de clorexidina a 4% e álcool 70%. Na área destinada à incisão, administrado, por via subcutânea, 0,1 mL de cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor.

Em seguida, uma incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm foi realizada na linha média ventral da pele para exposição das estruturas cervicais. A fáscia superficial dissecada e a glândula submandibular direita cuidadosamente rebatida lateralmente. No interior do triângulo anatômico formado pelos músculos esternomastoide, esternohioideo e digástrico, foi realizada uma dissecação romba para expor a bifurcação da artéria carótida comum direita. Para otimizar a visualização, foi empregado um afastador cirúrgico.

Com o auxílio de um estereomicroscópio binocular, o nervo vago e suas fibras nervosas adjacentes à artéria carótida foram delicadamente isolados e anestesiados com um swab embebido em 0,1–0,2 mL de lidocaína a 2% sem vasoconstritor, visando analgesia adicional e prevenção da síndrome do desconforto respiratório agudo.

Ainda sob o estereomicroscópio, procedeu-se a separação do nervo vago da artéria carótida comum (ACC) e da artéria carótida interna (ACI), além disso foram cuidadosamente dissociadas da fâscia, tecido adiposo e vasos adjacentes, e um primeiro clipe vascular (CV1) foi posicionado na ACC, a aproximadamente 0,5 cm da bifurcação.

Artérias de menor calibre, como a artéria tireoidea superior (ATS) e a artéria occipital (AO), foram cauterizadas utilizando um cauterizador portátil (Cautermax®), a fim de evitar sangramentos após a secção da ACE. Dois fios de sutura de seda 5-0 foram posicionados ao redor da ACE: na porção distal, uma ligadura apertada foi realizada para ocluir o fluxo sanguíneo, e a 0,2–0,3 mm da bifurcação da ACC, posicionada uma segunda ligadura mais frouxa.

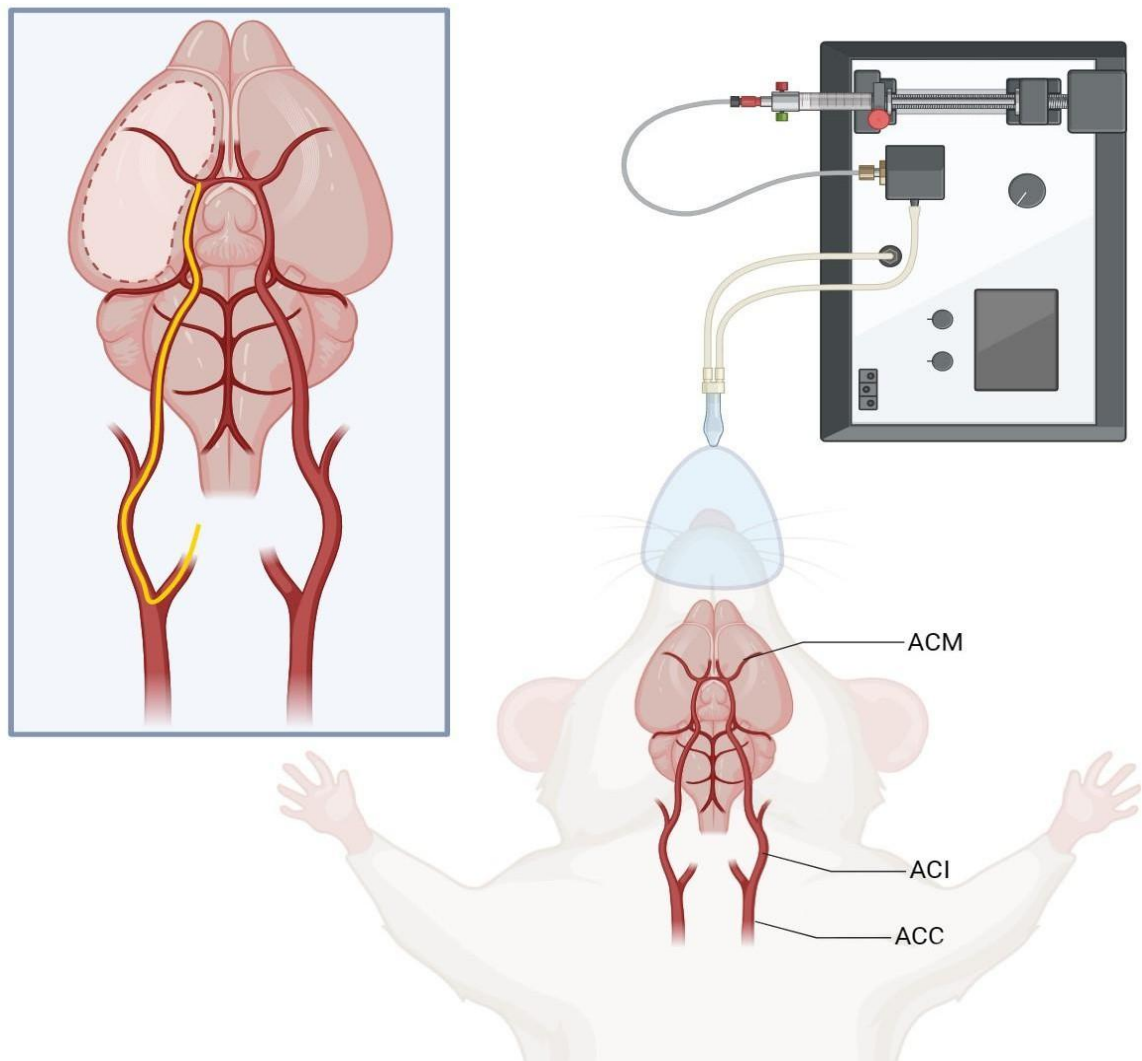
Posteriormente, um segundo clipe vascular (CV2) foi temporariamente colocado na ACI para impedir o refluxo sanguíneo durante o acesso pela ACE. Utilizando um micro tesoura, uma pequena incisão foi realizada, entre as duas suturas de seda, permitindo a introdução de um monofilamento 4-0 com ponta siliconada (Doccol Corporation; especificações: diâmetro 0,19 mm; comprimento 30 mm; diâmetro com revestimento $0,37 \pm 0,02$ mm; comprimento do revestimento 3–4 mm) no lúmen da ACE, direcionado em sentido à ACI (Liu et al., 2009).

Após a introdução do monofilamento, a ACE foi ligada com fio de seda, evitando sangramento de retorno. Em seguida, o CV2 retirado, permitindo o avanço do filamento em torno de 18–20mm pelo lúmen da ACI até a artéria cerebral média (ACM), até a percepção de uma leve resistência, caracterizando oclusão eficaz (Gubskiy et al., 2018; Morris et al., 2016).

Concluída esta etapa, o CV1 foi removido da ACC, marcando o início da oclusão da artéria cerebral média (MCAO), onde foi mantida por 90 minutos (Figura 3 e 4). A sutura da pele foi realizada com fio de nylon 3-0 (Shalon, Brasil). Os animais do grupo sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com a exceção de que o fluxo sanguíneo da ACI não foi ocluído.

Após os 90 minutos de oclusão, restabeleceu-se a reperusão cerebral, mediante a retirada do monofilamento, sob anestesia inalatória. Durante todos os procedimentos, a temperatura corporal dos animais foi rigorosamente monitorada e mantida em aproximadamente $36 \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando um termômetro digital a laser infravermelho (Liu; Mccullough, 2011; Mccullough et al., 2003).

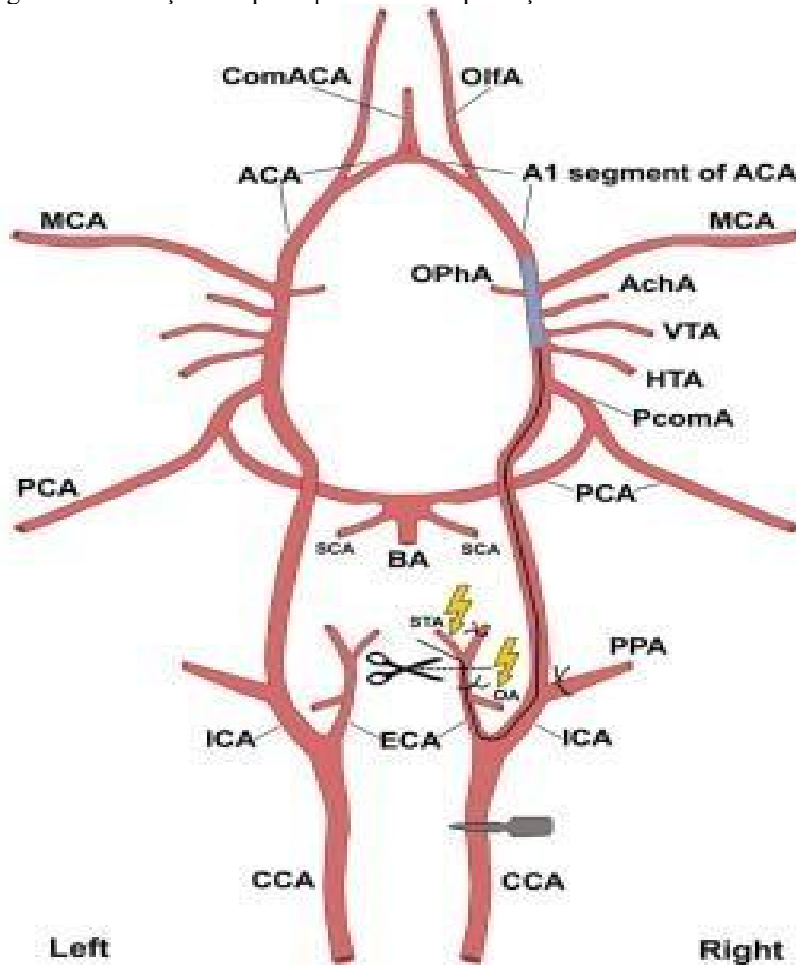
Figura 3 - Esquema representativo do modelo experimental de AVCi por MCAO.



Um monofilamento inserido intraluminal promove a obstrução arterial e isquemia cerebral regional. ACC: artéria carótida comum; ACI: artéria carótida interna; ACM: artéria cerebral média.

Fonte: Adaptado de Lemmerman et al. (2022).

Figura 4 - Ilustração dos principais vasos do pescoço do rato.



O esquema demonstra os principais vasos arteriais do pescoço com o trajeto percorrido pelo monofilamento revestido com silicone no modelo de AVCi por MCAO, bem com os locais de ligadura e oclusão temporária com clipe vascular. CCA: artéria carótida comum; ECA: artéria carótida externa; ICA: artéria carótida interna; PPA: artéria pterigopalatina; BA: artéria basilar; SCA: artéria cerebral superior; PCA: artéria cerebral posterior; PcomA: artéria comunicante posterior; HTA: artéria hipotalâmica; VTA: artéria talâmica ventral; AchA: artéria coróideia anterior; OPhA: artéria oftálmica; MCA: artéria cerebral média; ACA: artéria cerebral anterior; OlfA: artéria olfatória; ComACA: artéria cerebral comum anterior.

Fonte: Gubskiy et al. (2018).

3.5.3 Glicemia capilar

A aferição da glicemia capilar realizou-se por meio de um monitor de glicose (G500 Bioland®) e fitas de glicemia da mesma fabricante. Para isso foi efetuada uma punção sanguínea na veia caudal a fim de extrair uma gota de sangue para avaliação da glicemia capilar. As medições foram feitas em dois momentos distintos: o primeiro antes da indução da DM, possibilitando a aferição da glicemia basal após 18 horas de jejum; o segundo momento antes da indução do AVCi, confirmando a indução da DM em 48 horas e verificando a aptidão dos animais para o processo de isquemia quando apresentavam glicemia capilar superior a 200 mg/dL. Todas as aferições foram realizadas de modo a minimizar o estresse dos animais, evitando assim que os níveis de glicemia se elevem devido ao manejo (Réus et al., 2016).

3.5.4 Escore de avaliação de déficit neurológico

A avaliação neurocomportamental permitiu aferir o dano neurológico clínico ou déficit neurológico após a indução do AVCi. Um sistema de classificação de exame neurológico na forma de escala, foi utilizado, sendo denominado escore neurológico. Após 1 hora do término da indução do AVCi, já em condições fisiológicas, um observador cego, seguindo os critérios de pontuação conforme descrito por Chen et al. (2001), iniciou uma minuciosa avaliação técnica individual do exame clínico, pontuando na escala conforme sua avaliação. O exame foi realizado logo após a indução do AVCi e 24 horas após a reperfusão, momento antes da MIA. O exame consiste em verificar a presença de déficits neurológicos, com testes motores, testes sensoriais, testes de equilíbrio e reflexos ou movimentos anormais, como crises epiléticas, mioclonias e/ou mioclonias. Pontuações foram atribuídas para classificar alterações presenciadas pelo observador, podendo alcançar pontuação máxima de 18 pontos para o indivíduo que apresentasse alteração em todos os parâmetros avaliados (Anexo B).

3.5.5 Avaliação da área infartada

A extensão do infarto cerebral e da penumbra, bem como a visualização rápida e confiável do tecido cerebral hipóxico, foram determinadas utilizando-se o método de coloração descrito por Kramer et al. (2010). O procedimento seguiu etapas padronizadas para garantir a precisão na avaliação das lesões cerebrais.

Inicialmente, o encéfalo foi removido do crânio e imediatamente mantido sob refrigeração em gelo, a fim de preservar sua integridade estrutural e minimizar a degradação tecidual. Esse resfriamento temporário contribuiu para estabilizar o tecido cerebral antes da preparação para os cortes.

Posteriormente, o encéfalo foi posicionado em uma matriz de corte específica para cérebro, projetada para garantir a obtenção de seções uniformes. Utilizando lâminas afiadas, foram realizados cortes coronais manuais com espessura de 2 mm. Em seguida, as seções obtidas imersas em solução de Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (TTC) a 0,1%, proveniente da Sigma Aldrich (EUA). Nesse processo, as áreas viáveis do cérebro, que não sofreram hipóxia, coraram-se em vermelho, enquanto as regiões infartadas, incapazes de reduzir o TTC, permaneceram incolores. Após a coloração, as seções foram fixadas em solução de formaldeído a 4%, com o objetivo de preservar a morfologia tecidual e impedir alterações nas amostras.

A análise da extensão do infarto cerebral foi realizada com o auxílio do software descrito por Kramer et al. (2010). As imagens digitalizadas das seções coradas foram

carregadas no programa, e a extensão do infarto calculada com base na diferença entre a área total do hemisfério contralateral e a área da região normal do hemisfério ipsilateral, dividida pela área total do hemisfério contralateral. O valor obtido foi multiplicado por 100, expressando a porcentagem de área infartada em relação ao hemisfério contralateral (Huang et al., 2021).

3.5.6 Dosagem de marcadores inflamatórios

Amostras do tecido cerebral (cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) foram coletadas, homogeneizadas, isoladas e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises. A quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, foi mensurada por kits ELISA DuoSet para ratos (Sigma Aldrich, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante e os resultados expressos em pg/mg de proteína, utilizando leitor de microplacas (Thermoplate LX800G, Brasil) (Abaimov et al., 2024).

3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias usando o teste de Levene. Para os dados normais e com homogeneidade de variância confirmada, testes paramétricos foram utilizados; caso contrário, foram utilizados testes não paramétricos. Para as análises bioquímicas e de representação de imagem, os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados por ANOVA, seguido de teste post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises foram executadas utilizando o programa GraphPad Prism® versão 9.0 e os gráficos foram construídos no mesmo utilitário.

4 RESULTADOS

4.1 Diabetes mellitus induzido por aloxana em ratos por meio da promoção de hiperglicemia

Neste estudo, a administração de aloxana como indutor do modelo experimental de DM foi capaz de promover as condições hiperglicêmicas esperadas, confirmando, assim, o sucesso da indução. Dessa forma, foi possível observar elevações significativas nos níveis séricos de glicose. No D0 os animais estavam normoglicêmicos na primeira medição realizada com glicosímetro e fitas de teste. Na segunda medição, realizada no D2, ou seja, 48 horas após a

indução do modelo experimental de DM, os níveis de glicose aumentaram significativamente, atingindo mais do que o dobro da glicemia basal. Esse mesmo padrão foi observado tanto em machos quanto em fêmeas, confirmando o sucesso na indução da hiperglicemia (Tabelas 1 e 2).

Nas fêmeas do grupo sham+sham, não houve alteração significativa nos níveis glicêmicos entre o D0 e D2 ($228,1 \pm 69,8$ mg/dL vs. $113,4 \pm 17,4$ mg/dL; ns), indicando estabilidade glicêmica em fêmeas não diabéticas sem indução de MCAO. No grupo sham+MCAO, também não foram observadas diferenças significativas ($202,0 \pm 82,9$ mg/dL vs. $225,4 \pm 69,9$ mg/dL; ns), sugerindo que a indução de AVCi em fêmeas não diabéticas não promove alterações agudas na glicemia capilar.

Em contraste, os grupos DM+sham e DM+MCAO apresentaram elevação significativa da glicemia entre o D0 e D2 ($178,9 \pm 59,4$ mg/dL vs. $296,6 \pm 91,0$ mg/dL e $218,5 \pm 70,4$ mg/dL vs. $331,8 \pm 124,2$ mg/dL, respectivamente; $p < 0,0001$). Esses resultados confirmam que a indução do DM por aloxana foi efetiva nas fêmeas, independentemente da indução de AVC, com aumento robusto da glicemia capilar.

Tabela 1 - Mensuração da glicemia no modelo experimental do sexo feminino

Grupo	Dia 0 (mg/dL)	Dia 2 (48h) (mg/dL)	Valor de p (0 vs 48h)
sham+sham	$228,1 \pm 69,8$	$113,4 \pm 17,4$	ns
sham+MCAO	$202,0 \pm 82,9$	$225,4 \pm 69,9$	ns
DM+sham	$178,9 \pm 59,4$	$296,6 \pm 91,0$	**** ($<0,0001$)
DM+MCAO	$218,5 \pm 70,4$	$331,8 \pm 124,2$	**** ($<0,0001$)

Fonte: Da autora, 2025.

Nos machos do grupo sham+sham, os níveis glicêmicos não diferiram significativamente entre o D0 e D2 ($109,2 \pm 11,7$ mg/dL vs. $172,4 \pm 52,4$ mg/dL; ns), assim como no grupo sham+MCAO não houve alteração significativa ($170,9 \pm 52,9$ mg/dL vs. $169,9 \pm 62,8$ mg/dL; ns).

Já nos grupos DM+sham e DM+MCAO, a indução do diabetes resultou em aumento significativo da glicemia capilar ($173,9 \pm 46,0$ mg/dL vs. $237,3 \pm 77,3$ mg/dL e $165,7 \pm 50,9$ mg/dL vs. $170,0 \pm 59,0$ mg/dL, respectivamente; $p < 0,0001$), evidenciando sucesso na modelagem diabética nos machos. Observa-se ainda, que o efeito da MCAO nos machos

diabéticos não alterou significativamente a glicemia capilar de forma adicional, sugerindo que a resposta glicêmica pós-AVCi não é tão pronunciada quanto a indução prévia de diabetes.

Tabela 2: Mensuração da glicemia no modelo experimental do sexo masculino

Grupo	Dia 0 (mg/dL)	Dia 2 (48h) (mg/dL)	Valor de <i>p</i> (0 vs 48h)
sham+sham	109,2 ± 11,7	172,4 ± 52,4	ns
sham+MCAO	170,9 ± 52,9	169,9 ± 62,8	ns
DM+sham	173,9 ± 46,0	237,3 ± 77,3	**** (<0,0001)
DM+MCAO	165,7 ± 50,9	170,0 ± 59,0	**** (<0,0001)

Fonte: Da autora, 2025.

4.2 Machos demonstram maiores alterações em citocinas do que fêmeas

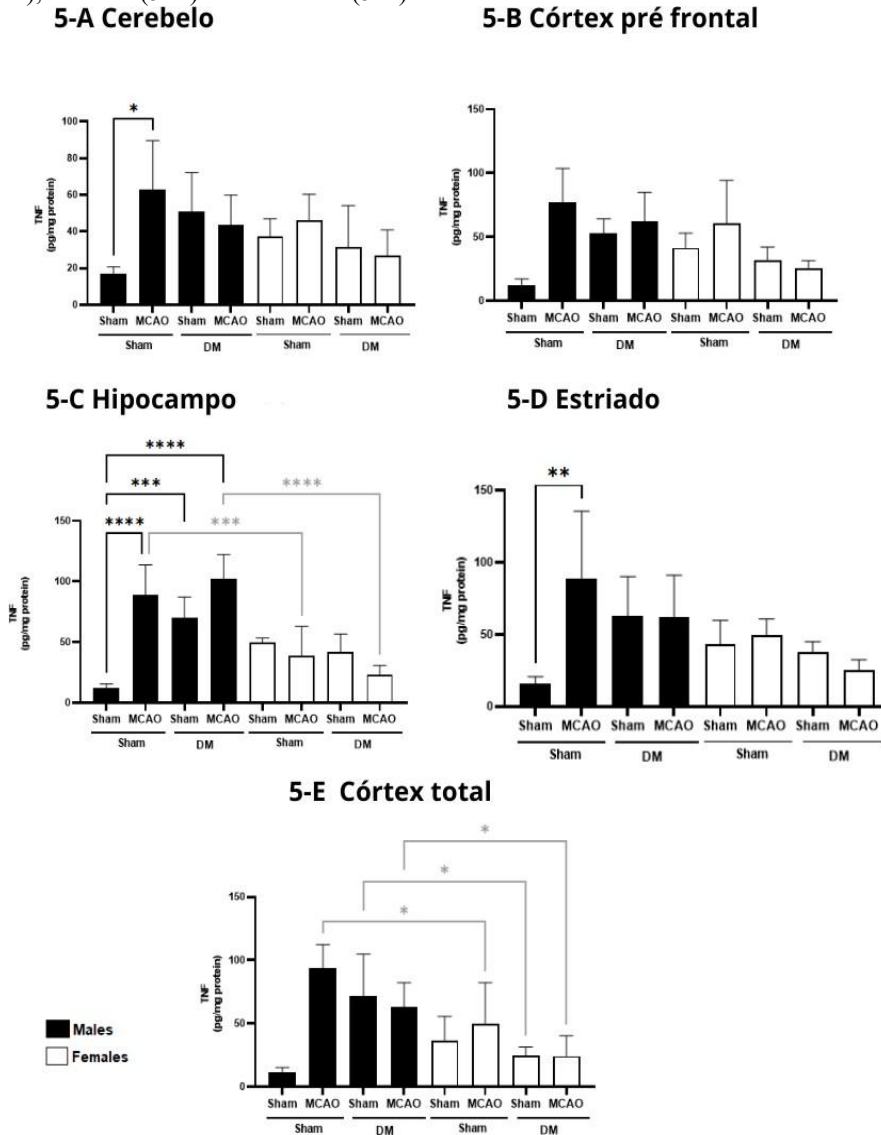
Foram avaliados os níveis de TNF- α em ratos Wistar machos e fêmeas submetidos ao modelo experimental de DM e AVCi nas regiões do cerebelo, córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex total (Figura 5).

Alterações significativas nos níveis de TNF- α foram observadas principalmente no hipocampo, estriado e córtex total. No hipocampo, os machos dos grupos controle+MCAO e DM+sham apresentaram aumento de TNF- α em relação ao grupo controle+sham, sendo esse aumento mais pronunciado nos machos quando comparados às fêmeas no grupo controle+MCAO (Figura 5-C).

No corpo estriado, os machos submetidos ao controle+MCAO exibiram níveis elevados de TNF- α em comparação ao controle+sham (Figura 5-D). Já no córtex total, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais dentro do mesmo sexo; entretanto, os machos dos grupos controle+MCAO, DM+sham e DM+MCAO apresentaram níveis significativamente mais elevados de TNF- α quando comparados às fêmeas (Figura 5-E).

Esses achados indicam um padrão de resposta inflamatória mais pronunciado nos machos, especialmente após a indução de isquemia cerebral, com destaque para o hipocampo como região mais sensível.

Figura 5 - Níveis de TNF- α quantificados em pg/ml no cerebelo (5-A), córtex pré-frontal (5- B), hipocampo (5- C), estriado (5-D) e córtex total (5-E).



Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e foram analisados por two-way ANOVA seguida pelo teste post hoc Tukey. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Fonte: Da autora, 2025.

No que se refere aos níveis de IL-1 β (Figura 6), observou-se aumento significativo dessa citocina predominantemente nos animais machos. No cerebelo, os machos do grupo controle+MCAO apresentaram níveis elevados de IL-1 β em comparação ao grupo controle+sham, além de valores superiores aos observados nas fêmeas sob as mesmas condições experimentais (Figura 6-A).

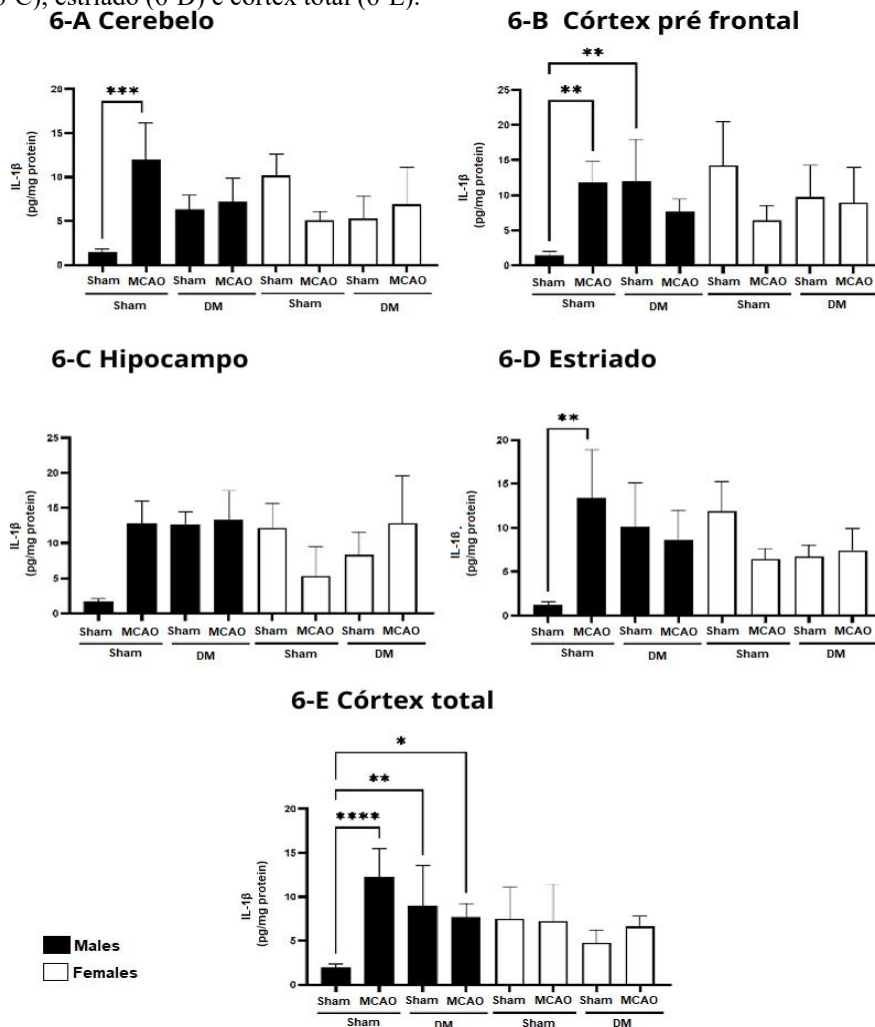
No córtex pré-frontal, os grupos controle+MCAO e DM+sham de machos também exibiram aumento dos níveis de IL-1 β em relação ao grupo controle+sham (Figura 6-B). No hipocampo, não foram detectadas alterações estatisticamente significativas (Figura 6-C).

No corpo estriado, os machos submetidos ao controle+MCAO apresentaram níveis

aumentados de IL-1 β quando comparados ao grupo controle+sham, além de valores significativamente mais elevados do que os observados nas fêmeas (Figura 6-D). De forma semelhante, no córtex total, os machos dos grupos controle+MCAO e DM+sham apresentaram aumento de IL-1 β em relação ao controle+sham (Figura 6-E).

Em contraste, não foram observadas alterações significativas nos níveis de IL-1 β em nenhuma das regiões cerebrais analisadas nas fêmeas.

Figura 6 - Níveis de IL-1 β quantificados em pg/ml no cerebelo (6-A), córtex pré-frontal (6- B), hipocampo (6-C), estriado (6-D) e córtex total (6-E).



Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e foram analisados por two-way ANOVA seguida pelo teste post hoc Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Fonte: Da autora, 2025.

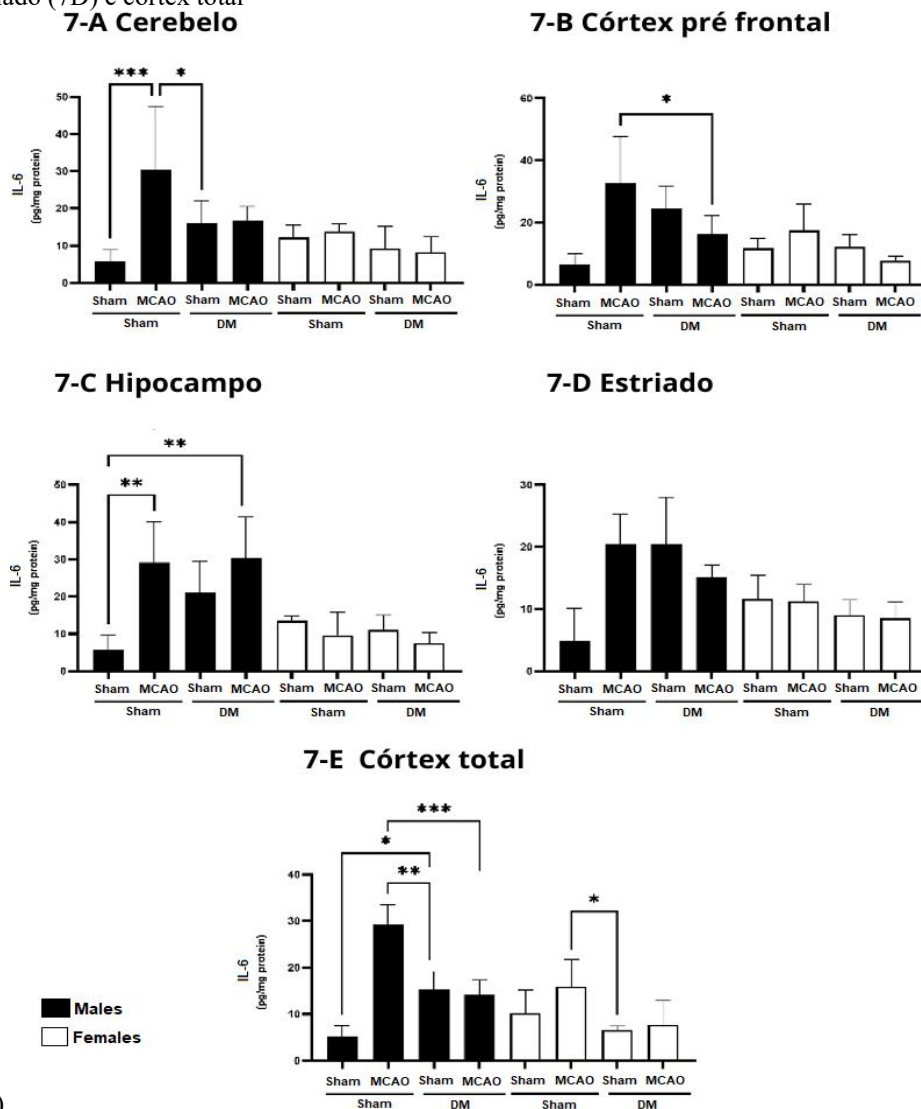
Em relação aos níveis de IL-6 (Figura 7), observou-se aumento dessa citocina predominantemente nos animais machos, com variações dependentes da região cerebral e da condição experimental. No cerebelo, os machos do grupo controle+MCAO apresentaram níveis elevados de IL-6 em comparação ao grupo controle+sham, além de valores superiores

aos observados nas fêmeas sob as mesmas condições (Figura 7-A).

No córtex pré-frontal, os machos do grupo controle+MCAO exibiram níveis aumentados de IL-6 em relação ao grupo DM+MCAO, bem como valores mais elevados quando comparados às fêmeas (Figura 7-B). No hipocampo, os machos do grupo controle+MCAO também apresentaram aumento de IL-6 em comparação ao grupo controle+sham e às fêmeas (Figura 7-C).

No corpo estriado, observaram-se diferenças entre os sexos, com os machos dos grupos controle+MCAO e DM+sham apresentando níveis mais elevados de IL-6 em relação às fêmeas (Figura 7-D). Já no córtex total, os machos do grupo DM+sham exibiram aumento de IL-6 em comparação ao controle+sham, enquanto o grupo controle+MCAO apresentou níveis superiores aos do grupo DM+MCAO (Figura 7-E).

Figura 7 - Níveis de IL-6 quantificados em pg/ml no cerebello (7A), córtex pré-frontal (7B), hipocampo (7C), estriado (7D) e córtex total (7E).



(7E).

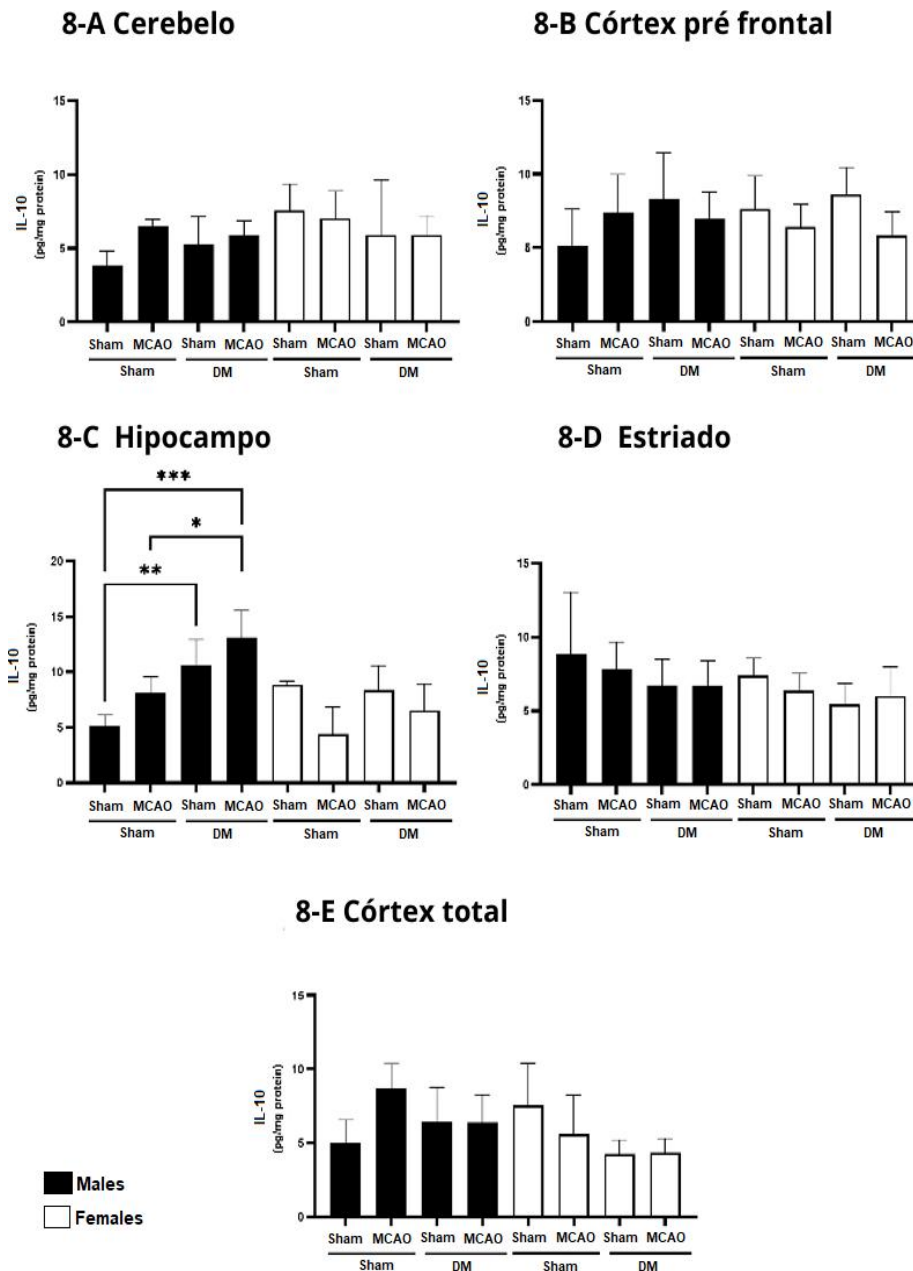
Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e foram analisados por two-way ANOVA seguida pelo teste post hoc Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Fonte: Da autora, 2025.

No que tange aos níveis de IL-10 (Figura 8), as alterações observadas foram restritas ao hipocampo (Figura 8-C). Nessa região, os machos do grupo DM+sham apresentaram níveis elevados dessa citocina, em comparação ao grupo controle+sham. Além disso, os machos do grupo DM+MCAO exibiram níveis superiores de IL-10 em relação ao grupo controle+MCAO.

As comparações entre os sexos demonstraram que os machos do grupo DM+MCAO apresentaram níveis mais elevados de IL-10 quando comparados às fêmeas sob as mesmas condições experimentais (Figura 8-C).

Figura 8 - Níveis de IL-10 quantificados em pg/ml no cerebello (8-A), córtex pré-frontal (8- B), hipocampo (8-C), estriado (8-D) e córtex total (8-E).



Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e foram analisados por two-way ANOVA seguida pelo teste post hoc Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Fonte: Da autora, 2025.

4.3 Escore neurológico após MCAO: comparação entre machos e fêmeas diabéticos

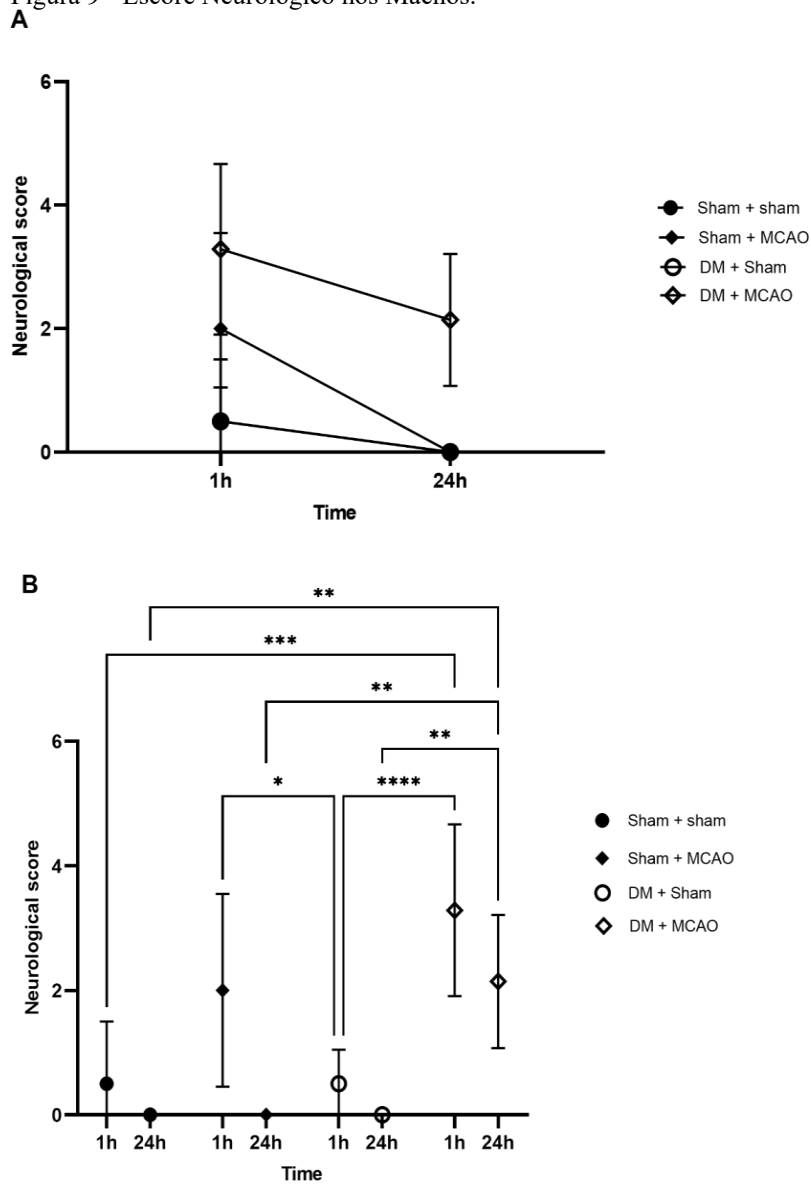
No que se refere à avaliação do déficit neurológico por meio do escore neurológico, todos os animais apresentaram escore zero no início do experimento, confirmando ausência de alterações neurológicas prévias e adequada homogeneidade basal entre os grupos.

Nos ratos machos não submetidos à indução de MCAO, os escores neurológicos permaneceram inferiores a 1 no período inicial e retornaram a zero após 24 horas do procedimento cirúrgico controle (Figura 9-A). Uma hora após a MCAO, o grupo

controle+MCAO não apresentou aumento significativo do escore neurológico, mantendo-se estável também após 24 horas. Em contraste, os animais do grupo DM+MCAO exibiram aumento significativo do déficit neurológico tanto 1 hora quanto 24 horas após a MCAO. Ademais, observou-se que o DM potencializou o dano neurológico 24 horas após a isquemia, conforme evidenciado pela comparação entre os grupos DM+MCAO e DM+sham (Figura 9-B).

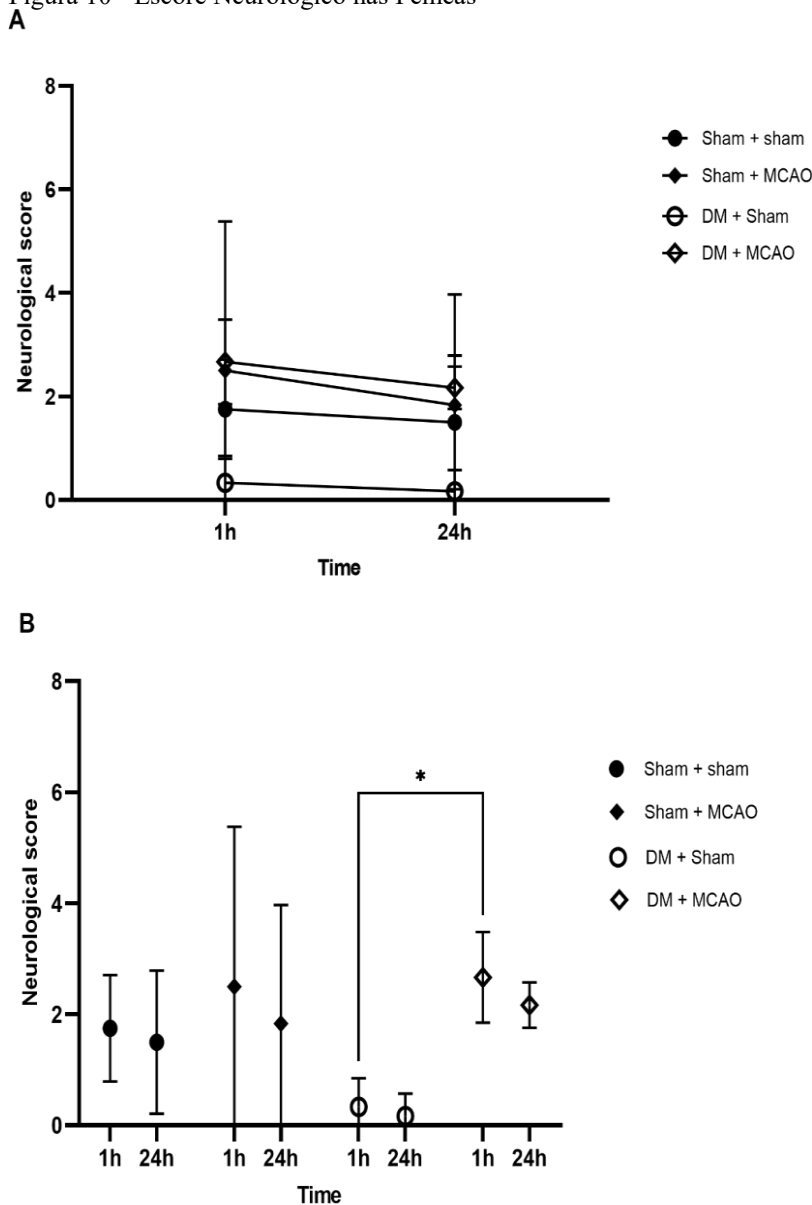
Nas fêmeas, o escore neurológico não apresentou alterações significativas nos grupos não diabéticos em nenhum dos momentos avaliados. Embora as fêmeas diabéticas tenham apresentado déficits neurológicos transitórios 1 hora após a MCAO, esses não se mantiveram após 24 horas, sugerindo recuperação funcional precoce ou impacto neurológico agudo mais brando quando comparado aos machos (Figura 10-A; 10-B).

Figura 9 - Escore Neurológico nos Machos.



Fonte: Da autora, 2025.

Figura 10 - Escore Neurológico nas Fêmeas



Fonte: Da autora, 2025.

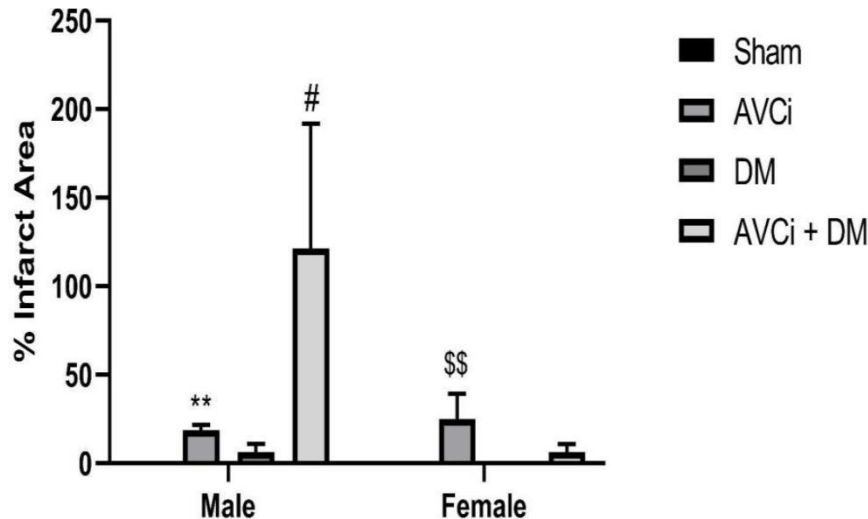
4.4 Análise da área infartada

A análise da área infartada revelou diferenças significativas entre os grupos, salientando a influência do sexo biológico e do DM na gravidade do AVCi. Nos ratos machos submetidos à isquemia cerebral, observou-se aumento da área de infarto em comparação ao grupo sham ($p < 0,01$), sendo esse efeito ainda mais pronunciado nos machos com DM associado ao AVCi, que apresentaram a maior extensão de lesão entre todos os grupos ($p < 0,001$).

Nas fêmeas, a área de infarto após o AVCi foi significativamente menor em relação aos machos, sugerindo um efeito modulador protetor do sexo feminino. Embora o DM também tenha aumentado a extensão da lesão nas fêmeas, esse incremento foi menos

expressivo, indicando que fatores sexuais podem atenuar a gravidade do dano isquêmico.

Figura 11 - Área de infarto cerebral (%) em ratos Wistar machos e fêmeas submetidos às diferentes condições experimentais (Sham, AVCi, DM e DM+AVCi).



Os valores estão expressos como média \pm erro-padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguida do teste pós-hoc de Tukey. Observou-se efeito significativo do sexo biológico e da presença do diabetes mellitus sobre a área de infarto ($p < 0,05$), com maiores valores nos machos em comparação às fêmeas, especialmente no grupo DM+AVCi ($p < 0,001$).

*MACHOS: AVCi em comparação com Sham; #comparação ao AVC; \$\$ fêmeas AVCi em comparação ao macho AVCi.

Fonte: Da autora, 2025.

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos das diferenças sexuais na resposta inflamatória após o AVCi em ratos Wistar submetidos a um modelo experimental DM. Os resultados demonstram de forma consistente que machos e fêmeas apresentam respostas inflamatórias, neurológicas e estruturais significativamente distintas, corroborando o impacto do sexo biológico na fisiopatologia do AVCi associado ao DM.

Em nosso modelo experimental a indução do DM foi eficiente em ambos os sexos, confirmada pelo aumento significativo da glicemia capilar após 48 horas. No entanto, a magnitude dessa elevação foi sexualmente dimórfica, sugerindo uma resposta metabólica específica ao sexo e possivelmente modulada por fatores hormonais.

Estudos anteriores demonstram que fêmeas apresentam maior sensibilidade à insulina e menor probabilidade de desenvolver DM2 na presença de estrogênio, enquanto condições de hipoestrogenismo, como menopausa ou ovariectomia, aumentam a resistência à insulina (Cherian et al., 2024; Kim et al., 2025). Esses dados reforçam a necessidade de incorporar o sexo biológico de forma sistemática na pesquisa pré-clínica, permitindo melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e contribuindo para o desenvolvimento de estratégias

terapêuticas mais individualizadas.

Níveis cronicamente elevados de glicose intensificam a resposta inflamatória após o AVCi, promovendo estresse oxidativo e ativação microglial exacerbada (Shukla et al., 2017). Os dados obtidos no presente estudo, demonstram que ratos machos apresentaram níveis significativamente mais elevados de TNF- α e IL-1 β quando comparados às fêmeas, mesmo sob condições hiperglicêmicas, corroborando a hipótese de efeito neuroprotetor mediado pelo estrogênio (Vegeto; Benedusi; Maggi, 2008). Esse dimorfismo sexual da resposta imunoinflamatória confirma o objetivo central do estudo, ao demonstrar que a hiperglicemia acentua a inflamação de maneira distinta entre os sexos, sugerindo que abordagens terapêuticas que integrem controle glicêmico e modulação hormonal podem ser particularmente relevantes.

Esses achados corroboram pesquisas prévias de que o DM exacerba a neuroinflamação no contexto do AVCi, promovendo maior ativação microglial, estresse oxidativo e comprometimento da integridade da BHE (Vexler; Yenari, 2009; Allen; Bayraktar; Rivera, 2016; Nunes et al., 2019). Além disso, reforçam a importância de considerar o sexo biológico como covariável essencial, uma vez que estudos em modelos animais e em humanos têm demonstrado diferenças marcantes nos desfechos neurológicos e inflamatórios entre machos e fêmeas (Prins; Korach, 2008).

De modo geral, os resultados indicam que a resposta inflamatória exacerbada observada nos machos diabéticos contribui para maior extensão do dano cerebral e piores prognósticos funcionais, enquanto as fêmeas apresentam um perfil mais regulado, compatível com os efeitos imunomoduladores do estrogênio e da progesterona (Vegeto; Benedusi; Maggi, 2008).

A cascata inflamatória pós-AVCi é caracterizada pela elevação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, associada à ativação glial e ao recrutamento leucocitário (Allada; Chesler; Mankad, 2014). Em modelos hiperglicêmicos, essa resposta é intensificada, com maior expressão de TNF- α nos machos em relação às fêmeas, reforçando o papel modulador do estrogênio na atenuação da neuroinflamação (Vegeto; Benedusi; Maggi, 2008).

A IL-1 β desempenha papel central na amplificação da inflamação cerebral, induzindo a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão endotelial e modulando a excitotoxicidade neuronal por meio do aumento da liberação de glutamato (Allan; Rothwell, 2001). Em modelos experimentais a administração exógena demonstrou intensificação do edema e dano tecidual, enquanto sua inibição demonstrou reduzir a extensão da lesão

isquêmica (Allan; Rothwell, 2003). Neste estudo, a ausência de elevação significativa de IL-1 β nas fêmeas sugere um efeito protetor endógeno, possivelmente mediado pelo estrogênio, que atua na supressão da ativação microglial por mecanismos dependentes dos receptores ER α , ER β e GPER (Spence et al., 2011).

Embora a IL-6 possua efeitos ambíguos no contexto isquêmico, exercendo funções neuroprotetoras ou pró-inflamatórias de maneira dependente do tempo e do tipo celular, neste estudo observou-se elevação mais pronunciada dessa citocina nos machos, sugerindo resposta inflamatória inicial exacerbada. Em contraste, o perfil mais controlado observado nas fêmeas indica regulação mais eficiente da inflamação, possivelmente mediada pela ativação de receptores estrogênicos, especialmente ER α , que modulam a ativação astrogliar e influenciam a magnitude da resposta inflamatória mediada por IL-6 (Spence et al., 2011).

Já foi demonstrado que a IL-6 protege os neurônios por meio da ativação da via STAT3, que por sua vez regula genes de sobrevivência antioxidantes, como Mn-SOD, e previne a apoptose induzida por ERO (Jung; Kim; Chan, 2011).

A ativação do sistema imune central constitui evento central na fisiopatologia do AVCi, sendo as citocinas pró-inflamatórias mediadores-chave desse processo (Allan; Rothwell, 2001). O aumento significativo de TNF- α , IL-1 β e IL-6 observado nos machos diabéticos sugere que a condição metabólica deteriora a resposta inflamatória pós-isquêmica, resultando em lesões neuronais mais extensas.

Chen et al. (2019a) demonstraram que essas citocinas são produzidas predominantemente por microglia ativada no fenótipo M1 após isquemia cerebral, enquanto marcadores do fenótipo M2 apresentam declínio progressivo. Dentre esses mediadores, o TNF- α destaca-se por sua capacidade de induzir necroptose em células endoteliais cerebrais por meio da ativação das vias p-RIP1 e p-MLKL, levando à ruptura da BHE, aumento da permeabilidade vascular e intensificação da infiltração inflamatória (Chen et al., 2019a). Esses mecanismos são compatíveis com os achados nesse estudo, nos quais a elevação de TNF- α nos machos sugere maior gravidade da neuroinflamação e do edema cerebral.

No que se refere à IL-10, citocina anti-inflamatória produzida por células T reguladoras e linfócitos Th2, observou-se sua presença isolada nos machos, possivelmente como resposta compensatória ao aumento das citocinas pró-inflamatórias. Em fêmeas, a ausência de elevação de IL-10 pode refletir menor ativação inflamatória basal, associada à ativação precoce de vias anti-inflamatórias mediadas por estrógenos, reduzindo a necessidade de mecanismos compensatórios tardios (Conway et al., 2015; Spsychala; Honarpisheh; Mccullough, 2017).

Esses achados sustentam a hipótese de que diferenças na secreção de IL-10 contribuem

para os distintos desfechos clínicos observados entre os sexos após o AVCi, influenciadas não apenas por fatores endócrinos, mas também por diferenças genéticas e epigenéticas (Spychala; Honarpisheh; Mccullough, 2017).

A análise das áreas infartadas revelou diferença marcante entre os sexos, com maior extensão do infarto observada nos machos, especialmente no grupo DM+AVCi, enquanto as fêmeas apresentaram menor comprometimento tecidual. Esses resultados estão de acordo com evidências que atribuem aos hormônios sexuais femininos efeitos neuroprotetores, incluindo a regulação da inflamação, redução do estresse oxidativo e atenuação da apoptose neuronal (Vegeto; Benedusi; Maggi, 2008; Spence et al., 2011; Spychala; Honarpisheh; Mccullough, 2017).

A resistência observada nas fêmeas frente à neuroinflamação pós-isquêmica é atribuída, em grande parte, à ação moduladora dos hormônios sexuais, especialmente estrogênio e progesterona. Esses hormônios exercem efeitos neuroprotetores diretos sobre neurônios e células gliais, atenuando a ativação microglial, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e modulando a expressão de moléculas de adesão na BHE, limitando a infiltração leucocitária e o edema cerebral (Vegeto; Benedusi; Maggi, 2008; Spence et al., 2011).

O estrogênio, por meio do receptor $ER\alpha$, tem demonstrado reduzir significativamente os níveis de $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ no tecido cerebral após lesão isquêmica, promovendo preservação funcional e limitando a extensão do dano neuronal (Spence et al., 2011; Vegeto; Benedusi; Maggi, 2008). Além disso, estudos em animais e seres humanos, indicam que o estrogênio contribui para a manutenção da homeostase inflamatória, favorecendo respostas imunomoduladoras precoces que diminuem a necessidade de mecanismos compensatórios, como a produção de $IL-10$ (Bushnell et al., 2018).

A progesterona complementa esse efeito, promovendo a expressão de fatores neurotróficos e proteínas antiapoptóticas, fortalecendo a sobrevivência neuronal em condições de estresse metabólico (Vegeto; Benedusi; Maggi, 2008). No modelo diabético avaliado neste estudo, as fêmeas apresentaram menor elevação das citocinas pró-inflamatórias em comparação aos machos, sugerindo que o perfil hormonal feminino confere proteção mesmo em condições de hiperglicemia crônica.

O impacto do DM sobre a extensão da lesão cerebral também se mostrou relevante, uma vez que a hiperglicemia induzida experimentalmente aumenta o volume do infarto, o edema cerebral, a ruptura da BHE e a incidência de transformação hemorrágica, resultando em piores desfechos neurológicos (Desilles et al., 2017). Esses efeitos são atribuídos à

intensificação da resposta tromboinflamatória, caracterizada por ativação e adesão de neutrófilos, elevação de MPO e MMP-9, ativação plaquetária e disfunção endotelial. Paralelamente, a hiperglicemia afeta a resposta glial, suprimindo a ativação adaptativa dos astrócitos e favorecendo a polarização microglial para o fenótipo pró-inflamatório M1, em detrimento do fenótipo M2 reparador (Dong et al., 2021; Zhang et al., 2020).

Essas duas vias, tromboinflamatória e glial, interagem de maneira sinérgica, amplificando a lesão cerebral. A microglia M1 intensifica a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que aumentam a permeabilidade da BHE e favorecem a infiltração leucocitária, enquanto a supressão da astrogliose limita mecanismos compensatórios, como o tamponamento de glutamato e a produção de fatores neurotróficos (Băcilă et al., 2025; Kulesh; Kuklina; Shestakov, 2016). A ausência da proteção estrogênica nos machos diabéticos potencializa esse ciclo vicioso, contribuindo para maior gravidade da lesão isquêmica.

Estudos adicionais reforçam o papel central da microglia na resposta inflamatória pós-AVCi. Liberale et al. (2020) demonstraram que a polarização microglial influencia diretamente a extensão do dano cerebral, com predomínio do fenótipo M1 associado a piores desfechos neurológicos. Em contrapartida, a IL-10 promove a polarização para o fenótipo M2, favorecendo reparo tecidual e recuperação funcional (Guo; Wang; Yin, 2022). Achados experimentais demonstram que a administração de IL-10 ou a transferência de células produtoras dessa citocina pode atenuar a neuroinflamação excessiva, especialmente em machos, destacando seu potencial terapêutico (Bodhankar et al., 2015; Xue et al., 2021).

Esses resultados destacam a importância terapêutica de estratégias que visem a modulação da polarização microglial, especialmente para pacientes masculinos com AVCi, a fim de prevenir a neuroinflamação excessiva, prolongada e prejudicial, além de melhorar os resultados neurológicos após isquemia. Esses achados sugerem que pode haver uma oportunidade para terapias que manipulem vias produtoras de IL-10 ou ativem o fenótipo microglial M2 com potencial neuroprotetor e recuperação funcional (Kulesh; Kuklina; Shestakov, 2016; Xue et al., 2021).

Algumas limitações devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A ausência da avaliação direta dos níveis hormonais e da caracterização do ciclo estral nas fêmeas limita a compreensão precisa da contribuição endócrina sobre as respostas inflamatórias observadas. Além disso, o modelo experimental de DM, embora amplamente utilizado, não reproduz integralmente a complexidade metabólica e clínica da doença em humanos, especialmente no que se refere à duração do diabetes e às comorbidades associadas.

Por fim, embora os achados forneçam importantes insights mecanísticos, a

extrapolação para o contexto clínico deve ser realizada com cautela, ressaltando-se a necessidade de estudos translacionais adicionais.

Em síntese, os resultados deste estudo evidenciam que o sexo biológico modula de forma decisiva a resposta inflamatória, a extensão da lesão cerebral e os desfechos estruturais após o AVCi em modelo diabético. Machos apresentaram exacerbação da neuroinflamação, com maior expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6, associada à ativação microglial pró-inflamatória e maior área de infarto. Em contrapartida, as fêmeas demonstraram perfil mais regulado, provavelmente mediado pela ação de estrógenos e progesterona sobre os receptores ER α , ER β e GPER, conferindo proteção neuronal e preservação da BHE. A integração entre fatores metabólicos, inflamatórios, gliais e hormonais reforça a importância de abordagens experimentais e terapêuticas que considerem simultaneamente o sexo biológico e o estado metabólico na compreensão da fisiopatologia do AVCi.

CONCLUSÃO

Em resumo, o sexo biológico parece influenciar de forma diferenciada a neuroinflamação e o grau de destruição neuronal após um AVC isquêmico em ratos hiperglicêmicos. Observou-se que os machos apresentam maior suscetibilidade inflamatória, enquanto nas fêmeas há evidências de efeitos neuroprotetores atribuíveis aos estrogênios. Esses achados reforçam a necessidade de análises estratificadas por sexo em estudos pré-clínicos e de considerar o sexo biológico na personalização de estratégias terapêuticas clínicas.

O perfil pró-inflamatório observado nos machos foi caracterizado por aumento das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, contrastando com a resposta atenuada das fêmeas à isquemia. Além disso, o déficit neurológico foi mais pronunciado nos machos, que também apresentaram volumes de infarto significativamente maiores, sobretudo nas regiões corticais e hipocampais, enquanto as fêmeas demonstraram menor vulnerabilidade estrutural.

Coletivamente, esses dados indicam que o sexo biológico é um determinante crítico dos desfechos do AVCi em condições diabéticas, com os machos sendo mais propensos à inflamação exacerbada, déficits funcionais e maior extensão do infarto. Tais achados ressaltam a importância de controlar o sexo em investigações experimentais e de incorporar essa variável no planejamento de intervenções terapêuticas personalizadas para pacientes com AVC associado ao diabetes

REFERÊNCIAS

- ABAIMOV, Denis A. *et al.* Evaluation of Ouabain's Tissue Distribution in C57/Black Mice Following Intraperitoneal Injection, Using Chromatography and Mass Spectrometry. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 8, 13 abr. 2024.
- ABDULLAHI, Wazir; TRIPATHI, Dinesh; RONALDSON, Patrick T. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 315, n. 3, p. C343–C356, set. 2018.
- ADERINTO, Nicholas *et al.* The impact of diabetes in cognitive impairment: A review of current evidence and prospects for future investigations. **Medicine**, v. 102, n. 43, p. e35557, 27 out. 2023.
- ALLAN, Stuart M.; ROTHWELL, Nancy J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 10, p. 734–744, 1 out. 2001.
- ALLAN, Stuart M.; ROTHWELL, Nancy J. Inflammation in central nervous system injury. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 358, n. 1438, p. 1669–1677, 27 ago. 2003.
- ALTAEI, Raaed; GIBSON, Claire L. Sexual dimorphism following in vitro ischemia in the response to neurosteroids and mechanisms of injury. **BMC neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 5, 29 jan. 2020.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. Supplement_1, p. S73–S85, 24 nov. 2017.
- BĂCILĂ, Ciprian-Ionuț *et al.* The Role of IL-6 and TNF-Alpha Biomarkers in Predicting Disability Outcomes in Acute Ischemic Stroke Patients. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 1, 2 jan. 2025.
- BACK, T. *et al.* Diffusion nuclear magnetic resonance imaging in experimental stroke. Correlation with cerebral metabolites. **Stroke**, v. 25, n. 2, p. 494–500, fev. 1994.
- BAHADAR, Ghaith A.; SHAH, Zahoor A. Intracerebral Hemorrhage and Diabetes Mellitus: Blood-Brain Barrier Disruption, Pathophysiology and Cognitive Impairments. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 20, n. 4, p. 312–326, 2021.
- BODHANKAR, Sheetal *et al.* Role for microglia in sex differences after ischemic stroke: importance of M2. **Metabolic brain disease**, v. 30, n. 6, p. 1515–1529, dez. 2015.
- BARIĆ, Anja; DOBRIVOJEVIĆ RADMILOVIĆ, Marina. Microglia and bradykinin cross-talk in post-stroke cognitive impairment in diabetes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 320, 27 jan. 2021.
- BLÜHER, Matthias. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–298, maio 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2023: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigitel/vigitel-brasil-2023-vigilancia-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas-por-inquerito-telefonico>. Acesso em: 26 abr. 2025.
- BSAT, Shadi *et al.* Acute ischemic stroke biomarkers: a new era with diagnostic promise? **Acute**

medicine & surgery, v. 8, n. 1, p. e696, dez. 2021.

BUSHNELL, Cheryl D. *et al.* Sex differences in stroke: Challenges and opportunities. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 38, n. 12, p. 2179–2191, dez. 2018.

CANDELARIO-JALIL, Eduardo; PAUL, Surojit. Impact of aging and comorbidities on ischemic stroke outcomes in preclinical animal models: A translational perspective. **Experimental neurology**, v. 335, p. 113494, jan. 2021.

CHEN, An-Qi *et al.* Microglia-derived TNF- α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke. **Cell death & disease**, v. 10, n. 7, p. 487, 20 jun. 2019a.

CHEN, J. *et al.* Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. **Stroke**, v. 32, n. 4, p. 1005–1011, abr. 2001.

CHEN, Z. *et al.* Brain-Derived Microparticles (BDMPs) Contribute to Neuroinflammation and Lactadherin Reduces BDMP Induced Neuroinflammation and Improves Outcome After Stroke. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 26 nov. 2019b.

CHENG, J. *et al.* Early glycolytic reprogramming controls microglial inflammatory activation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 129, 9 dez. 2021.

CHERIAN, Celena M. *et al.* Consideration of sex as a biological variable in diabetes research across twenty years. **Biology of Sex Differences**, v. 15, n. 1, p. 19, 26 fev. 2024.

COLE, J. B.; FLOREZ, J. C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 7, p. 377–390, 12 jul. 2020.

CONWAY, Sarah E. *et al.* Sex differences and the role of IL-10 in ischemic stroke recovery. **Biology of Sex Differences**, v. 6, n. 1, p. 17, 12 out. 2015.

CORREA-PAZ, C. *et al.* New Approaches in Nanomedicine for Ischemic Stroke. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 757, 20 maio 2021.

COPPOLA, T. *et al.* Bridging the Gap Between Diabetes and Stroke in Search of High Clinical Relevance Therapeutic Targets. **Neuromolecular medicine**, v. 21, n. 4, p. 432–444, dez. 2019.

CRAPSER, J. *et al.* Ischemic stroke induces gut permeability and enhances bacterial translocation leading to sepsis in aged mice. **Aging**, v. 8, n. 5, p. 1049–1063, 25 abr. 2016.

DHAMOON, M. S. *et al.* Sex Differences in Outcomes after Stroke in Patients with Diabetes in Ontario, Canada. **Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association**, v. 27, n. 1, p. 210–220, jan. 2018.

DE MELO, I. S. *et al.* Modulation of Glucose Availability and Effects of Hypo- and Hyperglycemia on Status Epilepticus: What We Do Not Know Yet? **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 2, p. 505–519, 25 fev. 2021.

DE MORAES BERNAL, H. *et al.* Incidence of hospitalization and mortality due to stroke in young adults, residents of developed regions in Brazil, 2008-2018. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0242248, 16 nov. 2020.

DEFRONZO, R. A. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 773–795, 1 abr. 2009.

- DESILLES, Jean-Philippe *et al.* Exacerbation of Thromboinflammation by Hyperglycemia Precipitates Cerebral Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation. *Stroke*, v. 48, n. 7, p. 1932–1940, jul. 2017.
- DEVANNEY, N. A.; STEWART, A. N.; GENSEL, J. C. Microglia and macrophage metabolism in CNS injury and disease: The role of immunometabolism in neurodegeneration and neurotrauma. *Experimental Neurology*, v. 329, p. 113310, 1 jul. 2020.
- DIMEGLIO, L. A.; EVANS-MOLINA, C.; ORAM, R. A. Type 1 diabetes. *The Lancet*, v. 391, n. 10138, p. 2449–2462, jun. 2018.
- EISENHUT, M. In diabetic ketoacidosis brain injury including cerebral oedema and infarction is caused by interleukin-1. *Medical Hypotheses*, v. 121, p. 44–46, dez. 2018.
- FAROOQ, J. *et al.* Stem Cells as Drug-like Biologics for Mitochondrial Repair in Stroke. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 7, p. 615, 1 jul. 2020.
- FASELIS, C. *et al.* Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Vascular Pharmacology*, v. 18, n. 2, p. 117–124, 27 jan. 2020.
- FELDMAN, R. A. Microglia orchestrate neuroinflammation. *eLife*, v. 11, 22 ago. 2022.
- FERRARI, Federica *et al.* Glutamate metabolism in cerebral mitochondria after ischemia and post-ischemic recovery during aging: relationships with brain energy metabolism. *Journal of neurochemistry*, v. 146, n. 4, p. 416–428, ago. 2018.
- FERRARI, Federica; MORETTI, Antonio; VILLA, Roberto Federico. Hyperglycemia in acute ischemic stroke: physiopathological and therapeutic complexity. *Neural regeneration research*, v. 17, n. 2, p. 292–299, fev. 2022.
- FLEGAL, K. M. Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008. *JAMA*, v. 303, n. 3, p. 235, 20 jan. 2010.
- FOLSOM, A. R. *et al.* Prospective associations of fasting insulin, body fat distribution, and diabetes with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Diabetes Care*, v. 22, n. 7, p. 1077–1083, 1 jul. 1999.
- GALICIA-GARCIA, Unai *et al.* Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 17, 30 ago. 2020.
- GONG, L. *et al.* RTN1-C mediates cerebral ischemia/reperfusion injury via ER stress and mitochondria-associated apoptosis pathways. *Cell Death & Disease*, v. 8, n. 10, p. e3080–e3080, 5 out. 2017.
- GUBSKIY, I. L. *et al.* MRI Guiding of the Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats Aimed to Improve Stroke Modeling. *Translational Stroke Research*, v. 9, n. 4, p. 417–425, 25 ago. 2018.
- GUO, Shenrui; WANG, Hui; YIN, Yafu. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in aging neuroscience*, v. 14, p. 815347, 2022.
- HAFFNER, S. M. *et al.* Mortality from Coronary Heart Disease in Subjects with Type 2 Diabetes and in Nondiabetic Subjects with and without Prior Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, v. 339, n. 4, p. 229–234, 23 jul. 1998.
- HAW, J. S. *et al.* Long-term Sustainability of Diabetes Prevention Approaches. *JAMA Internal*

Medicine, v. 177, n. 12, p. 1808, 1 dez. 2017.

HE, Q. et al. Biological Functions and Regulatory Mechanisms of Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Ischemic Stroke. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 13 dez. 2021.

HOOGWERF, B. J. Type of diabetes mellitus: Does it matter to the clinician? **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 87, n. 2, p. 100–108, 1 fev. 2020.

HUANG, M. et al. Bioinformatic Analysis of Exosomal MicroRNAs of Cerebrospinal Fluid in Ischemic Stroke Rats After Physical Exercise. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 6, p. 1540–1553, 11 jun. 2021.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Brazil – **IDF Diabetes Atlas**. Bruxelas: IDF, 2025c. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/data-by-location/country/brazil/>. Acesso em: 27 abr. 2025.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Mortality attributable to diabetes (20–79 y): Deaths attributable to diabetes. **IDF Diabetes Atlas, 2025b**. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/data-by-indicator/mortality-attributable-to-diabetes-20-79-y/deaths-attributable-to-diabetes/> Acesso em: 27 abr. 2025

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Total adult population (20–79 y), in 1,000s. **IDF Diabetes Atlas, 2025a**. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/data-by-indicator/demographics/total-adult-population-20-79-y-in-1000s/>. Acesso em: 26 abr. 2025.

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, n. 12, p. 1522–1524, dez. 2002.

JUNG, Joo Eun; KIM, Gab Seok; CHAN, Pak H. Neuroprotection by Interleukin-6 Is Mediated by Signal Transducer and Activator of Transcription 3 and Antioxidative Signaling in Ischemic Stroke. **Stroke**, v. 42, n. 12, p. 3574–3579, 1 dez. 2011.

KATSAROU, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17016, 21 dez. 2017.

KAWAHITO, S.; KITAHATA, H.; OSHITA, S. Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 33, p. 4137, 2009.

KHAN, M. A. B. et al. Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 10, n. 1, p. 107, 2019.

KIM, Boyoung *et al.* Sex-specific differences in glucose metabolism and pancreatic function in streptozotocin-induced diabetic mice: The protective role of estrogen. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 775, p. 152176, 15 ago. 2025.

KIM, J. S. Post-stroke Mood and Emotional Disturbances: Pharmacological Therapy Based on Mechanisms. **Journal of Stroke**, v. 18, n. 3, p. 244–255, 30 set. 2016.

KOENEN, M. et al. Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction. **Circulation Research**, v. 128, n. 7, p. 951–968, 2 abr. 2021.

KOUVARI, M. et al. Metabolic Syndrome, Cognitive Impairment and the Role of Diet: A Narrative Review. **Nutrients**, v. 14, n. 2, 13 jan. 2022.

- KRAMER, M. et al. TTC staining of damaged brain areas after MCA occlusion in the rat does not constrict quantitative gene and protein analyses. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 187, n. 1, p. 84–89, mar. 2010.
- KULESH, A. A.; KUKLINA, E. M.; SHESTAKOV, V. V. [THE RELATIONSHIP BETWEEN SERUM AND LIQUOR IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10 LEVELS AND CLINICAL, COGNITIVE AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS IN ACUTE ISCHEMIC STROKE]. **Klinicheskaia meditsina**, v. 94, n. 9, p. 657–662, 2016.
- LAU, L. et al. Prevalence of diabetes and its effects on stroke outcomes: A meta-analysis and literature review. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 10, n. 3, p. 780–792, 13 maio 2019.
- LEMMERMAN, L. et al. Transient Middle Cerebral Artery Occlusion with an Intraluminal Suture Enables Reproducible Induction of Ischemic Stroke in Mice. **BIO-PROTOCOL**, v. 12, n. 3, 2022.
- LENZEN, S.; MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, n. 7, p. 1385–1391, set. 1991.
- LI, P. *et al.* Early release of cytochrome C and activation of caspase-3 in hyperglycemic rats subjected to transient forebrain ischemia. **Brain research**, v. 896, n. 1–2, p. 69–76, 30 mar. 2001.
- LI, Y.-Q. et al. Targeting NLRP3 inflammasome improved the neurogenesis and post-stroke cognition in a mouse model of photothrombotic stroke. **NeuroReport**, v. Publish Ah, 22 jun. 2020.
- LIBERALE, Luca *et al.* Postischemic Administration of IL-1 α Neutralizing Antibody Reduces Brain Damage and Neurological Deficit in Experimental Stroke. **Circulation**, v. 142, n. 2, p. 187–189, 14 jul. 2020.
- LIN, D. et al. The Role of Oxidative Stress in Common Risk Factors and Mechanisms of Cardio-Cerebrovascular Ischemia and Depression. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–13, 15 nov. 2019.
- LIN, S.-Y. et al. TNF- α Receptor Inhibitor Alleviates Metabolic and Inflammatory Changes in a Rat Model of Ischemic Stroke. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 851, 26 maio 2021.
- LINTON, M. F. et al. **The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis**. [s.l.] MDText.com, Inc., 2000. v. 111
- LIU, F.; MCCULLOUGH, L. D. Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Rodents: Methods and Potential Pitfalls. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–9, 2011.
- LIU, Q.; SOROOSHYARI, S. K. Quantitative and Correlational Analysis of Brain and Spleen Immune Cellular Responses Following Cerebral Ischemia. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 8 jun. 2021.
- LIU, S. et al. Rodent Stroke Model Guidelines for Preclinical Stroke Trials (1St Edition). **Journal of Experimental Stroke and Translational Medicine**, v. 2, n. 2, p. 2–27, jan. 2009.
- LOVIC, D. et al. The Growing Epidemic of Diabetes Mellitus. **Current Vascular Pharmacology**, v. 18, n. 2, p. 104–109, 27 jan. 2020.
- LUITSE, M. J. et al. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 3, p. 261–271, mar. 2012.

- LUNA, R. et al. A Comprehensive Review of Neuronal Changes in Diabetics. **Cureus**, v. 13, n. 10, p. e19142, 30 out. 2021.
- MAIDA, C. D. et al. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6454, 4 set. 2020.
- MADSEN, T. E. et al. Sex differences in cardiovascular risk profiles of ischemic stroke patients with diabetes in the Greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study. **Journal of Diabetes**, v. 10, n. 6, p. 496–501, 2018.
- MCALLISTER, M. S. et al. Mechanisms of glucose transport at the blood–brain barrier: an in vitro study. **Brain Research**, v. 904, n. 1, p. 20–30, jun. 2001.
- MCCULLOUGH, L. D. et al. Aromatase Cytochrome P450 and Extragonadal Estrogen Play a Role in Ischemic Neuroprotection. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8701–8705, 24 set. 2003.
- MORRIS, G. P. et al. A Comparative Study of Variables Influencing Ischemic Injury in the Longa and Koizumi Methods of Intraluminal Filament Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148503, 12 fev. 2016.
- MOZAFFARIAN, D. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. **Circulation**, v. 133, n. 4, 26 jan. 2016.
- NA, K.-S.; JUNG, H.-Y.; KIM, Y.-K. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 48, p. 277–286, jan. 2014.
- NIJLAND, P. G. et al. Cellular distribution of glucose and monocarboxylate transporters in human brain white matter and multiple sclerosis lesions. **Glia**, v. 62, n. 7, p. 1125–1141, jul. 2014.
- NIU, P. et al. Immune regulation based on sex differences in ischemic stroke pathology. **Frontiers in immunology**, v. 14, p. 1087815, 2023.
- OLESEN, K. K. W. et al. Diabetes Mellitus Is Associated With Increased Risk of Ischemic Stroke in Patients With and Without Coronary Artery Disease. **Stroke**, v. 50, n. 12, p. 3347–3354, 1 dez. 2019.
- ORNELLO, R. et al. Distribution and Temporal Trends From 1993 to 2015 of Ischemic Stroke Subtypes. **Stroke**, v. 49, n. 4, p. 814–819, abr. 2018.
- PACIARONI, Maurizio *et al.* Acute hyperglycemia and early hemorrhagic transformation in ischemic stroke. **Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 2, p. 119–123, 2009.
- PANDYA, R. S. et al. Central nervous system agents for ischemic stroke: neuroprotection mechanisms. **Central nervous system agents in medicinal chemistry**, v. 11, n. 2, p. 81–97, 1 jun. 2011.
- PASHAPOOR, A.; MASHHADYRAFIE, S.; MORTAZAVI, P. Ameliorative effect of *Myristica fragrans* (nutmeg) extract on oxidative status and histology of pancreas in alloxan induced diabetic rats. **Folia Morphologica**, 3 set. 2015.
- PETERSMANN, A. et al. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 127, n. S 01, p. S1–S7, 20 dez. 2019.
- PRZYKAZA, L. Understanding the Connection Between Common Stroke Comorbidities, Their Associated Inflammation, and the Course of the Cerebral Ischemia/Reperfusion Cascade. **Frontiers in**

Immunology, v. 12, 15 nov. 2021.

RÉUS, G. Z. et al. Antioxidant treatment ameliorates experimental diabetes-induced depressive-like behaviour and reduces oxidative stress in brain and pancreas. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 32, n. 3, p. 278–288, mar. 2016.

ROJAS, M. et al. Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: Pathophysiologic and pharmacotherapeutics links. **World Journal of Diabetes**, v. 12, n. 6, p. 745–766, 15 jun. 2021.

ROM, S. et al. Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 3, p. 1883–1896, 5 mar. 2019.

ROM, S. et al. Hyperglycemia and advanced glycation end products disrupt BBB and promote occludin and claudin-5 protein secretion on extracellular microvesicles. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7274, 29 abr. 2020.

ROSSO, C. *et al.* Hyperglycemia and the fate of apparent diffusion coefficient-defined ischemic penumbra. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v. 32, n. 5, p. 852–856, maio 2011.

SAHARIAH, P. et al. Therapeutic Potential of *Dillenia indica* L. in Attenuating Hyperglycemia-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Alloxan-Administered Diabetic Mice. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 28, n. 5, p. 105, 26 maio 2023.

SAINI, V.; GUADA, L.; YAVAGAL, D. R. Global Epidemiology of Stroke and Access to Acute Ischemic Stroke Interventions. **Neurology**, v. 97, n. 20 Supplement 2, p. S6–S16, 16 nov. 2021.

SCHEPERS, V. P. M. et al. Comparing contents of functional outcome measures in stroke rehabilitation using the International Classification of Functioning, Disability and Health. **Disability and Rehabilitation**, v. 29, n. 3, p. 221–230, 7 jan. 2007.

SEDOVA, P. et al. Incidence of Stroke and Ischemic Stroke Subtypes: A Community-Based Study in Brno, Czech Republic. **Cerebrovascular Diseases**, v. 50, n. 1, p. 54–61, 2021.

SELVIN, E. et al. Cardiovascular Outcomes in Trials of Oral Diabetes Medications. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, n. 19, p. 2070, 27 out. 2008.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, n. 1, p. 4–14, jan. 2010.

SHEPARD, B. D. Sex differences in diabetes and kidney disease: Mechanisms and consequences. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 317, n. 2, p. F456–F462, 1 ago. 2019.

SHI, K. et al. Stroke-induced immunosuppression and poststroke infection. **Stroke and Vascular Neurology**, v. 3, n. 1, p. 34–41, mar. 2018.

SHUKLA, Vibha *et al.* Cerebral ischemic damage in diabetes: an inflammatory perspective. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 21, 23 jan. 2017.

SIMS, S.-K. K.-C. et al. Comparative Enhancement of Motor Function and BDNF Expression Following Different Brain Stimulation Approaches in an Animal Model of Ischemic Stroke. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 34, n. 10, p. 925–935, 10 out. 2020.

SONG, Eun-Chol *et al.* Hyperglycemia exacerbates brain edema and perihematomal cell death after intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 34, n. 9, p. 2215–2220, set. 2003.

SORIANO-REIXACH, M. M. et al. Interaction of Sex and Diabetes on Outcome After Ischemic Stroke. **Frontiers in neurology**, v. 9, p. 250, 2018.

SPENCE, Rory D. *et al.* Neuroprotection mediated through estrogen receptor- α in astrocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 21, p. 8867–8872, 24 maio 2011.

SPYCHALA, Monica S.; HONARPISHEH, Pedram; MCCULLOUGH, Louise D. Sex differences in neuroinflammation and neuroprotection in ischemic stroke. **Journal of neuroscience research**, v. 95, n. 1–2, p. 462–471, 2 jan. 2017.

SU, X.-T. et al. Mechanisms of Acupuncture in the Regulation of Oxidative Stress in Treating Ischemic Stroke. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–15, 24 out. 2020.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**, v. 50, n. 6, p. 537–46, 2001.

TAYLOR, K. S. et al. All-Cause and Cardiovascular Mortality in Middle-Aged People With Type 2 Diabetes Compared With People Without Diabetes in a Large U.K. Primary Care Database. **Diabetes Care**, v. 36, n. 8, p. 2366–2371, 1 ago. 2013.

TOMLINSON, D. R.; GARDINER, N. J. Glucose neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 36–45, jan. 2008.

TURNER, G. M. et al. Stroke risk following traumatic brain injury: Systematic review and meta-analysis. **International Journal of Stroke**, v. 16, n. 4, p. 370–384, 4 jun. 2021.

VEGETO, Elisabetta; BENEDUSI, Valeria; MAGGI, Adriana. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: A therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 4, p. 507–519, 1 out. 2008.

VENKAT, Poornima; CHOPP, Michael; CHEN, Jieli. Blood-Brain Barrier Disruption, Vascular Impairment, and Ischemia/Reperfusion Damage in Diabetic Stroke. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 6, 1 jun. 2017.

VERMA, S. et al. Influence of Microvascular Disease on Cardiovascular Events in Type 2 Diabetes. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 73, n. 21, p. 2780–2782, jun. 2019.

VIEIRA, A. et al. Increased on oxidative brain injury in the diabetic rats following sepsis. **Synapse**, v. 68, n. 9, p. 410–418, set. 2014.

VILLA, Roberto Federico *et al.* Energy metabolism of cerebral mitochondria during aging, ischemia and post-ischemic recovery assessed by functional proteomics of enzymes. **Neurochemistry international**, v. 63, n. 8, p. 765–781, dez. 2013.

VILAR, L. **Endocrinologia clínica**, 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022.

VIRANI, S. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2021 Update. **Circulation**, v. 143, n. 8, p. E254–E743, 23 fev. 2021.

VITTURI, B. K. et al. Prevalence and Predictors of Fatigue and Neuropsychiatric Symptoms in Patients with Minor Ischemic Stroke. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 30, n. 9, p. 105964, set. 2021.

WANG, L. et al. Neurovascular Unit: A critical role in ischemic stroke. **CNS Neuroscience &**

Therapeutics, v. 27, n. 1, p. 7–16, 2 jan. 2021.

WEI, X. et al. Hyperglycemia Aggravates Blood–Brain Barrier Disruption Following Diffuse Axonal Injury by Increasing the Levels of Inflammatory Mediators through the PPAR γ /Caveolin-1/TLR4 Pathway. **Inflammation**, v. 46, n. 1, p. 129–145, 20 fev. 2023.

WOLSKA, M. et al. Long Non-coding RNAs as Promising Therapeutic Approach in Ischemic Stroke: a Comprehensive Review. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 4, p. 1664–1682, 24 abr. 2021.

WON, Seok Joon *et al.* Hyperglycemia promotes tissue plasminogen activator-induced hemorrhage by Increasing superoxide production. **Annals of neurology**, v. 70, n. 4, p. 583–590, out. 2011.

WOODBURN, S. C.; BOLLINGER, J. L.; WOHLEB, E. S. The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 258, 6 nov. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Stroke (Cerebrovascular Accident)**, 2020. Disponível em: <<https://www.emro.who.int/health-topics/stroke-cerebrovascular-accident/index.html>>. Acesso em: 26 abr. 2025.

XU, Q. et al. Relevant mediators involved in and therapies targeting the inflammatory response induced by activation of the NLRP3 inflammasome in ischemic stroke. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 123, 31 dez. 2021.

XUE, Yimeng *et al.* Microglial Polarization: Novel Therapeutic Strategy against Ischemic Stroke. **Aging and disease**, v. 12, n. 2, p. 466–479, abr. 2021.

YOUN, Y. J. et al. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors and their potential role in dementia onset and cognitive function in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 73, p. 101131, abr. 2024.

YU, O. H. Y.; SUISSA, S. Identifying Causes for Excess Mortality in Patients With Diabetes: Closer but Not There Yet. **Diabetes Care**, v. 39, n. 11, p. 1851–1853, 1 nov. 2016.

ZENG, J. et al. TRIM9-Mediated Resolution of Neuroinflammation Confers Neuroprotection upon Ischemic Stroke in Mice. **Cell Reports**, v. 27, n. 2, p. 549- 560.e6, abr. 2019.

ZHANG, J. et al. TREM-2-p38 MAPK signaling regulates neuroinflammation during chronic cerebral hypoperfusion combined with diabetes mellitus. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 2, 3 dez. 2020.

ZHANG, Ziyang; YAN, Jingqi; SHI, Honglian. Role of Hypoxia Inducible Factor 1 in Hyperglycemia-Exacerbated Blood-Brain Barrier Disruption in Ischemic Stroke. **Neurobiology of disease**, v. 95, p. 82–92, nov. 2016.

ZHU, Bihong *et al.* Stress Hyperglycemia and Outcome of Non-diabetic Patients After Acute Ischemic Stroke. **Frontiers in Neurology**, v. 10, 18 set. 2019.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **14/03/2023**.

Título do projeto	O impacto da diabetes sobre parâmetros neuroquímicos e comportamentais no acidente vascular cerebral isquêmico: um estudo pré-clínico.
Project title	The impact of diabetes on neurochemical and behavioral parameters in ischemic stroke: a preclinical study.
Número do protocolo Protocol number	17/2023
Pesquisador principal Principal Investigator	Fabricia Petronilho
Pesquisadores Researchers	Richard Simon Machado, Larissa Joaquim, Solange de Souza Stork, Lucineia Gainski Danielski, Fernanda Frederico Gava, Khiany Mathias, David dos Santos, Vilson Heinzen Cardoso.
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/05/2023 a 30/04/2024
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	60 dias / 250 – 300g
Número de animais	Masculino 84 + Feminino 84 = 168
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Josiane Budni
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 14 de março de 2023

ANEXO B - Escala para avaliação do déficit neurológico

Escala de déficit neurológico (EDN)	Pts.
Testes motores	
Segurando o rato pela cauda (1) Flexão de membro anterior (1) Flexão de membro posterior (1) Movimento de cabeça > 10° para o eixo vertical em 30s	3
Colocando o rato no chão (normal = 0; máximo = 3) (0) Marcha normal (1) Incapacidade de andar em linha reta (2) Paresia com andar em círculo para o lado parético (3) Paresia com queda para o lado parético	3
Testes sensoriais	2
(1) Teste de colocação (teste visual e tátil) (2) Teste propriceptivo (sensação de profundidade, empurrando a pata contra a borda da mesa para estimular os músculos do membro)	
Teste de equilíbrio na trave (normal = 0; máximo = 6)	6
(0) Equilíbrio com postura firme (1) Segura o lado da trave (2) Abraça a trave e um membro cai da plataforma (3) Abraça a trave e dois membros caem da plataforma ou gira na plataforma (>60s) (4) Tenta se equilibrar na trave, mas cai (>40s) (5) Tenta se equilibrar na trave, mas cai (>20s) (6) Nenhuma tentativa de se equilibrar ou segurar na trave (<20s)	
Reflexos ausentes e movimentos anormais	4
(1) Reflexo do pavilhão auricular (agitação de cabeça ao tocar o pavilhão auricular) (1) Reflexo corneano (piscar os olhos ao tocar levemente as pálpebras com algodão) (1) Reflexo de sobressalto (resposta motora a um breve estímulo sonoro ao rasgar uma (1) Crises epilépticas, mioclonias e/ou mioclonias)	
Pontuação máxima	18
1 ponto é concedido pela incapacidade de realizar as tarefas ou pela falta de um reflexo testado; 1 a 6 pontos indica lesão neurológica leve; 7 a 12 pontos indica lesão neurológica moderada; 13 a 18 pontos indica lesão neurológica grave.	