

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS MORFOFUNCIONAIS E
ULTRAESTRUTURAIS DOS DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 E
DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 NO FÍGADO DE RATOS**

JONAS RODRIGUES SANCHES

São Luís

2023

JONAS RODRIGUES SANCHES

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS MORFOFUNCIONAIS E
ULTRAESTRUTURAIS DOS DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 E
DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 NO FÍGADO DE RATOS**

Dissertação ou Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

Co-orientador: Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto

São Luís

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Sanches, Jonas Rodrigues.

Análise comparativa dos efeitos morfofuncionais e ultraestruturais dos diabetes mellitus tipo 1 e diabetes mellitus tipo 2 no fígado de ratos / Jonas Rodrigues Sanches. - 2023.

118 p.

Coorientador(a): Bruno Araújo Serra Pinto.

Orientador(a): Antonio Marcus de Adrade Paes.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2023.

1. AFM (Microscopia de Força Atômica). 2. Diabetes mellitus. 3. Esteatose hepática. 4. Fibrose hepática. I. Paes, Antonio Marcus de Adrade. II. Pinto, Bruno Araújo Serra. III. Título.

JONAS RODRIGUES SANCHES

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS EFEITOS MORFOFUNCIONAIS E
ULTRAESTRUTURAIS DOS *DIABETES MELLITUS* TIPO 1 E *DIABETES
MELLITUS* TIPO 2 NO FÍGADO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em 02/10/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Luciana Magalhães Rebelo Alencar
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Paulo César de Freitas Mathias
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Rachel Melo Ribeiro
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Karla Frida Torres Flister
Universidade Federal do Maranhão

“Exu matou um pássaro ontem com uma pedra que só jogou hoje” - Eu não sinto que eu vim, eu sinto que eu voltei. E que, de alguma forma, meus sonhos e minhas lutas começaram muito tempo antes da minha chegada” (AmarElo, 2020)

Dedico este trabalho, que representa uma etapa ímpar na minha vida, a minha mãe, Dona Audacy. Mulher guerreira e meu maior exemplo.

Á minha família, pelo incentivo e apoio. Á minha avó Marcelina e filha Sofia (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marcus Paes**, meu orientador ao longo de uma década, expresso minha profunda gratidão pela oportunidade e por ser o exemplo supremo de liderança que eu já conheci. Sua generosidade tem sido o alicerce que me permitiu chegar a este ponto.

Ao **Prof. Dr. Bruno Araújo**, meu coorientador, agradeço por abrir as portas de sua casa, por seu acolhimento e compreensão. Obrigado por compartilhar seu precioso tempo e vasto conhecimento.

Minha eterna gratidão vai para minha mãe e meus irmãos, **Jefferson e Janine**, por seu constante apoio aos meus estudos e por sempre me considerarem uma pessoa especial em suas vidas. Meu carinho por vocês é imenso.

A minha amada esposa, **Marina Maranhão**, você foi meu alicerce, professora, calma e proteção durante toda essa jornada. Obrigado por construir nossa família comigo. Meu coração pertence inteiramente a você.

Aos meus filhos, **Alberth, Samuel e Helena**, agradecer nunca será suficiente. Minha vida gira em torno de vocês, e meu amor por vocês é infinito.

Ao Laboratório de Fisiologia Experimental (LeFisio) e seu dedicado "staff" (**Lucas, Karla, Perla e Thamys**), que me acolheram como parte da família. Especialmente ao grupo TRANS (**Eu, Nath, Ivana, Jéssica, Jaqueline e Odara**), pioneiros no projeto DOHaD, e a todos os colegas de labuta (**Rômulo, Fernanda, Nayra e Camila**), não consigo expressar o quanto sua camaradagem foi vital nessa jornada.

Ao Laboratório de Biofísica e Nanosistemas (LBN/UFMA), em particular à **Prof. Dra. Luciana** e aos alunos **Socorro e Álefe**, agradeço a infraestrutura essencial e apoio nas análises ultraestruturais e nano.

Ao Laboratório Multiusuário de Pesquisa (LAMP/UEMA), à **Prof. Dra. Ana** e aos alunos **Rafael, Helen e Leonardo**, minha gratidão pelas valiosas análises no criostato que contribuíram para o sucesso deste trabalho.

A todos os meus professores ao longo da minha jornada, que deixaram uma marca indelével em minha formação.

Aos técnicos e funcionários da UFMA, pelo suporte fundamental.

Às agências de fomento à pesquisa científica, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para o desenvolvimento deste trabalho, meu sincero agradecimento.

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia persistente, resultante da deficiência na secreção de insulina e/ou resistência à sua ação. A prevalência global do DM está aumentando rapidamente, com projeções alarmantes para o futuro. O DM está associado a várias complicações graves, como cegueira, insuficiência renal, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e amputação de membros inferiores. Apesar de compartilharem a hiperglicemia como sintoma comum, o DM1 e o DM2 diferem em vários aspectos, incluindo prevalência, origem, fatores genéticos, grupos afetados, faixas etárias, diagnóstico, evolução e tratamento. Essas diferenças estão relacionadas principalmente aos padrões opostos de secreção de insulina nessas doenças. A AFM é uma ferramenta valiosa para analisar tecidos afetados pelo DM2, permitindo a avaliação das propriedades mecânicas, elétricas e viscoelásticas das células, bem como a geração de mapas topográficos de alta resolução das estruturas celulares. No entanto, há poucos estudos comparando as alterações morfológicas em tecidos afetados pelo DM1 e DM2 com o uso da AFM, especialmente em animais expostos a dietas desbalanceadas. O estudo teve como objetivo investigar defeitos metabólicos latentes e alterações ultraestruturais hepáticas nos diferentes tipos de DM, comparando DM1 e DM2. O estudo foi realizado em ratos *Wistar* divididos em grupos de acordo com a dieta materna e o tipo de DM desenvolvido. Os animais foram submetidos a uma série de avaliações, incluindo testes de tolerância à glicose, análise da expressão gênica, avaliação histológica do fígado e análise por AFM. Os resultados mostraram diferenças marcantes entre o DM1 e o DM2 em relação à composição corporal, perfil glicêmico, perfil lipídico, resistência à insulina, expressão gênica hepática e morfologia hepática. O DM1 foi caracterizado por atrofia muscular e adiposa, hipoinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina, enquanto o DM2 apresentou obesidade central, sarcopenia obesogênica, hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina. As análises histológicas revelaram diferenças na esteatose hepática e fibrose entre os grupos, com o DM2 apresentando maior comprometimento hepático. Além disso, a AFM mostrou alterações nas propriedades mecânicas e ultraestruturais das células hepáticas nos grupos diabéticos, sendo mais significativas no DM2. Os resultados destacam as diferenças metabólicas, morfológicas e funcionais entre o DM1 e o DM2, atribuídas às características opostas do perfil insulinêmico dessas doenças. O DM1 é caracterizado pela falta de insulina devido à destruição das células β -pancreáticas, enquanto o DM2 está associado à resistência à insulina e à produção excessiva de insulina. A dieta desempenha um papel fundamental na indução dessas diferentes apresentações de DM. Este estudo contribui para uma melhor compreensão das diferenças entre o DM1 e o DM2, fornecendo insights sobre os mecanismos subjacentes e destacando a importância da dieta na indução dessas doenças. As descobertas podem ter implicações na detecção precoce e no desenvolvimento de abordagens terapêuticas específicas para cada tipo de DM.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*, Esteatose hepática, Fibrose hepática; AFM (Microscopia de Força Atômica)

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease characterized by persistent hyperglycemia, resulting from a deficiency in insulin secretion and/or resistance to its action. The global prevalence of DM is rapidly increasing, with alarming projections for the future. DM is associated with several serious complications such as blindness, kidney failure, myocardial infarction, stroke, and lower limb amputation. Despite sharing hyperglycemia as a common symptom, DM1 and DM2 differ in various aspects, including prevalence, origin, genetic factors, affected groups, age groups, diagnosis, progression, and treatment. These differences are primarily related to the opposite patterns of insulin secretion in these diseases. AFM (Atomic Force Microscopy) is a valuable tool for analyzing tissues affected by DM2, allowing for the assessment of mechanical, electrical, and viscoelastic properties of cells, as well as the generation of high-resolution topographical maps of cellular structures. However, there are few studies comparing morphological changes in tissues affected by DM1 and DM2 using AFM, especially in animals exposed to unbalanced diets. The study aimed to investigate latent metabolic defects and hepatic ultrastructural changes in different types of DM, comparing DM1 and DM2. The study was conducted on Wistar rats divided into groups according to maternal diet and the type of DM developed. The animals underwent a series of assessments, including glucose tolerance tests, gene expression analysis, histological evaluation of the liver, and AFM analysis. The results showed significant differences between DM1 and DM2 regarding body composition, glycemic profile, lipid profile, insulin resistance, hepatic gene expression, and hepatic morphology. DM1 was characterized by muscular and adipose atrophy, hypoinsulinemia, hyperglycemia, and insulin resistance, while DM2 exhibited central obesity, obesogenic sarcopenia, hyperinsulinemia, hyperglycemia, and insulin resistance. Histological analyses revealed differences in hepatic steatosis and fibrosis between the groups, with DM2 showing greater hepatic impairment. Furthermore, AFM demonstrated alterations in the mechanical and ultrastructural properties of hepatic cells in diabetic groups, with DM2 exhibiting more significant changes. The results highlight the metabolic, morphological, and functional differences between DM1 and DM2, attributed to the opposing patterns of insulinemia in these diseases. DM1 is characterized by insulin deficiency due to the destruction of β -pancreatic cells, while DM2 is associated with insulin resistance and excessive insulin production. Diet plays a fundamental role in inducing these different presentations of DM. This study contributes to a better understanding of the differences between DM1 and DM2, providing insights into the underlying mechanisms and emphasizing the importance of diet in the induction of these diseases. The findings may have implications for early detection and the development of specific therapeutic approaches for each type of DM.

Keywords: Diabetes mellitus, Hepatic steatosis, Hepatic fibrosis; AFM (Atomic Force Microscopy)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM	microscopia de força atômica
AGL	ácidos graxos livres
CTR	controle
DCV	doenças cardiovasculares
DHGNA	doença hepática gordurosa não alcoólica
DM	diabetes <i>mellitus</i>
DM1	diabetes mellitus tipo 1
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DRS	dieta rica em sacarose
HDL-C	lipoproteína-colesterol de alta intensidade
H&E	hematoxilina-eosina
HPG	hipotálamo-hipófise-gônada
IGF1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-6	interleucina 6
IMC	índice de massa corporal
LDL	lipoproteína-colesterol de baixa intensidade
LH	hormônio luteinizante
PCR	proteína C reativa
RI	resistência à insulínica
SM	síndrome metabólica
TG	triglicerídeos
TNF α	fator de necrose tumoral α
TTG	teste de tolerância à glicose
TTI	teste de tolerância à insulina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Número de pessoas com diabetes com idade entre 20 e 79 anos globalmente e por região.....17
- Figura 2. O espectro da doença da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).....23
- Figura 3. Amostra de tecido hepático humano corada com H&E.....24
- Figura 4. Amostra de tecido hepático humano corada com H&E e Picrosírius Red.....24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Diabetes <i>Mellitus</i> : História e relevância epidemiológica.....	15
2.2	Patologia e complicações relacionadas	18
2.3	Repercussões hepáticas do diabetes <i>mellitus</i>	21
2.4	Modelos animais para estudo do DM e DHGNA	26
2.5	Microscopia de Força Atômica como ferramenta de estudo do diabetes <i>mellitus</i>	30
3	OBJETIVOS.....	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Capítulo I.....	33
4.2	Capítulo II.....	59
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	APÊNDICE	98
	ANEXO.....	100

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o número de pacientes diagnosticados com diabetes mellitus (DM), abrangendo as faixas etárias de 20 a 79 anos, atingiu a marca alarmante de 463 milhões em todo o mundo. Notavelmente, a prevalência dessa doença está crescendo de maneira ainda mais expressiva em nações de baixa e média renda (SAEEDI; PETERSOHN; SALPEA; MALANDA *et al.*, 2019; STEINMETZ; BOURNE; BRIANT; FLAXMAN *et al.*, 2021). Em 2021, o Brasil ocupava a sexta posição, com 15,7 milhões de casos registrados, entre os dez países com o maior número de indivíduos afetados pela diabetes. Além disso, destacava-se como a terceira nação que mais investia em tratamentos para a condição, destinando uma cifra notável de 42,9 bilhões de dólares para esse fim (42,9 bilhões de dólares) (WANG; LI; CHIVESE; WERFALLI *et al.*, 2022).

A hiperglicemia é a principal consequência do desenvolvimento de diabetes e a principal causa de morbidade e mortalidade diabética, como mencionado anteriormente. Essa doença complexa é categorizada em dois tipos predominantes: diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2). O DM1 é caracterizado pela secreção insuficiente de insulina e pela liberação excessiva de glucagon, desencadeando lipólise hepática e cetogênese, ao passo que inibe o anabolismo hepático (HABEGGER; HEPPNER; GEARY; BARTNESS *et al.*, 2010). Por outro lado, o DM2 representa a forma mais comum de diabetes, caracterizando-se por níveis inadequados de insulina, aumento da acumulação de gordura no fígado, depuração de insulina comprometida e resistência hepática à ação da insulina (BHATT; SMITH, 2015). Essas nuances entre os tipos de diabetes destacam a necessidade premente de uma compreensão mais aprofundada e intervenções específicas para mitigar o impacto crescente dessa epidemia global, especialmente em países como o Brasil, que enfrentam desafios únicos nesse cenário.

Além disso, o DM está intrinsecamente associado a uma série de anormalidades hepáticas, notavelmente a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) prevalece (CHEN; YEH, 2021). No DM2, a DHGNA é apenas um exemplo de acúmulo ectópico de triglicérides e coexiste com a resistência lipotóxica à insulina, que se associa à disfunção do tecido adiposo,

definida por inflamação local, lipólise excessiva e secreção alterada de adipocitocinas (RODEN; SHULMAN, 2019; TILG; MOSCHEN; RODEN, 2017). No DM1, a DHGNA é menos comum e a resistência hepática à insulina tem sido geralmente explicada pela toxicidade da glicose em longo prazo (YKI-JÄRVINEN; KOIVISTO, 1986), mas também outros mecanismos (KAUL; APOSTOLOPOULOU; RODEN, 2015).

Além de todas as alterações metabólicas e moleculares, a resistência à insulina e diabetes também estão relacionadas a alterações ultraestruturais e biofísicas dos diversos tecidos. Nesse contexto, a microscopia de força atômica (AFM) assume uma particular relevância para análise de tecidos afetados pelo DM2, pois é uma ferramenta capaz de analisar, sem danificar o material, propriedades mecânicas, elétricas e viscoelásticas das células, além de gerar mapas topográficos em resolução atômica de estruturas presentes na superfície das células.

Há poucos estudos comparando alterações morfológicas em tecidos chave afetados pelo DM1 e DM2 com a AFM, especialmente em animais previamente afetados por uma alimentação desbalanceada. Desse modo, hipotetizamos que existe diferenças morfológicas e ultraestruturais no fígado de ratos com DM1 quando comparados com animais DM2.

Isso poderia ajudar a comunidade acadêmica a saber se essas alterações variam de acordo com o estágio do DM1 e DM2, se as alterações morfológicas podem ser no futuro um biomarcador para detecção precoce da doença, e se elas podem estar associadas a parâmetros bioquímicos, morfométricos e dieta.

Neste trabalho, dividimos nossa investigação em dois capítulos distintos. O primeiro capítulo aborda o estudo original, no qual realizamos uma análise comparativa dos efeitos morfofuncionais e ultraestruturais do diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 no fígado de ratos. Utilizamos a Microscopia de Força Atômica (AFM) para examinar tecidos afetados pelo DM2, permitindo-nos avaliar propriedades mecânicas, elétricas e viscoelásticas celulares, bem como criar mapas topográficos de alta resolução. Investigamos diferenças entre o DM1 e o DM2, empregando ratos Wistar, levando em consideração fatores como dieta materna e o tipo de DM desenvolvido.

Por outro lado, o segundo capítulo está centrado em um artigo de revisão que destaca o uso da AFM como uma técnica de pesquisa adequada para estudar danos celulares em tauopatias, mesmo em estágios iniciais. Esse enfoque tem o propósito de elucidar os mecanismos patogênicos dessas doenças.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Diabetes *Mellitus*: História e relevância epidemiológica.

As primeiras referências ao diabetes remontam ao Papiro de Ebers, datado de 1550 a.C., onde registros atribuídos a Hesy-Ra descrevem uma condição caracterizada por um "grande esvaziamento de urina" (CARPENTER; RIGAUD; BARILE; PRIEST *et al.*, 2006). Séculos mais tarde, por volta de 330 a.C., Charaka, um praticante da medicina tradicional indiana conhecida como *Ayurveda*, observou pacientes com poliúria, notando atração de moscas e formigas pela urina desses indivíduos, e nomeou essa condição "*Madhumeha*," que significa "urina de mel" (FRANK, 1957; MACFARLANE, 1990). A palavra "diabetes" foi introduzida por Areteu da Capadócia (130-200 D.C.), derivando da palavra grega "*diabaínein*" (διαβαίνειν), referindo-se à quantidade excessiva de urina excretada pelos pacientes (LAIOS; KARAMANOU; SARIDAKI; ANDROUTSOS, 2012).

Em seu texto, Areteu descreveu: "O diabetes é uma aflição notável, não muito frequente entre os homens, caracterizada pelo derretimento da carne e dos membros na urina. Os pacientes não cessam de urinar, e o fluxo é incessante, como se fossem aquedutos abertos. A vida é breve, desagradável e dolorosa, marcada por sede insaciável e consumo excessivo de líquidos, o que, no entanto, não corresponde à grande quantidade de urina produzida. Não conseguem ser impedidos de beber ou urinar, e se por um momento abstêm-se de líquidos, suas bocas se tornam secas, seus corpos áridos, e suas vísceras parecem queimadas. Experimentam náuseas, inquietação e sede ardente, e em breve perecem" (Tradução própria).

Posteriormente, Avicena (980-1073 D.C.) notou o sabor adocicado da urina em pacientes com essa condição, classificando-os em dois grupos: jovens magros e idosos obesos (PORETSKY, 2010). No entanto, apenas no século XVII, o médico Thomas Willis acrescentou o termo "*mellitus*" (doce ou mel em latim) ao nome da doença, que passou a ser conhecida como "diabetes *mellitus*" (DM), devido ao sabor doce da urina em pacientes (WILLIS, 1674). Matthew Dobson (1735-1784) estabeleceu uma conexão entre essa doçura e o excesso de açúcar no sangue (AHMED, 2002).

Até então, não havia correlação entre o DM e o pâncreas e suas funções. Foi apenas em 1869, quando Paul Langerhans observou

"aglomerados de células claras ricamente inervadas presentes em toda a glândula pancreática, com uma coloração distinta do tecido ao redor" (LANGERHANS, 1869); que Etienne Lancereaux estudou a histologia do pâncreas de pacientes com e sem glucosúria, cunhando o termo "*diabète pancréatique*" (diabetes pancreático) (LANCEREAUX, 1877). O próximo avanço no entendimento do DM ocorreu em 1890, quando Oskar Minkowski e Josef von Mering observaram que cães submetidos à pancreatectomia morriam com sintomas de diabetes, levando-os a concluir que uma substância secretada pelo pâncreas estava envolvida na etiologia (VON MERING, 1889).

Em 1893, Gustave-Édouard Laguesse relatou alterações morfológicas nas ilhotas pancreáticas de pacientes falecidos de diabetes. Ele nomeou essas estruturas como "ilhotas de Langerhans," sugerindo que elas produziam uma substância reguladora do açúcar (LAGUESSE, 1985). Em 1913, John MacLeod resumiu o conhecimento acumulado sobre a fisiopatologia do diabetes até então, e, juntamente com Frederick Banting, conduziu estudos que levaram à descoberta da insulina em 1921. Banting, laureado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1923, compartilhou seu prêmio com Charles H. Best, que o auxiliou nos experimentos, enquanto MacLeod dividiu sua parte com James B. Collip, responsável pela purificação do extrato pancreático para a obtenção da insulina. Essa história foi minuciosamente descrita em duas excelentes revisões (DE LEIVA-HIDALGO; DE LEIVA-PÉREZ, 2023; RYDÉN; LINDSTEN, 2021).

Atualmente o DM é caracterizado como uma doença crônica não transmissível (DCNT), marcada pelo aumento da concentração plasmática de glicose devido a defeitos na secreção e/ou ação da insulina produzida e secretada pelo pâncreas (ASSOCIATION, 2021).

É considerado um sério problema de saúde pública, com uma crescente prevalência em diversos países, independentemente do nível socioeconômico. De acordo com a *International Diabetes Federation* (IDF), em 2021, cerca de 9,8% da população mundial entre 20 e 79 anos, ou aproximadamente 537 milhões de pessoas, viviam com DM. Se as tendências atuais persistirem, estima-se que o número de casos de diabetes ultrapasse 780 milhões até 2045. A IDF relata que aproximadamente 81% dos adultos com diabetes vivem em países de baixa e média renda, considerados

subdesenvolvidos. Além disso, o DM causou 6,7 milhões de mortes em 2021, com despesas de saúde totalizando pelo menos 966 bilhões de dólares. Estima-se ainda que 541 milhões de pessoas tenham intolerância à glicose, colocando-as em alto risco de desenvolver DM (OGURTSOVA; GUARIGUATA; BARENGO; RUIZ *et al.*, 2022).

Segundo o mesmo relatório da IDF, na América Latina, atualmente existem cerca de 32 milhões de casos de diabetes, representando 8,2% da população da região, a quinta maior incidência no mundo. Prevê-se um aumento de 50% nos casos diagnosticados de DM na região até 2045 (FIGURA 01)

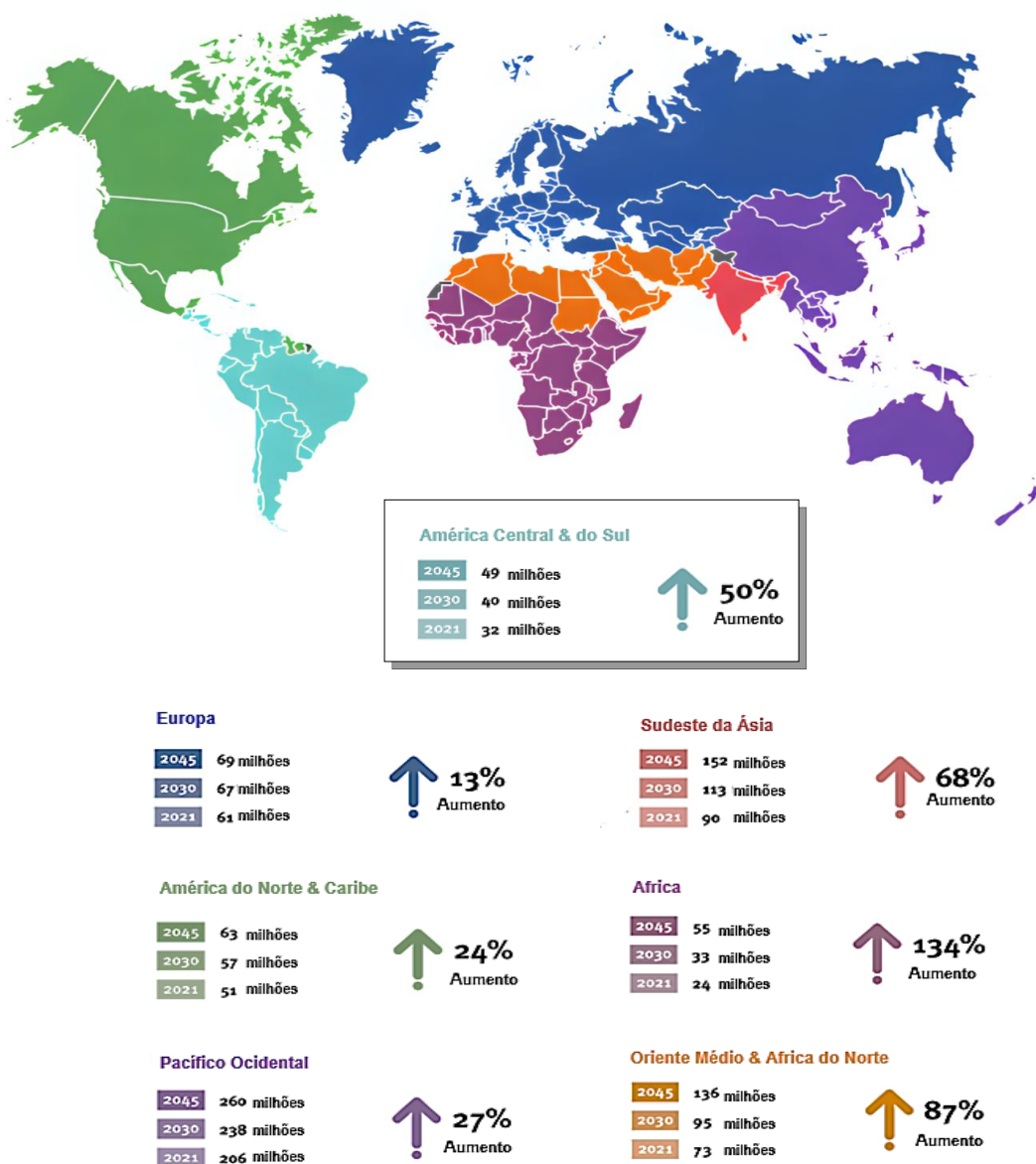


Figura 1. Número de pessoas com diabetes com idade entre 20 e 79 anos globalmente e por região. Fonte: Adaptado de IDF (2021).

A ocorrência do diabetes tem demonstrado uma tendência crescente no Brasil, bem como em outras nações com níveis de renda média e baixa. Conforme indicado pelos dados do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), o percentual de diagnóstico médico autorreferido de diabetes aumentou de 5,7% em 2006 para 9,1% em 2021 entre a população adulta brasileira (BRACCO; GREGG; ROLKA; SCHMIDT *et al.*, 2021).

De acordo com o relatório da IDF (2021), o Brasil registrou 15,7 milhões de casos de diabetes em 2021, posicionando o país entre as nações com uma das maiores taxas de incidência dessa doença no mundo, ficando atrás somente dos Estados Unidos, China, Índia e Paquistão. As projeções apontam que até 2045, o número de casos pode superar a marca dos 23 milhões (SUN; SAEEDI; KARURANGA; PINKEPANK *et al.*, 2022).

No Brasil, as taxas mais elevadas de DM são notadas nas Regiões Norte e Nordeste, enquanto a Região Centro-Oeste apresenta as taxas mais baixas. É importante ressaltar o crescimento constante da mortalidade por diabetes na Região Norte ao longo dos anos da série de dados (Tabela 01). Observando os dados por UF, a taxa de mortalidade é consideravelmente maior no Maranhão, alcançando 40,8 óbitos por 100.000 habitantes em 2021, valor 1,5 vezes maior que a taxa nacional no mesmo ano. Esses resultados podem estar relacionados à qualidade do tratamento médico e à rápida transição nutricional que está ocorrendo nessas regiões, além das disparidades socioeconômicas em comparação com as demais regiões do país (GARCES; SOUSA; CESTARI; FLORÊNCIO *et al.*, 2022).

2.2 Patologia e complicações relacionadas

O DM é assintomático em grande parte dos casos, o que faz com que a suspeita clínica ocorra a partir dos seus fatores de risco. A predisposição genética, o ambiente e o estilo de vida (sedentarismo, tabagismo, alcoolismo) estão entre as causas de dislipidemia, problemas na secreção de insulina, diminuição da sensibilidade à insulina e hiperinsulinemia, que constituem os principais fatores de risco para o DM (GLOVACI; FAN; WONG, 2019; PETERSMANN; MÜLLER-WIELAND; MÜLLER; LANDGRAF *et al.*, 2019). O

DM é dividido em tipo 1 (DM1), incluindo diabetes autoimune latente do adulto, e tipo 2 (DM2), que decorre da perda da sensibilidade periférica à ação da insulina. No entanto, já foram descritos outros subtipos específicos causados por fatores como: (1) defeitos genéticos na função das células β -pancreáticas; (2) defeitos genéticos da ação da insulina; (3) doenças do pâncreas exócrino; (4) endocrinopatias; (5) por indução de drogas e produtos químicos; (6) infecções e (7) formas incomuns do diabetes imuno-mediado (GENUTH; PALMER; NATHAN, 2021; PETERSMANN; MÜLLER-WIELAND; MÜLLER; LANDGRAF *et al.*, 2019). Mais recentemente, anormalidades ligadas à resistência progressiva à ação da insulina no tecido cerebral, com consequente comprometimento dos processos centrais de sinalização de insulina, acúmulo de neurotoxinas, estresse neuronal e neurodegeneração, tem sido associadas ao chamado de diabetes tipo 3 (DM3) (Figura 2) (NGUYEN; TA; NGUYEN; NGUYEN *et al.*, 2020).

Tabela 1. Taxa de mortalidade por diabetes mellitus padronizada por idade, estratificada por unidade da Federação, 2010 a 2021.

UF/Região	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Região Norte	29,3	33,4	32,2	31,2	33,7	33,2	33,9	36,7	36,2	33,6	35,5	33,1
Região Nordeste	36,3	39,8	37,9	37,3	37,0	38,1	37,6	37,0	34,0	34,1	37,4	34,0
Alagoas	47,2	51,3	48,2	49,3	48,0	50,9	54,1	52,5	46,3	46,9	51,3	41,8
Bahia	29,3	31,0	30,7	31,7	31,4	32,5	30,1	32,5	30,0	28,9	35,0	31,6
Ceará	24,5	29,2	25,0	24,2	23,2	22,5	21,2	22,2	19,0	19,5	23,0	20,4
Maranhão	34,4	39,4	36,6	34,9	37,8	39,0	37,3	37,1	39,1	39,6	45,3	40,8
Paraíba	39,6	43,8	39,0	39,7	38,9	36,2	38,5	36,0	35,6	34,5	38,2	36,8
Pernambuco	40,6	42,1	39,3	37,6	35,5	37,6	39,9	38,1	33,5	34,2	42,5	40,4
Piauí	33,0	35,2	37,1	36,0	35,5	38,9	36,6	34,8	32,4	36,0	35,1	31,2
Rio Grande do Norte	36,3	41,2	40,3	40,1	40,9	41,1	40,1	36,2	36,2	33,0	32,0	29,8
Sergipe	41,7	45,4	45,3	42,5	41,3	44,3	40,2	43,4	33,7	34,3	33,9	33,1
Região Centro-Oeste	26,9	26,7	26,1	24,2	25,5	25,1	24,9	25,9	25,2	23,7	23,7	21,9
Região Sudeste	34,7	34,9	32,8	31,8	30,3	29,4	29,0	29,3	29,0	29,3	32,2	33,4
Região Sul	27,3	26,2	25,6	26,9	24,0	23,8	24,6	24,0	25,6	24,8	25,0	26,0
Total Brasil	28,1	28,8	27,3	27,0	26,1	26,0	25,9	25,9	25,6	25,4	27,9	26,8

Fonte: Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM/SVS/MS).

O DM1 é uma doença metabólica autoimune caracterizada pela produção de anticorpos que promovem a destruição de células beta, com consequente perda da função celular beta e diminuição, ou mesmo a falta, da secreção de insulina, resultando em hiperglicemia que gradualmente progride para diabetes (PETERSMANN; MÜLLER-WIELAND; MÜLLER; LANDGRAF *et*

al., 2019; REGNELL; LERNMARK, 2017). Esta doença ocorre principalmente em crianças e adolescentes, mas a idade não é um fator limitante. Pode ser dividida em dois tipos de acordo com diferentes idades: o clássico DM1, e o diabetes autoimune tipo latente em adultos (LADA) (SCHLEICHER; GERDES; PETERSMANN; MÜLLER-WIELAND *et al.*, 2022).

Por sua vez, o DM2 é o mais prevalente, correspondendo a algo em torno de 90% a 95% dos casos (VERHULST; LOOS; GERDES; TEEUW, 2019). O DM2 é caracterizado pela falência progressiva da secreção de insulina, frequentemente decorrente da sobrecarga imposta pela resistência periférica à insulina (PETERSMANN; MÜLLER-WIELAND; MÜLLER; LANDGRAF *et al.*, 2019). O DM2 é altamente heterogêneo em termos de características clínicas, progressão da doença, respostas ao tratamento e risco de complicações (AHLQVIST; PRASAD; GROOP, 2022). Alguns distúrbios coexistem, incluindo obesidade, hipertensão e dislipidemia, que contribuem para a gravidade da doença (PETERSMANN; MÜLLER-WIELAND; MÜLLER; LANDGRAF *et al.*, 2019; SCHLEICHER; GERDES; PETERSMANN; MÜLLER-WIELAND *et al.*, 2022).

O DM gestacional pode ser definido como diminuição da tolerância a glicose, de variadas intensidades diagnosticada no período gestacional, podendo ou não permanecer após o parto (DIRAR; DOUPIS, 2017). Esse tipo está mais relacionado com o DM2, e tem como principais fatores de risco a alimentação desbalanceada durante a gestação, obesidade, crescimento fetal excessivo, baixa estatura, hipertensão e antecedentes de morte fetal ou neonatal (DIAS; PHEIFFER; ABRAHAMS; RHEEDER *et al.*, 2018). O diagnóstico pode ser feito a partir de duas medições de glicose em jejum, uma na consulta pré-natal e outra na vigésima semana de gravidez, sendo confirmado entre a 24^o e 28^o semanas de gestação (SCHLEICHER; GERDES; PETERSMANN; MÜLLER-WIELAND *et al.*, 2022; SWEETING; WONG; MURPHY; ROSS, 2022).

Independentemente do tipo de DM, as complicações provenientes desta são comuns em todos os tipos da doença, e pode ser dividida em agudas e crônicas. Os efeitos agudos são definidos como complicações orais do DM (caries, câncer de boca, boca seca, lesões na mucosa), e ainda não estão bem elucidadas na literatura científica (VERHULST; LOOS; GERDES; TEEUW,

2019). Em contrapartida as complicações crônicas, estão relacionadas a circulação vascular, agrupadas em doenças microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia), e macrovasculares (cardiovasculares) (FOWLER, 2008).

Embora atualmente exista terapêutica para o tratamento da hiperglicemia e cetoacidose, a longo prazo, condições crônicas, como nefropatia diabética, neuropatia e cicatrização tardia de feridas não são bem controladas (ZOUNGAS; ARIMA; GERSTEIN; HOLMAN *et al.*, 2017). Entre as complicações do DM, as mais devastadoras são as que afetam os vasos sanguíneos. As complicações vasculares ocorrem em pacientes que sofrem de DM1 ou DM2 afetando o sistema arterial, acelerando o desenvolvimento da aterosclerose (ARONSON; EDELMAN, 2014; LEON; MADDOX, 2015; SHAH; LANGENBERG; RAPSOMANIKI; DENAXAS *et al.*, 2015). As mais importantes, em termos de morbidade, são as complicações diabéticas microvasculares, notadamente nefropatia diabética e retinopatia diabética (ZOUNGAS; ARIMA; GERSTEIN; HOLMAN *et al.*, 2017).

A hiperglicemia crônica e a doença microvascular contribuem para a disfunção cognitiva tanto no DM1 quanto no DM2, e ambos os transtornos estão associados à desaceleração mental e motora e decréscimos de magnitude semelhante em medidas de atenção e funcionamento executivo (MORAN; THAN; CALLISAYA; BEARE *et al.*, 2022). Além disso, ambos os tipos são caracterizados por desaceleração neural, aumento da atrofia cortical e anormalidades microestruturais em tratos da região branca (BIESSELS; DESPA, 2018). Atualmente, a comunidade científica discute se a doença de Alzheimer pode representar uma forma específica de DM cerebral (DM3) (DE LA MONTE; TONG; WANDS, 2018; DE LA MONTE; WANDS, 2008; KANDIMALLA; THIRUMALA; REDDY, 2017).

2.3 Repercussões hepáticas do diabetes *mellitus*

Além das complicações citadas anteriormente, o DM tem uma forte associação com a manifestação hepática da síndrome metabólica, descrita como doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) abrange uma série de disfunções hepáticas relacionadas ao acúmulo excessivo de lipídeos

no interior dos hepatócitos de indivíduos sem histórico de ingestão de álcool relevante e infecções virais (BRUNT; TINIAKOS, 2010). Estima-se que acometa cerca de 30% da população adulta em nível global, entretanto esta prevalência pode aumentar para 80-95% em obesos e para 70% em diabéticos (HENRY; PAIK; YOUNOSSI, 2022; YOUNOSSI; KOENIG; ABDELATIF; FAZEL *et al.*, 2016).

A DHGNA é caracterizada por um amplo espectro clínico-histológico que varia de uma esteatose simples até uma esteatohepatite não alcoólica (EHNA), que pode progredir para formas mais graves como cirrose, falência hepática e carcinoma hepatocelular (CHEN; YEH, 2021). É uma doença de gênese multifatorial desencadeada por fatores genéticos, ambientais e relacionados ao estilo de vida (*e.g.* dieta e sedentarismo) e morbidades (*e.g.* diabetes) (STEFAN; CUSI, 2022; TILG; MOSCHEN; RODEN, 2017).

Normalmente, a doença inicia-se com o acúmulo intra-hepático de gordura que, quando acomete 5% do volume total do fígado, é denominado esteatose simples (BYRNE; TARGHER, 2015). Esta esteatose pode evoluir para um estado de maior acúmulo lipídico, presença de infiltrado inflamatório, balonização, com ou sem fibrose, denominado EHNA (LI; ZHENG; XIAO; WANG *et al.*, 2023). Por fim, a DHGNA está se tornando uma das principais causas de cirrose e carcinoma hepatocelular e uma crescente indicação de transplante hepático em escala global (LAZARUS; MARK; ANSTEE; ARAB *et al.*, 2022) (FIGURA 02).

A gordura hepática pode se acumular em pequenas ou grandes gotículas que definem a esteatose do tipo micro- ou macrovesicular, respectivamente (FIGURA 03). Os hepatócitos com esteatose microvesicular têm acúmulo anormal de lipídios com arquitetura celular preservada, incluindo um núcleo não deslocado, enquanto hepatócitos com esteatose macrovesicular têm uma gotícula grande que desloca o núcleo para a periferia (LI; ZHENG; XIAO; WANG *et al.*, 2023). Embora seja menos frequente em humanos, a esteatose microvesicular está mais relacionada a evolução e desfechos negativos (GERMANO; MEGA; MATTOSINHO; DIAS *et al.*, 2023).

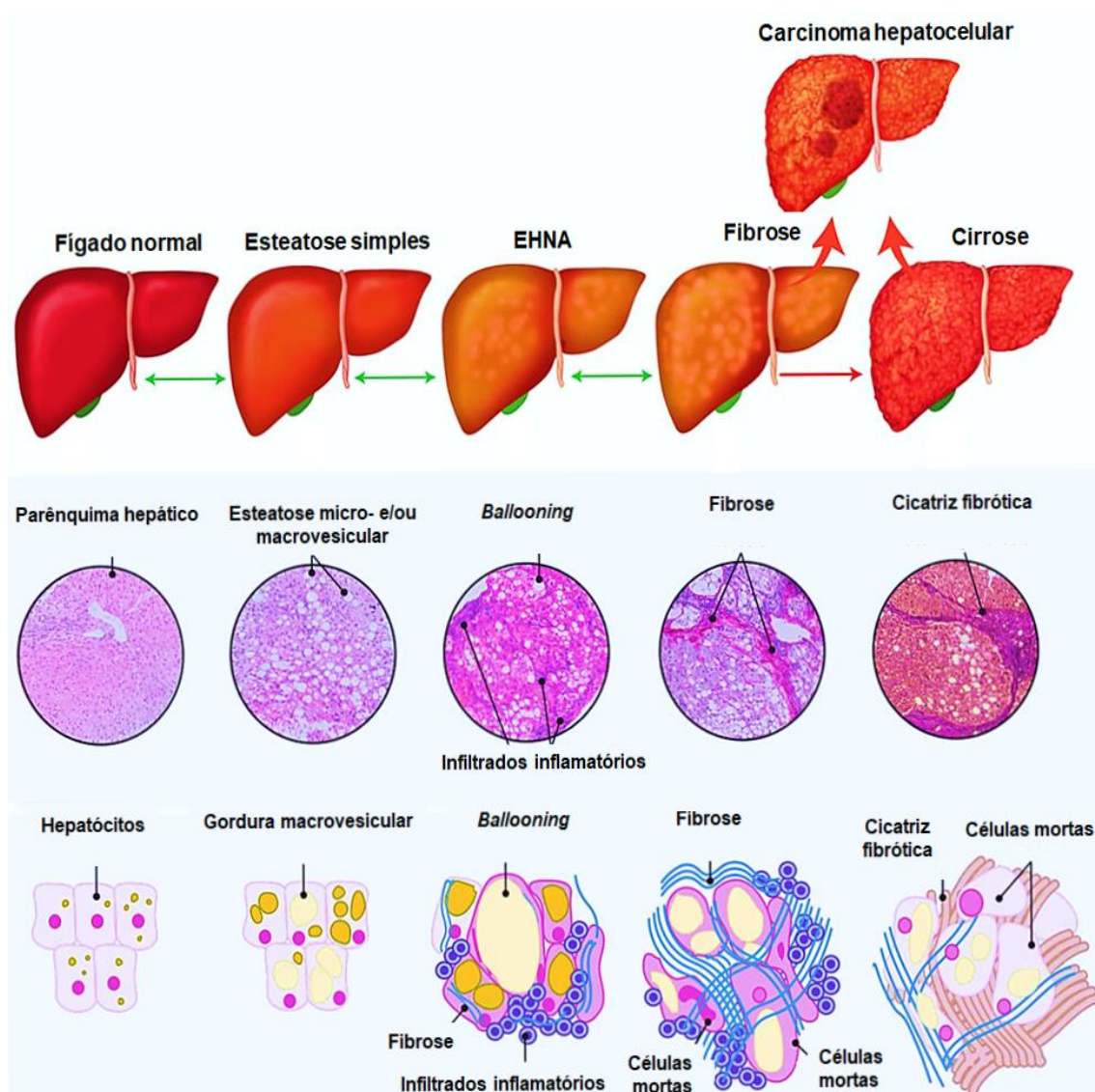


Figura 02. O espectro da doença da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).
 Fonte: (GLUCHOWSKI; BECUWE; WALTHER; FARESE JR, 2017).

O *Ballooning* é um achado posterior, fundamental para o diagnóstico da EHNA, caracterizada por deformação dos hepatócitos de sua forma hexagonal para uma forma arredondada e presença de citoplasma granular decorrente de alterações da permeabilidade celular (FIGURA 03). Células balonizadas possuem maior propriedade quimiotática, e por conta disso, a balonização comumente está associada a maior infiltração de mono- e polimorfonucleares em nível lobular e portal (FIGURA 04 - A) (GILL; ALLENDE; BELT; BEHLING *et al.*, 2023). Em paralelo, pode-se observar também presença de fibrose, caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular composta principalmente por colágeno (FIGURA 04 - B). Esta fibrose não é um achado obrigatório para o

diagnóstico de EHNA, contudo constitui um fator de risco importante para o desenvolvimento de cirrose.

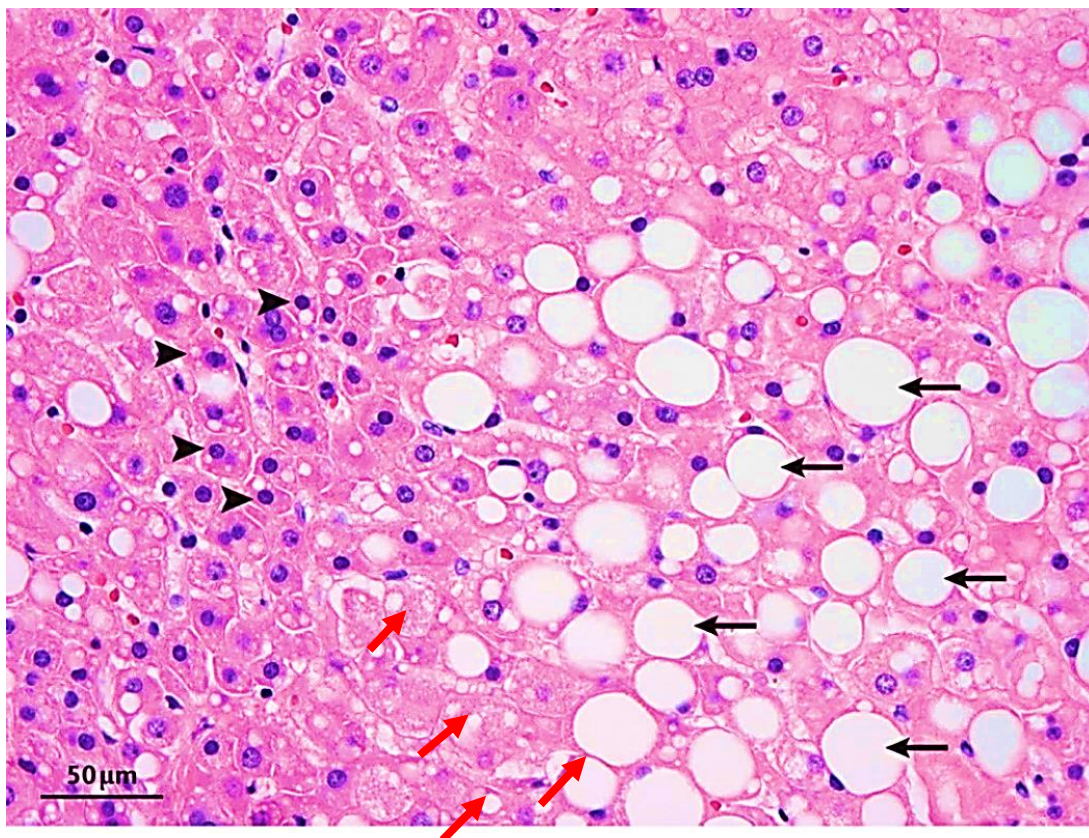


Figura 03. Amostra de tecido hepático humano corada com H&E. Apresentando hepatócitos com esteatose microvesicular (cabeças de setas), macrovesicular (setas pretas) e *Ballooning* (setas vermelhas). Fonte: (GLUCHOWSKI; BECUWE; WALTHER; FARESE JR, 2017).

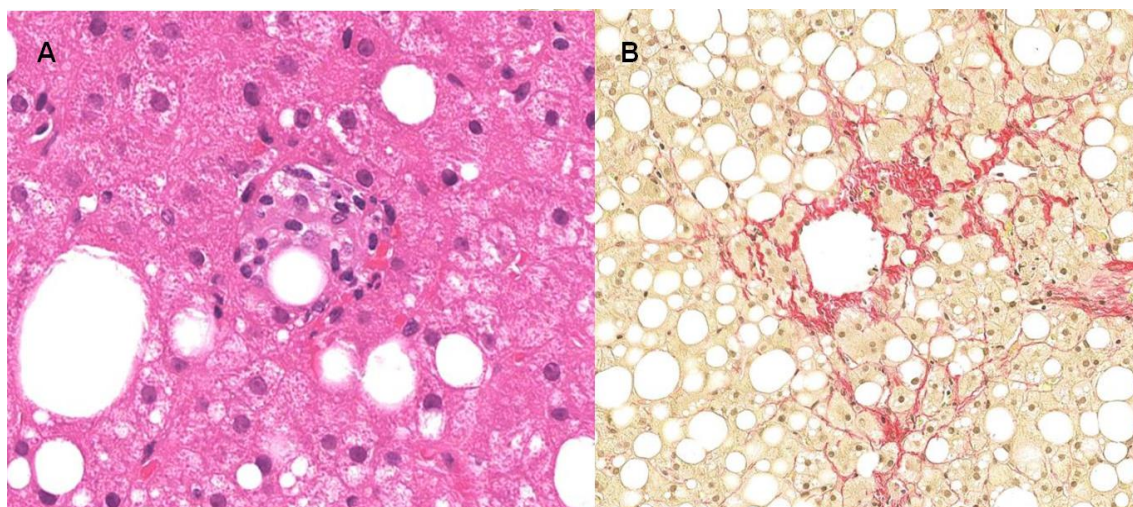


Figura 04. Amostra de tecido hepático humano corada com H&E e Picrosirius Red. Apresentando hepatócitos com infiltrado inflamatório (A) e fibrose (B) Fonte:(GLUCHOWSKI; BECUWE; WALTHER; FARESE JR, 2017).

O DM e a DHGNA são condições patológicas que frequentemente coexistem e sinergicamente atuam para o agravamento do quadro clínico do paciente. Esta relação “simbiótica” entre as doenças se dá por conta da resistência à insulina tanto em nível hepático quanto periférico, elencando-a como um fator de risco primordial para o surgimento/agravamento de ambas as condições (WATT; MIOTTO; DE NARDO; MONTGOMERY, 2019) .

Em condições fisiológicas, o metabolismo hepático de lipídeos e carboidratos é regulado pela síntese *de novo* de lipídeos (DNL), que atua esterificando o excesso de carboidratos da dieta em triglicerídeos (TG) e promovendo a exportação lipídica para a circulação na forma de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). A maquinaria lipogênica é mantida sob regulação de dois fatores transcricionais, a proteína de ligação ao elemento responsivo de esterol (SREBP) e a proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidrato (ChREBP), que são estimuladas pelo aumento dos níveis de insulina e glicose, respectivamente. Em conjunto, estes fatores de transcrição promovem a ativação de diversas enzimas, tais como: ácido graxo sintase (FAS), responsável pela síntese de ácidos graxos; e acetil-CoA carboxilase (ACC), diacilglicerol acetiltransferase (DGAT) e estearoil-CoA desaturase (SCD1), que sequencialmente convertem os AG em TG e VLDL (JEON; KIM; LEE; KIM, 2023).

Outro importante fator de transcrição envolvido no controle do metabolismo glico-lipídico hepático é o receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo alfa (PPAR- α), que regula a beta-oxidação e o transporte dos ácidos graxos, prevenindo o acúmulo hepático de gordura e a hipertrigliceridemia (TAHRI-JOUTEY; ANDREOLETTI; SURAPUREDDI; NASSER *et al.*, 2021).

Entretanto, o surgimento de RI altera drasticamente o metabolismo glico-lipídico normal, promovendo: 1) aumento da atividade da enzima lipase hormônio-sensível sobre o tecido adiposo, aumentando assim os ácidos graxos (AG) na circulação; 2) gliconeogênese e diminuição da síntese hepática de glicogênio; 3) hiperativação dos fatores de transcrição e enzimas lipogênicas, promovendo produção lipídica intra-hepática de forma intensa; e 4) inibição da beta-oxidação e do transporte dos ácidos graxos pelo PPAR- α , favorecendo

ainda mais o acúmulo lipídico (CARIELLO; PICCININ; MOSCHETTA, 2021). Em suma, a RI, a hiperinsulinemia e o excesso de açúcares de adição na alimentação são cruciais para a desregulação da DNL, diminuindo processos oxidativos e favorecendo processos lipogênicos, promovendo diretamente o desenvolvimento da esteatose hepática .

2.4 Modelos animais para estudo do DM e DHGNA

Embora sejam condições clínicas interligadas e demasiadamente estudadas, ainda não existe um modelo experimental animal que induza com sucesso todas as morbidades comuns ao DM e a DHGNA. Porém, existem evidências científicas em modelos animais de DHGNA que se observa marcadamente os papéis da resistência à insulina, inflamação, estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático na progressão da doença. Desta forma, existem vários modelos na replicação dos fenótipos da DHGNA, como resumido em Tabela 2.

Tabela 2. Modelos animais dietéticos de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

Animal	Modelo	Descrição	Fenótipo	Limitações
Camundongo (C57BL/6 ou ob/ob)	Amilina hepática NASH (TREVASKIS; GRIFFIN; WITTMER; NEUSCHWANDER -TETRI <i>et al.</i> , 2012)	Dieta rica em gordura/frutose (40% de gordura, 22% de frutose, 2% de colesterol; 8 semanas)	Obesidade Esteatose EHNA Fibrose	Sem evidência de tumores hepáticos
Camundongo (C57BL/6)	Dieta deficiente em colina + rica em Gordura (RAUBENHEIMER; NYIRENDA; WALKER, 2006)	Dieta deficiente em colina/rica em gordura (45% de gordura; 8 semanas)	Obesidade Esteatose	Ocorre melhora a SI induzida por dieta rica em gordura, sem evidência de EHNA ou estágios mais avançados

Camundongo (C57BL/6)	Dieta deficiente em metionina-colina (CABALLERO; FERNÁNDEZ; MATÍAS; MARTÍNEZ <i>et al.</i> , 2010)	Dieta padrão de ração deficiente em metionina e colina (15 dias)	Perda de peso Esteatose EHNA Fibrose	Alguns fenótipos são o oposto dos humanos com DHGNA
Rato (Sprague–Dawley)	Dieta EHNA (JENSEN; HVID; DAMGAARD; NYGAARD <i>et al.</i> , 2018)	Dieta rica em gordura/frutose/colesterol (40% de gordura, 40% de carboidrato, 2% de colesterol; 16 semanas)	Obesidade Esteatose Fibrose	Sem evidência de tumores hepáticos
Camundongo (C57BL/6N)	Síndrome da obesidade induzida pelo estilo de vida americano (ALIOS) (HARRIS; POOLMAN; ARVANITI; COX <i>et al.</i> , 2020)	Dieta rica em gordura/carboidratos (45% de gordura, 55% de frutose/45% de glicose na água potável; 26–52 semanas)	Obesidade RI Esteatose EHNA Fibrose Tumores hepáticos	Longo tempo de alimentação necessário para evoluir para fibrose e tumores hepáticos
Camundongo (B6/129)	Modelo animal de DHGNA induzido por dieta (DIAMOND) (ASGHARPOUR; CAZANAVE; PACANA; SENESHAW <i>et al.</i> , 2016)	Dieta rica em gordura/carboidratos (42% de gordura, 0,1% de colesterol, alto teor de frutose/glicose na água potável; 8–52 semanas)	Obesidade RI Esteatose EHNA Fibrose Cirrose Tumores hepáticos	Longo tempo de alimentação necessário para progredir para cirrose e tumores hepáticos
Camundongo (C57BL/6)	Dieta fast-food (CHARLTON; KRISHNAN; VIKER; SANDERSON <i>et</i>	Dieta rica em gordura/carboidratos (40% de gordura, 2% de colesterol, alto	Obesidade RI Esteatose EHNA Fibrose	Tumores hepáticos não relatados neste modelo

	<i>al.</i> , 2011)	teor de frutose na água potável; 25 semanas)		
	STAM™ (estreptozotocina + dieta rica em gordura)(FUJII; SHIBAZAKI; WAKAMATSU; HONDA <i>et al.</i> , 2013)	Injeção perinatal de estreptozotocina seguida de dieta rica em gordura (6–20 semanas)	Obesidade RI Esteatose EHNA Fibrose Tumores hepáticos	Apenas camundongo s machos desenvolvera m tumores hepáticos
Camundongo (C57BL/6)				

Evidências experimentais tem sugerido que a exposição à supernutrição materna durante a gestação e/ou lactação leva ao desenvolvimento de DHGNA na prole (BAYOL; SIMBI; FOWKES; STICKLAND, 2010; BRINGHENTI; ORNELLAS; MARTINS; MANDARIM-DE-LACERDA *et al.*, 2015; DRAKE; REYNOLDS, 2010; OBEN; MOURALIDARANE; SAMUELSSON; MATTHEWS *et al.*, 2010). Em vários desses estudos, a prole exposta à supernutrição materna apresentou acúmulo de triglicerídeos e gotículas de lipídios hepáticos, indicativos de esteatose hepática (BRINGHENTI; ORNELLAS; MARTINS; MANDARIM-DE-LACERDA *et al.*, 2015; OBEN; MOURALIDARANE; SAMUELSSON; MATTHEWS *et al.*, 2010), embora o aumento dos níveis de lipídios hepáticos nem sempre persista na idade adulta (HELLGREN; JENSEN; WATERSTRADT; QUISTORFF *et al.*, 2014). Por outro lado, outros estudos não encontraram efeitos da supernutrição materna no fenótipo da prole (KING; DAKIN; LIU; HADDOKE *et al.*, 2013; KING; NORMAN; SECKL; DRAKE, 2014).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a determinar o efeito da dieta rica em sacarose (DRS), em janelas críticas do desenvolvimento. França e colaboradores (2020), investigaram os fatores metabólicos envolvidos no aparecimento e progressão da DHGNA em roedores alimentados com DRS após o desmame. Este estudo abordou um aspecto importante do desenvolvimento do DHGNA examinando o crosstalk entre o fígado e o tecido adiposo branco (TAB). Os autores mostraram o desencadeamento da resistência à insulina no TAB como um fator importante

para a liberação disfuncional de AGL para a circulação portal e consequente regulação de genes lipogênicos e inflamação hepática (FRANÇA; DOS SANTOS; BARROSO; GONDIM *et al.*, 2020).

O momento da intervenção nas mães parece ser importante, com alguns estudos iniciando intervenções dietéticas pré-concepção, levando à obesidade materna, enquanto outros iniciam as dietas apenas durante a gravidez ou em estágios pós-natais (peripuberdade e puberdade). Além disso, o fenótipo materno pode ser crucial. Em ratos, a prole exposta ao diabetes materno apresentou degeneração vacuolar e balonizante no fígado, com fenótipo semelhante ao da esteato-hepatite (EL-SAYYAD; AL-HAGGAR; EL-GHAWET; BAKR, 2014). Outro modelo de rato demonstrou que a exposição à hiperglicemia materna exacerbou os efeitos de uma dieta rica em gordura pós-natal, com a prole apresentando esteatose hepática mais grave (SONG; LI; ZHAO; ZHANG *et al.*, 2012).

Finalmente, a exposição a uma dieta rica em gordura no período pós-natal pode exacerbar os efeitos da exposição à supernutrição materna. Camundongos nascidos de fêmeas mantidas com dieta hiperlipídica durante a gestação, que foram expostas a uma dieta hiperlipídica após o desmame, desenvolveram esteatose hepática mais grave e características de EHNA, incluindo fibrose (BRUCE; CAGAMPANG; ARGENTON; ZHANG *et al.*, 2009; MOURALIDARANE; SOEDA; VISCONTI-PUGMIRE; SAMUELSSON *et al.*, 2013). Outros estudos demonstraram achados comparáveis, com a prole de mães alimentadas com alto teor de gordura apresentando esteatose microvesicular, progredindo para esteatose macrovesicular se os animais também fossem alimentados com uma dieta rica em gordura pós-natal (GREGORIO; SOUZA-MELLO; CARVALHO; MANDARIM-DE-LACERDA *et al.*, 2010; KRUSE; SEKI; VUGUIN; DU *et al.*, 2013).

Os estudos descritos anteriormente, mostraram que a supernutrição materna, principalmente por dietas ricas em gordura, programa um fenótipo para DHGNA, que é criticamente dependente do período neonatal. Por outro lado, pouco se conhece sobre os impactos morfofuncionais do DM1 sobre o fígado. O método mais utilizado para a indução de DM1 é por meio de substâncias químicas citotóxicas, como a estreptozotocina (STZ) e a aloxana (RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016).

O antibiótico STZ, derivado da bactéria gram positiva *Streptomyces achromogene* é uma toxina paras as células β pancreáticas utilizada como indutor de diabetes em roedores, podendo ser administrada por via intravenosa, intraperitoneal ou lingual (BAIG; PANCHAL, 2020; BRITO-CASILLAS; MELIÁN; WÄGNER, 2016; PANDEY; DVORAKOVA, 2020). A ação tóxica de STZ requer a sua absorção celular, apresentando atividade alquilante, com a transferência de grupos metil para as moléculas de DNA, resultando em quebras nas cadeias de DNA. Além disso, há um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e liberação de óxido nítrico (NO) após a metabolização da STZ, contribuindo para a morte das células beta-pancreáticas (BAIG; PANCHAL, 2020). Os animais geralmente apresentam um pico hiperglicêmico 72 h após a indução do DM com STZ. Após esse período, eles permanecem hiperglicêmicos, com níveis de glicose sanguínea entre 350 a 450 mg/dL (RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016).

2.5 Microscopia de Força Atômica como ferramenta de estudo do diabetes mellitus

Embora muitos estudos tenham sido realizados para entender os principais desfechos induzidas pelo diabetes, pouco tem sido feito para compreender as alterações ultra-estruturais e as propriedades biofísicas de tecidos-alvo da ação da insulina, tais como o fígado, sendo esse um passo crucial para a compreensão da patogênese da DHGNA e sua relação com os diferentes tipos de DM.

A morfologia e a mecânica dos tecidos são cruciais para a regulação da função orgânica. Especificamente, a investigação dos tecidos afetados pela STZ em escala micrométrica é um desafio devido às estruturas complexas desses tecidos. Neste sentido, a nanotecnologia tem contribuído para o progresso da medicina moderna, favorecendo a compreensão dos mecanismos moleculares de diversas doenças, sua patogênese, bem como para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico. A microscopia de força atômica (AFM), tanto como imagem quanto como ferramenta para medir propriedades mecânicas e viscoelásticas, oferece uma excelente oportunidade para estudar células em escala nanométrica (REBELO; DE SOUSA; MENDES

FILHO; RADMACHER, 2013). Não obstante, o uso da AFM para o estudo de materiais biológicos fornece a possibilidade de, em resolução atômica, fornecer mapas topográficos (CHANG; CHIANG; YANG; LIOU, 2012). Tais mapas importam, não apenas para esclarecer a patogênese, mas para caracterizar a variedade de anormalidades morfológicas do hepático.

A hiperglicemia crônica leva à glicação de diferentes moléculas e medeia a formação de AGEs que podem fazer ligações cruzadas covalentes e, bioquimicamente, remodelar a estrutura e função de inúmeras proteínas (TWARDA-CLAPA; OLCZAK; BIAŁKOWSKA; KOZIOŁKIEWICZ, 2022). Os precursores modificados por AGE também infligem alterações nas proteínas fibrosas da matriz extracelular (MEC), como colágeno, elastina, fibronectina e laminina, promovendo acúmulo na MEC e alterações na rigidez, afetando assim as funções dos tecidos (MUNCIE; WEAVER, 2018). Assim, fica clara a existência de uma intrincada relação entre hiperglicemia e remodelação da MEC em vários tecidos afetados (HOFFMANN; WONG; SMITH, 2019; MASON; WAHAB, 2003). No entanto, pouco se sabe sobre o impacto do diabetes e, em particular, dos altos níveis circulantes de glicose ou insulina nas propriedades biomecânicas da MEC hepática, uma rede de fibras complexa e dinâmica que envolve as células e modula sua atividade

Dos poucos estudos disponíveis com uso de AFM em modelos de diabetes, a maioria tem focado nas alterações das propriedades biomecânicas do coração diabético, como aumento da rigidez diastólica, rigidez diastólica excessiva do ventrículo esquerdo, importantes contribuintes para insuficiência cardíaca em pacientes com DM2 (BENECH; BENECH; ZAMBRANA; RAUSCHERT *et al.*, 2014; LIEBER; AUBRY; PAIN; DIAZ *et al.*, 2004). Estes reforçam que alterações na estrutura e propriedades biomecânicas da MEC podem estar envolvidas no processo fisiopatológico das complicações diabéticas, especialmente no fígado, um órgão chave no DM.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar alterações metabólicas e hepatocelulares em nível micro- e nanoscópico induzidas por *diabetes mellitus* tipo 1 e tipo 2 em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desenvolvimento de alterações metabólicas induzidas por estados de hipo- e hiperinsulinemia induzidas em ratos;
- Investigar a expressão de genes relacionados a processos β -oxidação, lipogênese *de novo* e inflamação no fígado de ratos com diferentes tipos de diabetes;
- Caracterizar as alterações morfológicas ocorridas no fígado de ratos com *diabetes mellitus* tipo 1 e tipo 2, por meio de avaliação histológica de danos hepáticos, quantificação de gordura intracelular e fibrose;
- Investigar a presença de alterações ultraestruturais por meio microscopia de força atômica e correlacionar as mesmas com as alterações macro- e microscópicas observadas nos fígados de animais com diferentes tipos de diabetes.

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo I

- **Artigo a ser submetido no periódico *Diabetes*;**
- **Qualis CAPES – Medicina I: Classificação A1;**
- **Fator de impacto: 7.72;**
- **Título:** “Análise comparativa dos efeitos morfofuncionais e ultraestruturais dos diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 no fígado de ratos”;
- **Autores:** A definir.

1 **TRABALHO ORIGINAL**

2 Análise comparativa dos efeitos morfofuncionais e ultraestruturais dos diabetes
3 *mellitus* tipo 1 e tipo 2 no fígado de ratos

4

5 **AUTORES**

6 A definir

7

8 **AFILIAÇÕES**

9 A definir

10

11 ***Autor correspondente:** Antonio Marcus de Andrade Paes, Ph.D.

12 Universidade Federal do Maranhão

13 Av. dos Portugueses 1966, Bacanga, 65080-805, São Luís (MA), Brasil.

14 Fone: +55 (98) 3272 8547

15 E-mail: antonio.marcus@ufma.br

RESUMO

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia persistente devido à falta de insulina ou resistência à sua ação. Sua prevalência global está aumentando rapidamente e está associada a complicações graves, como cegueira, insuficiência renal, infarto, AVC e amputações. Apesar de compartilharem a hiperglicemia como sintoma, o DM1 e o DM2 diferem em vários aspectos, incluindo origem, fatores genéticos, grupos afetados e tratamento, principalmente devido a diferentes padrões de secreção de insulina. Este estudo utilizou a Microscopia de Força Atômica (AFM) para analisar tecidos afetados pelo DM2, permitindo avaliar propriedades mecânicas, elétricas e viscoelásticas celulares e criar mapas topográficos de alta resolução. Investigamos diferenças entre o DM1 e o DM2, utilizando ratos Wistar com base na dieta materna e tipo de DM desenvolvido. Realizamos testes de tolerância à glicose, análises de expressão gênica, avaliação hepática histológica e análises por AFM. Nossos resultados destacaram diferenças marcantes entre o DM1 e o DM2 em composição corporal, perfil glicêmico, perfil lipídico, resistência à insulina e morfologia hepática. O DM1 apresentou atrofia muscular e adiposa, hipoinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina, enquanto o DM2 mostrou obesidade central, sarcopenia obesogênica, hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina. As análises histológicas também revelaram diferenças na esteatose hepática e fibrose, sendo o DM2 mais afetado. A AFM evidenciou alterações mecânicas e ultraestruturais mais significativas nas células hepáticas do DM2. Esses resultados ressaltam as diferenças metabólicas, morfológicas e funcionais entre o DM1 e o DM2, atribuídas às características opostas do perfil de insulina. A dieta desempenha um papel crucial na indução dessas diferentes apresentações de DM. Este estudo contribui para uma melhor compreensão dessas diferenças, fornecendo insights sobre mecanismos subjacentes e destacando a importância da dieta. Suas descobertas podem ter implicações na detecção precoce e no desenvolvimento de abordagens terapêuticas específicas para cada tipo de DM.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*, Esteatose hepática, Fibrose hepática; AFM (Microscopia de Força Atômica)

49 INTRODUÇÃO

50 O diabetes *mellitus* (DM) é definido como uma doença metabólica
51 crônica de etiologia múltipla caracterizada pela manutenção persistente de
52 hiperglicemia e alteração do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas,
53 decorrentes da ausência de secreção de insulina e/ou incapacidade da mesma
54 de exercer adequadamente seus efeitos (1). Dados do *International Diabetes*
55 *Federation* coletados em 2021 mostram que, globalmente, 537 milhões de
56 adultos (20 a 79 anos) são diabéticos e estimam que este número deva subir
57 para 780 milhões até 2045. No Brasil, 8,8% de adultos são acometidos pela
58 doença e projeta-se um crescimento para 10,9% até 2045. Estes dados e
59 projeções são alarmantes, especialmente pelo fato de o DM ser um importante
60 causa de cegueira, insuficiência renal, infarto agudo do miocárdio, acidente
61 vascular cerebral e amputação de membros inferiores (2; 3).

62 Classicamente, o DM se apresenta como DM tipo 1 (DM1), uma doença
63 autoimune caracterizada por progressiva destruição de células β -pancreáticas e
64 consequente perda da capacidade de produzir o hormônio insulina; DM tipo 2
65 (DM2), doença mais comum, comumente associada ao sobrepeso e obesidade
66 e marcada por um estado de resistência periférica à ação da insulina; e DM
67 gestacional (DG), que consiste em um grau de intolerância à glicose com início
68 ou diagnóstico durante a gestação (4; 5). Atualmente, outras doenças com
69 gênese e evolução diferentes já são inseridas no espectro do DM, tais como as
70 síndromes de diabetes monogênicas (e.g. diabetes neonatal e diabetes de início
71 de maturidade dos jovens - MODY), doenças do pâncreas exócrino (e.g. fibrose
72 cística) e diabetes induzido por medicamentos ou agentes químicos (6).

73 Apesar de classificados como DM, as semelhanças entre o DM1 e DM2
74 são relativamente limitadas. Embora possuam a hiperglicemia como sintoma
75 comum, as doenças diferem drasticamente em prevalência, origem, fatores
76 genéticos, grupos comumente afetados, faixas etárias, diagnóstico, evolução e
77 tratamento. Até mesmo a hiperglicemia, que é um sintoma comum entre as
78 doenças, apresenta-se em níveis bem diferentes (7). Estas diferenças se dão
79 especialmente por conta do padrão insulinêmico oposto entre elas.

80 A insulina é um hormônio multifuncional que rege a plasticidade do
81 metabolismo humano e exerce um papel chave sobre o trofismo e funcionamento
82 de tecidos sensíveis, como o muscular esquelético, adiposo e hepático (8). No

83 fígado, a insulina é responsável por inibir a produção de glicose e controlar, via
84 fatores de transcrição, a síntese *de novo* e a secreção de lipídeos para a
85 circulação (9). Desta forma, prejuízos na produção/atuação da insulina, tal qual
86 no DM, comprometem drasticamente a plasticidade hepática e aumentam a
87 susceptibilidade para o desenvolvimento de doenças hepáticas, como a doença
88 hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).

89 A DHGNA abrange uma série de disfunções hepáticas relacionadas ao
90 acúmulo excessivo de lipídeos no interior dos hepatócitos de indivíduos sem
91 histórico de ingestão de álcool relevante (10). Normalmente, inicia-se com uma
92 esteatose simples, que pode evoluir para um estado de maior acúmulo lipídico,
93 inflamação e degeneração estrutural denominado esteatohepatite não alcoólica
94 (EHNA), uma das principais causas de cirrose e carcinoma hepatocelular (11;
95 12). O DM e a DHGNA são condições patológicas que frequentemente coexistem
96 no paciente, pois ambas têm a resistência à insulina como principal fator causal
97 e de agravamento (13).

98 Para além de todas as alterações metabólicas e morfológicas,
99 evidências indicam que o DM e a DHGNA também promovem alterações
100 ultraestruturais e biofísicas nos diversos tecidos. Nesse contexto, a microscopia
101 de força atômica (AFM) assume uma particular relevância para a análise de
102 tecidos afetados por estas doenças, pois permite analisar as propriedades
103 mecânicas, elétricas e viscoelásticas das células, além de gerar mapas
104 topográficos em resolução atômica das estruturas presentes na superfície das
105 células.

106 Há poucos estudos comparando alterações morfológicas em tecidos
107 chave afetados pelo DM1 e DM2 com a AFM, especialmente em animais
108 previamente afetados por uma alimentação desbalanceada. Dessa forma,
109 hipotetizamos que existe defeitos metabólicos latentes e alterações
110 ultraestruturais hepáticas nos diferentes tipos de DM.

111

112 **MÉTODOS**

113 **Animais e desenho experimental**

114 Todos os protocolos experimentais realizados neste estudo foram
115 aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal
116 do Maranhão (CEUA/UFMA) sob número 23115.000747/2022-90.

117 Inicialmente, ratas Wistar (n=6; 21 dias de vida) oriundas do Biotério
118 Central da UFMA foram mantidas em ambiente controlado e distribuídas
119 uniformemente pelo peso em dois grupos: ratas que receberam ração padrão
120 para roedores Nuvilab CR-1® (Nuvital®, Nuvilab, Brasil); e ratas que receberam
121 ração rica em sacarose para indução de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) na prole.
122 Detalhes da composição centesimal das dietas e densidades energéticas
123 encontram-se descritas em Sousa et al. (14). Após 6 semanas de
124 acompanhamento, as fêmeas foram individualmente acomodadas para
125 acasalamento monogâmico com machos nutridos exclusivamente com dieta
126 padrão e, após confirmação da prenhez, as fêmeas foram separadas dos
127 machos e mantidas com a prole até o desmame. As ratas de ambos os grupos
128 tiveram livre acesso a água e rações durante todo período experimental.

129 Os machos da prole foram separados e divididos em 3 grupos, sendo:
130 grupo CTR (n=5), composto por filhos de ratas controle que não sofreram
131 nenhuma intervenção por 24 semanas; grupo DM1 (n=5), composto por filhos de
132 mães controle que na 12ª semana de vida receberam uma dose única de
133 estreptozotocina (65 mg/kg; i.p.; tampão citrato; pH 4,5; jejum de 12h) para
134 indução de diabetes *mellitus* tipo 1 (15) e foram acompanhados por mais 12
135 semanas; e por último, grupo DM2 (n=5), composto por filhos de mães que
136 receberam dieta rica em sacarose para indução do DM2, mas que foram
137 alimentados exclusivamente com ração padrão por 24 semanas.

138 Durante todo período de acompanhamento pós-indução (12 semanas),
139 os animais foram semanalmente pesados e, na 11ª semana, os animais foram
140 submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT). Ao final de 12 semanas, os
141 animais foram submetidos a jejum (8 horas), anestesiados, tiveram seus
142 comprimentos naso-anais aferidos para avaliação de obesidade pelo índice de
143 Lee (16) e eutanasiados para coleta de sangue, coxins adiposos retroperitoneal,
144 periepididimal e mesentérico e fígado. O sangue coletado foi coagulado e
145 centrifugado (3500 rpm; 10 min) para separação do soro que foi utilizado para a
146 determinação dos níveis glicêmicos, de triglicerídeos, colesterol total (Labtest®,
147 Brasil) e insulina (Sigma-Aldrich®, Alemanha) segundo as especificações
148 descritas pelo fabricante. A partir destas dosagens, foi determinado o grau de
149 resistência à insulina por meio dos índices TyG e HOMA (17; 18).

150 Os órgãos coletados foram pesados para avaliação morfológica e
151 alíquotas do fígado foram armazenados em solução conservante (RNAlater®,
152 Invitrogen) para expressão gênica ou conservados em Tissue-Tek O.C.T.®
153 (Sakura) para avaliação histológica de danos hepáticos, quantificação de
154 gordura intracelular, fibrose e análise ultraestrutural.

155

156 **Avaliação da tolerância à glicose e resistência à insulina**

157 Para o teste de tolerância à glicose (GTT), os animais foram submetidos
158 a 8 horas de jejum antes da administração de glicose 2g/kg (i.p.). O sangue foi
159 coletado por seção na cauda e analisado em glicosímetro (Accu-chek Active®,
160 Roche) imediatamente antes (tempo 0) e após o *bolus* de glicose nos tempos
161 15, 30, 60 e 120 minutos para aferição da glicemia como descrito no tópico
162 anterior. Os dados foram expressos pela área sob a curva glicêmica (AUC) (19).

163

164 **Expressão gênica por Real time PCR (qPCR)**

165 Os fígados mantidos em RNAlater® (Invitrogen) tiveram seus RNA's
166 extraídos com *Trizol*® (Invitrogen) e convertidos em cDNA's com *SuperScript*
167 *Reverse Transcriptase IV*® (Invitrogen) segundo os métodos descritos pelo
168 fabricante. Os primers foram desenhados utilizando o software Primer3Plus e
169 customizados pela Invitrogen, Brasil (Tabela 01 – dados suplementares). As
170 reações de qPCR foram amplificadas no *7500 Realtime PCR Applied*
171 *Biosystems*® na presença de *Platinum*® *SYBR*® *Green qPCR SuperMix-UDG*
172 (Invitrogen). As amostras foram incubadas em 50 °C por 2 min seguido de 95 °C
173 por 2 min (holding), 40 ciclos de 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por 1 min
174 (anelamento e extensão). Foi determinada a expressão de genes relacionados
175 a processos β -oxidação (PPAR- α), lipogênese *de novo* (PPAR- γ , FAS e DGAT)
176 e inflamação (TNF- α e IL-10). A expressão gênica foi determinada pelo cálculo
177 dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ tendo GAPDH como gene *housekeeping*.

178

179 **Avaliação Histológica do Fígado**

180 Após eutanásia, os fígados coletados foram alíquotados, imediatamente
181 imersos em *Tissue-Tek*® *OCT*, congelados em N₂ líquido e seccionados (1 μ m,
182 5 μ m e 10 μ m espessura) em criostato. Os cortes transversais de 5 μ m e 10 μ m
183 de espessura foram fixados em formaldeído 10% e submetidos a coloração

184 padrão hematoxilina e eosina (H&E), *Oil Red O* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
185 EUA) e *picrosirius red* contracorado com hematoxilina férrica (Sigma-Aldrich, St.
186 Louis, MO, EUA) (20-23) A quantificação de lipídeos intra-hepáticos e fibrose foi
187 realizado via mensuração da intensidade de áreas em vermelho através do
188 software ImageJ 1.53t (EUA). Os cortes sequenciais de 1 µm de espessura foram
189 acondicionadas em lamínulas de 13 mm para posterior análise por AFM.

190

191 **Microscopia de força atômica**

192 A análise ultraestrutural hepática se deu em Microscópio de Força
193 Atômica e Varredura por Tunelamento *Nanoscope Multimode 8*[®], Bruker. Os
194 cortes histológicos foram fixados no disco magnético do equipamento e varridos
195 pelas sondas de AFM com cantileveres de baixa constante de mola (0,02 N/m),
196 compatíveis com a flexibilidade da membrana celular. As medidas foram
197 realizadas nos modos contato, contato intermitente e espectroscopia de força,
198 para obtenção de medidas de altura e mapas topográficos tridimensionais com
199 resolução subnanométrica da superfície das células, evidenciando as
200 características ultraestruturais da membrana (volume, área superficial e
201 rugosidade). Além das medidas de topografia, curvas de força foram produzidas
202 sobre a célula afim de investigar as propriedades viscoelásticas e adesivas,
203 classificando a assinatura dessas propriedades em diferentes porções de uma
204 única célula e em células dos grupos experimentais (24).

205

206 **Análise estatística**

207 Os resultados foram analisados no software GraphPad Prism 8.0
208 (GraphPad Software Inc., USA), expressos como média ± erro padrão e
209 submetidos a testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguida de testes
210 estatísticos paramétricos (One-Way ANOVA – Newman Keuls). As diferenças
211 foram significativas quando $p \leq 0,05$.

212

213 **RESULTADOS**

214 O diabetes *mellitus* abrange um conjunto de doenças metabólicas
215 caracterizadas pela manutenção persistente de um estado hiperglicemia no
216 indivíduo, decorrente de baixa produção/secreção de insulina e/ou incapacidade
217 do hormônio em exercer seus efeitos anabólicos de forma eficiente. Embora a

218 hiperglicemia seja um sintoma de congruência, as semelhanças entre os
219 diversos tipos de DM são poucas e, em nosso estudo, buscamos elucidar
220 algumas diferenças metabólicas, morfológicas e funcionais, especialmente em
221 nível hepático, entre o DM tipo 1 e tipo 2, dois dos principais subtipos de diabetes
222 observáveis na população em geral.

223 A partir dos 15 dias de vida (no desmame), os machos da prole de mães
224 que receberam dieta rica em sacarose para indução de DM2 começaram a
225 apresentar maior massa corpórea em relação aos filhos de mães que receberam
226 dieta padrão (dados suplementares). Este peso mais elevado do grupo DM2 foi
227 mantido por todo período de acompanhamento do estudo quando comparado ao
228 grupo CTR ($p < 0,05$; Figura 1B). Logo após administração da STZ na 12^a
229 semana de idade (tempo zero da figura 1A), os animais do grupo DM1
230 apresentaram severa perda de massa corporal em relação ao grupo controle,
231 que foi mantida por todo período de acompanhamento ($p < 0,0001$; Figura 1B).

232 Em concordância com os dados de massa corpórea, os animais DM1 se
233 mostraram magros ($p < 0,05$; Figura 1C), sarcopênicos ($p < 0,05$; Figura 1D) e
234 com perda drástica de massa adiposa ($p < 0,0001$; Figura 1E) em relação ao
235 grupo CTR. Por outro lado, o grupo DM2 se mostrou obeso ($p < 0,05$; Figura 1C),
236 com sarcopenia obesogênica ($p < 0,05$; Figura 1D) e acúmulo adiposo visceral e
237 não-visceral ($p < 0,0001$; Figura 1E) em relação aos outros grupos.

238 No que concerne ao perfil glicêmico e lipídico, o grupo DM1 apresentou
239 uma severa hiperglicemia ($p < 0,0001$; Figura 2A), intolerância à glicose ($p <$
240 $0,0001$; Figura 2B-C), hipoinsulinemia ($p < 0,05$; Figura 2D), aumento dos níveis
241 de colesterol total ($p < 0,05$; Figura 2E) e triglicerídeos ($p < 0,05$; Figura 2F) e
242 resistência à insulina periférica ($p < 0,01$; Figura 2G) e hepática ($p < 0,0001$;
243 Figura 2H). O grupo DM2 apresentou elevação dos níveis glicêmicos ($p < 0,05$;
244 Figura 2A), leve intolerância à glicose ($p < 0,05$; Figura 2B-C), hiperinsulinemia
245 ($p < 0,05$; Figura 2D), hipercolesterolemia ($p < 0,0001$; Figura 2E),
246 hipertrigliceridemia ($p < 0,01$; Figura 2F) e resistência insulínica periférica ($p <$
247 $0,01$; Figura 2G) e hepática ($p < 0,0001$; Figura 2H).

248 O grupo DM1 apresentou um aumento da expressão do gene PPAR α (p
249 $< 0,05$), que está associado a mecanismos de β -oxidação; aumento da
250 expressão de FASN ($p < 0,05$) e DGAT ($p < 0,05$), que estão associados à
251 síntese de ácidos graxos e triglicerídeos, respectivamente; e aumento da

252 expressão do marcador inflamatório TNF- α ($p < 0,05$) em relação ao CTR. O
253 DM2, por sua vez, apresentou um perfil gênico favorável ao desenvolvimento de
254 DHGNA nos animais, marcado por ausência de alteração da expressão de
255 PPAR α e elevação expressiva dos genes relacionados à lipogênese hepática,
256 como PPAR γ ($p < 0,0001$), FASN ($p < 0,05$) e DGAT ($p < 0,01$) e a respostas
257 inflamatórias, como TNF- α ($p < 0,001$) e IL-10 ($p < 0,05$) (Figura 3).

258 No que se refere a avaliação histopatológica de danos hepáticos,
259 acúmulo de gordura intra-hepática e fibrose, os grupos diabéticos também
260 apresentaram perfis bem diferentes entre si. Os hepatócitos do grupo DM1 não
261 apresentaram esteatose, presença de infiltrados inflamatórios, balonização
262 (Figura 4B), acúmulo de gordura intra-hepática (Figuras 4E e G), contudo
263 apresentaram baixo grau de fibrose somente em nível perivascular (Figuras 5E
264 e G). Em contraponto, o grupo DM2 caracterizou-se pela instalação de DHGNA
265 marcada por esteatose microvesicular, presença de infiltrados inflamatórios
266 lobulares e balonização (Figura 4C), além de acúmulo de gordura ectópica
267 (Figuras 4F e G) e marcante fibrose parenquimal (Figuras 5C e G) e perivascular
268 (Figuras 5F e G).

269 Por fim, avaliamos alterações ultraestruturais e nanomecânicas nos
270 hepatócitos dos grupos e o grupo DM1 caracterizou-se por um leve aumento de
271 volume celular ($p < 0,01$; Figura 6H) e aumento das forças nanomecânicas de
272 adesão ($p < 0,0001$; Figura 6J) e módulo de Young ($p < 0,0001$; Figura 6K). No
273 grupo DM2 estas alterações se mostraram mais significantes com aumento da
274 área de superfície ($p < 0,0001$; Figura 6G), volume celular ($p < 0,0001$; Figura
275 6H), rugosidade ($p < 0,0001$; Figura 6I), adesão ($p < 0,0001$; Figura 6J) e módulo
276 de Young ($p < 0,0001$; Figura 6K).

277

278 **DISCUSSÃO**

279 Nosso conjunto de dados evidenciou marcantes diferenças funcionais,
280 morfológicas e ultraestruturais hepáticas entre animais com DM tipo 1 e tipo 2.
281 Em termos gerais, os perfis metabólicos de ambos os grupos seguem
282 características já descritas na literatura. No entanto, quando analisamos
283 diferentes parâmetros no tecido hepático destes animais, diferenças, até então
284 pouco descritas, tornaram-se evidentes. Estas análises incluíram expressão
285 gênica de marcadores lipogênicos e inflamatórios, bem como microscopia óptica

286 e ultraestrutural. Como discutido a seguir, tais diferenças parecem associar-se
287 com os níveis diametralmente opostos de insulina sérica encontrados entre os
288 dois modelos de DM.

289 A insulina é um hormônio anabólico essencial na manutenção de
290 processos fisiológicos básicos como homeostase de glicose, crescimento e
291 diferenciação celular (25). Esse hormônio é sintetizado e secretado pelas células
292 β das ilhotas pancreáticas em estado pós-prandial em resposta à elevação dos
293 níveis circulantes de glicose e aminoácidos (26). A insulina regula a homeostase
294 de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via
295 diminuição da gliconeogênese e glicogenólise), promovendo a síntese de
296 glicogênio e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos
297 tecidos muscular esquelético e adiposo (27). Além disso, a insulina também é
298 essencial para regulação do metabolismo proteico, ao promover proteogênese;
299 e do metabolismo lipídico, ao promover adipogênese, suprimir a lipólise e regular
300 a síntese *de novo* de lipídeos (DNL) (28). Sendo assim, fica evidente que
301 prejuízos na produção ou função da insulina comprometem significativamente
302 suas funções fisiológicas.

303 Em nosso estudo, observamos nos animais com DM1 severa atrofia
304 muscular e adiposa, hiperglicemia, hipoinsulinemia e RI. Hiperglicemia severa e
305 hipoinsulinemia são os principais achados em animais que receberam STZ, seja
306 em dose única, doses baixas seriadas e/ou alternadas (29) ou associada a dietas
307 hipercalóricas (30). Não é muito bem descrito o mecanismo pelo qual a STZ
308 promove RI, porém acredita-se que a hiperglicemia prolongada e o elevado
309 estresse oxidativo estejam relacionados (31). Perda de peso decorrente de
310 atrofia muscular e adiposa é comumente encontrada em ratos que receberam
311 STZ (32) e humanos com DM1 (33). Tendo em vista que a insulina tem papel
312 fundamental para a captação de aminoácidos e síntese proteica para os
313 músculos, bem como atua regulando o trofismo adipocitário via processo de
314 lipogênese, é esperado que condições de hipoinsulinemia promovam intensa
315 proteólise e lipólise, causando atrofia muscular e adiposa (34).

316 Por outro lado, nossos animais expostos à sacarose durante a vida
317 intrauterina e fase lactacional desenvolveram características clássicas de DM2,
318 tais como obesidade central, sarcopenia obesogênica, hiperglicemia (menor que
319 no DM1), hiperinsulinemia, dislipidemias e RI. A exposição materna à sacarose

320 é um modelo de indução de alterações metabólicas na prole relativamente
321 recente, com poucos dados na literatura. A maioria das publicações tratam de
322 exposições a dietas hiperlipídicas (35; 36) ou *western diet* (37; 38). Contudo, um
323 conjunto de dados recentes (ainda não publicados) de nosso grupo de pesquisa
324 demonstram que a exposição perigestacional à sacarose induz síndrome
325 metabólica na prole adulta, incluindo DM2. Como dito, embora os mecanismos
326 responsáveis pelos efeitos intergeracionais decorrentes da exposição fetal à
327 sacarose não estejam solidamente caracterizados, acreditamos que vias de
328 sinalização semelhantes àquelas já descritas para a exposição direta à sacarose
329 possam estar envolvidas (39-42).

330 Embora os mecanismos moleculares envolvidos na desregulação da
331 DNL ainda não sejam totalmente conhecidos, sabe-se que a hiperglicemia e RI,
332 tanto periférica quanto hepática, possuem relevante participação. Níveis
333 elevados de glicose e insulina perturbam a maquinaria lipogênica hepática e
334 promovem a ativação desregulada dos fatores de transcrição proteína de ligação
335 ao elemento responsivo de esteroide (SREBP) e proteína de ligação ao elemento
336 responsivo a carboidrato (ChREBP), que por sua vez, hiperativa enzimas
337 lipogênicas e intensificam a síntese de lipídeos intra-hepáticos (28).

338 Em paralelo, ocorre também comprometimento da atividade do receptor
339 ativado pelo proliferador de peroxissomo alfa (PPAR- α), levando a inibição da
340 beta-oxidação e do transporte de ácidos graxos, favorecendo ainda mais a
341 progressão da DHGNA (43).

342 O desenvolvimento de DHGNA como reflexo da obesidade e
343 hiperinsulinemia no DM2 é bem estabelecido na comunidade acadêmica (44-46).
344 E, mais recentemente, levantamentos mostram que 20% dos pacientes com
345 DM1 em uso de insulina exógena também apresentam DHGNA (47; 48). Sugere-
346 se que a hiperglicemia descontrolada, prejuízos no processo de depuração da
347 insulina, hiperplacogonemia, ativação dos fatores de transcrição da DNL e até
348 RI periférica e hepática sejam os fatores determinantes para o desequilíbrio da
349 DNL nestes indivíduos (48).

350 Em concordância com as evidências publicadas na literatura (39; 41; 49)
351 os animais com DM2 de nosso estudo apresentaram desregulação da DNL
352 inferida pelo aumento da expressão gênica de enzimas lipogênicas e
353 marcadores inflamatórios, bem como redução da β -oxidação. As expressões dos

354 genes avaliados foram corroboradas com os achados histopatológicos de
355 acúmulo de gordura intra-hepática, inflamação, ballooning e fibrose,
356 característicos de uma EHNA avançada. Por outro lado, embora nossos animais
357 DM1 tenham apresentado elevação da expressão de enzimas lipogênicas e
358 inflamação (em menor grau que o DM2), este panorama não repercutiu no
359 surgimento de DHGNA. Isto pode ser atribuído a uma β -oxidação mediada pelo
360 aumento da expressão do PPAR α .

361 O acúmulo ectópico de lipídios no interior dos hepatócitos leva à lesão
362 celular que resulta em aumento imediato da rigidez do tecido hepático (50; 51).
363 Como consequência, ocorre ativação de células estreladas e fibroblastos portais
364 que aumentam a deposição de colágeno periportal e parenquimal num processo
365 de retroalimentação positiva que tende a intensificar ainda mais a rigidez do
366 tecido (52; 53). Este roteiro é confirmado pelos nossos dados quando analisados
367 os parâmetros biomecânicos por AFM, especialmente o módulo de Young, que
368 demonstram que os animais DM2 apresentam comprometimento dos
369 parâmetros biomecânicos hepáticos em intensidade muito maior que os DM1.
370 Estes dados são corroborados pelo grande aumento de fibrose perivascular nos
371 DM2 quando comparados a DM1 e CTR. Por outro lado, não estão claros quais
372 os fatores responsáveis pelo comprometimento, ainda que sutil, da biomecânica
373 hepática dos DM1, visto que estes não apresentaram esteatose hepática.

374

375 REFERÊNCIAS

- 376 1. Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann
377 G, Heinemann L, Schleicher E: Definition, classification and diagnosis of diabetes
378 mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2019;127:S1-S7
- 379 2. Moxey P, Gogalniceanu P, Hinchliffe R, Loftus I, Jones K, Thompson M, Holt
380 P: Lower extremity amputations—a review of global variability in incidence.
381 *Diabetic Medicine* 2011;28:1144-1153
- 382 3. Schleicher E, Gerdes C, Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA,
383 Freckmann G, Heinemann L, Nauck M, Landgraf R: Definition, classification and
384 diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology &*
385 *Diabetes* 2022;130:S1-S8
- 386 4. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson
387 BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å: Type 1 diabetes mellitus. *Nature*
388 *reviews Disease primers* 2017;3:1-17
- 389 5. Zheng Y, Ley SH, Hu FB: Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes
390 mellitus and its complications. *Nature reviews endocrinology* 2018;14:88-98
- 391 6. Association AD: 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care*
392 2017;40:S11-S24

- 393 7. Zhou Z, Sun B, Huang S, Zhu C, Bian M: Glycemic variability: adverse clinical
394 outcomes and how to improve it? *Cardiovascular diabetology* 2020;19:1-14
- 395 8. Saltiel AR: Insulin signaling in health and disease. *The Journal of clinical*
396 *investigation* 2021;131
- 397 9. Edgerton DS, Lautz M, Scott M, Everett CA, Stettler KM, Neal DW, Chu CA,
398 Cherrington AD: Insulin's direct effects on the liver dominate the control of hepatic
399 glucose production. *The Journal of clinical investigation* 2006;116:521-527
- 400 10. Brunt EM, Tiniakos DG: Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease.
401 *World journal of gastroenterology: WJG* 2010;16:5286
- 402 11. Li YY, Zheng TL, Xiao SY, Wang P, Yang WJ, Jiang LL, Chen LL, Sha JC,
403 Jin Y, Chen SD: Hepatocytic ballooning in non-alcoholic steatohepatitis:
404 Dilemmas and future directions. *Liver International* 2023;
- 405 12. Lazarus JV, Mark HE, Anstee QM, Arab JP, Batterham RL, Castera L, Cortez-
406 Pinto H, Crespo J, Cusi K, Dirac MA: Advancing the global public health agenda
407 for NAFLD: a consensus statement. *Nature Reviews Gastroenterology &*
408 *Hepatology* 2022;19:60-78
- 409 13. Henry L, Paik J, Younossi ZM: the epidemiologic burden of non-alcoholic fatty
410 liver disease across the world. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2022;
- 411 14. Sousa RML, Ribeiro NLX, Pinto BAS, Sanches JR, da Silva MU, Coêlho CFF,
412 França LM, de Figueiredo Neto JA, Paes AMA: Long-term high-protein diet intake
413 reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-fed
414 adult rats. *Nutrition & metabolism* 2018;15:53
- 415 15. Gong C-Y, Lu B, Hu Q-W, Ji L-L: Streptozotocin induced diabetic retinopathy
416 in rat and the expression of vascular endothelial growth factor and its receptor.
417 *International journal of ophthalmology* 2013;6:573
- 418 16. Bernardis L, Patterson B: Correlation between 'Lee index' and carcass fat
419 content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of*
420 *Endocrinology* 1968;40:527-528
- 421 17. Guerrero-Romero F, Simental-Mendía LE, Gonzalez-Ortiz M, Martínez-
422 Abundis E, Ramos-Zavala MaG, Hernandez-Gonzalez SO, Jacques-Camarena
423 O, Rodríguez-Morán M: The product of triglycerides and glucose, a simple
424 measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic
425 clamp. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010;95:3347-3351
- 426 18. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R:
427 Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from
428 fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*
429 1985;28:412-419
- 430 19. Flister KFT, Pinto BAS, França LM, Coêlho CFF, Dos Santos PC, Vale CC,
431 Kajihara D, Debbas V, Laurindo FRM, Paes AMA: Long-term exposure to high-
432 sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress adaptive
433 pathways and potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice. *The Journal*
434 *of nutritional biochemistry* 2018;62:155-166
- 435 20. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR: Picrosirius staining plus
436 polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue
437 sections. *The Histochemical Journal* 1979;11:447-455
- 438 21. Brown GT, Kleiner DE: Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and
439 nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism* 2016;65:1080-1086
- 440 22. Pai RK, Jairath V, Hogan M, Zou G, Adeyi OA, Anstee QM, Aqel BA, Behling
441 C, Carey EJ, Clouston AD: Reliability of histologic assessment for NAFLD and

- 442 development of an expanded NAFLD activity score. *Hepatology* 2022;76:1150-
443 1163
- 444 23. Polce SA, Burke C, França LM, Kramer B, Paes AMdA, Carrillo-Sepulveda
445 MA: Ellagic acid alleviates hepatic oxidative stress and insulin resistance in
446 diabetic female rats. *Nutrients* 2018;10:531
- 447 24. Spedden E, White JD, Naumova EN, Kaplan DL, Staii C: Elasticity maps of
448 living neurons measured by combined fluorescence and atomic force
449 microscopy. *Biophysical journal* 2012;103:868-877
- 450 25. Kolb H, Kempf K, Röhling M, Martin S: Insulin: too much of a good thing is
451 bad. *BMC medicine* 2020;18:1-12
- 452 26. Rahman MS, Hossain KS, Das S, Kundu S, Adegoke EO, Rahman MA,
453 Hannan MA, Uddin MJ, Pang M-G: Role of insulin in health and disease: an
454 update. *International journal of molecular sciences* 2021;22:6403
- 455 27. Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA: Insulin effects
456 in muscle and adipose tissue. *Diabetes research and clinical practice*
457 2011;93:S52-S59
- 458 28. Jeon YG, Kim YY, Lee G, Kim JB: Physiological and pathological roles of
459 lipogenesis. *Nature Metabolism* 2023:1-25
- 460 29. Furman BL: Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current*
461 *Protocols* 2021;1:e78
- 462 30. Heather LC, Hafstad AD, Halade GV, Harmancey R, Mellor KM, Mishra PK,
463 Mulvihill EE, Nabben M, Nakamura M, Rider OJ: Guidelines on models of diabetic
464 heart disease. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*
465 2022;323:H176-H200
- 466 31. Chao P-C, Li Y, Chang C-H, Shieh JP, Cheng J-T, Cheng K-C: Investigation
467 of insulin resistance in the popularly used four rat models of type-2 diabetes.
468 *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018;101:155-161
- 469 32. Qamar F, Sultana S, Sharma M: Animal models for induction of diabetes and
470 its complications. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2023:1-8
- 471 33. Omura T, Araki A: Skeletal muscle as a treatment target for older adults with
472 diabetes mellitus: The importance of a multimodal intervention based on
473 functional category. *Geriatrics & Gerontology International* 2022;22:110-120
- 474 34. Petersen MC, Shulman GI: Mechanisms of insulin action and insulin
475 resistance. *Physiological reviews* 2018;98:2133-2223
- 476 35. Nevzorova YA, Boyer-Diaz Z, Cubero FJ, Gracia-Sancho J: Animal models
477 for liver disease—a practical approach for translational research. *Journal of*
478 *hepatology* 2020;73:423-440
- 479 36. Im YR, Hunter H, de Gracia Hahn D, Duret A, Cheah Q, Dong J, Fairey M,
480 Hjalmarsson C, Li A, Lim HK: A systematic review of animal models of NAFLD
481 finds high-fat, high-fructose diets most closely resemble human NAFLD.
482 *Hepatology* 2021;74:1884-1901
- 483 37. Henkel J, Coleman CD, Schraplau A, Jöhrens K, Weber D, Castro JP, Hugo
484 M, Schulz TJ, Krämer S, Schürmann A: Induction of steatohepatitis (NASH) with
485 insulin resistance in wild-type B6 mice by a western-type diet containing soybean
486 oil and cholesterol. *Molecular Medicine* 2017;23:70-82
- 487 38. Yang P, Wang Y, Tang W, Sun W, Ma Y, Lin S, Jing J, Jiang L, Shi H, Song
488 Z: Western diet induces severe nonalcoholic steatohepatitis, ductular reaction,
489 and hepatic fibrosis in liver CGI-58 knockout mice. *Scientific Reports*
490 2020;10:4701

- 491 39. França LM, Dos Santos PC, Barroso WA, Gondim RSD, Coêlho CFF, Flister
492 KFT, de Andrade Paes AM: Post-weaning exposure to high-sucrose diet induces
493 early non-alcoholic fatty liver disease onset and progression in male mice: role of
494 dysfunctional white adipose tissue. *Journal of Developmental Origins of Health
495 and Disease* 2020;11:509-520
- 496 40. Sousa RML, Ribeiro NLX, Pinto BAS, Sanches JR, da Silva MU, Coêlho CFF,
497 França LM, de Figueiredo Neto JA, Paes AMdA: Long-term high-protein diet
498 intake reverts weight gain and attenuates metabolic dysfunction on high-sucrose-
499 fed adult rats. *Nutrition & metabolism* 2018;15:1-13
- 500 41. Flister KFT, Pinto BAS, França LM, Coêlho CFF, Dos Santos PC, Vale CC,
501 Kajihara D, Debbas V, Laurindo FRM, de Andrade Paes AM: Long-term exposure
502 to high-sucrose diet down-regulates hepatic endoplasmic reticulum-stress
503 adaptive pathways and potentiates de novo lipogenesis in weaned male mice.
504 *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2018;62:155-166
- 505 42. Pinto BAS, Melo TM, Flister KFT, França LM, Moreira VR, Kajihara D,
506 Mendes NO, Pereira SR, Laurindo FRM, Paes AMA: Hippocampal Endoplasmic
507 Reticulum Stress Hastens Motor and Cognitive Decline in Adult Male Rats
508 Sustainedly Exposed to High-Sucrose Diet. *Antioxidants* 2022;11:1395
- 509 43. Cariello M, Piccinin E, Moschetta A: Transcriptional regulation of metabolic
510 pathways via lipid-sensing nuclear receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH.
511 *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 2021;11:1519-1539
- 512 44. Demir M, Bornstein SR, Mantzoros CS, Perakakis N: Liver fat as risk factor
513 of hepatic and cardiometabolic diseases. *Obesity Reviews* 2023:e13612
- 514 45. Yki-Järvinen H: Liver fat in the pathogenesis of insulin resistance and type 2
515 diabetes. *Digestive diseases* 2010;28:203-209
- 516 46. Valenti L, Bugianesi E, Pajvani U, Targher G: Nonalcoholic fatty liver disease:
517 cause or consequence of type 2 diabetes? *Liver International* 2016;36:1563-1579
- 518 47. de Vries M, Westerink J, El-Morabit F, Kaasjager HK, de Valk HW:
519 Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its association with
520 surrogate markers of insulin resistance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes
521 Research and Clinical Practice* 2022;186:109827
- 522 48. Memaj P, Jornayvaz FR: Non-alcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes:
523 Prevalence and pathophysiology. *Frontiers in Endocrinology* 2022;13:1031633
- 524 49. Harmancey R, Wilson CR, Wright NR, Taegtmeier H: Western diet changes
525 cardiac acyl-CoA composition in obese rats: a potential role for hepatic
526 lipogenesis [S]. *Journal of lipid research* 2010;51:1380-1393
- 527 50. Georges PC, Hui J-J, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, Mick
528 R, Janmey PA, Furth EE, Wells RG: Increased stiffness of the rat liver precedes
529 matrix deposition: implications for fibrosis. *American Journal of Physiology-
530 Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007;293:G1147-G1154
- 531 51. Perepelyuk M, Terajima M, Wang AY, Georges PC, Janmey PA, Yamauchi
532 M, Wells RG: Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular
533 sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury.
534 *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*
535 2013;304:G605-G614
- 536 52. Wells RG: The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology*
537 2008;47:1394-1400
- 538 53. Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, Gaça MD, Georges PC, Sackey B, Uemura
539 M, Janmey PA, Wells RG: Hepatic stellate cells require a stiff environment for

540 myofibroblastic differentiation. American Journal of Physiology-Gastrointestinal
541 and Liver Physiology 2011;301:G110-G118

542

543 **AGRADECIMENTOS**

544 Os autores agradecem à equipe do Laboratório de Fisiologia
545 Experimental e do Laboratório de Biofísica e Nanosistemas por todo o suporte
546 técnico durante os procedimentos experimentais.

547 Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao
548 Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA e Conselho
549 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

550

551 **CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES**

552 J.R.S e A.M.A.P foram responsáveis pela concepção e desenho do
553 estudo. B.A.S.P, J.R.S, realizaram experimentos com animais, protocolos
554 bioquímicos e de biologia molecular e análise dados. A.M.A.P, B.A.S.P, L.M.R.A
555 supervisionaram na execução dos protocolos e auxiliaram na interpretação de
556 dados e dados discutidos criticamente. J.R.S e B.A.S.P. redigiram o manuscrito.
557 Todos os autores leram, discutiram criticamente e aprovaram o manuscrito final.

558

559 **CONFLITO DE INTERESSES**

560 Os autores declaram a ausência de quaisquer relações comerciais ou
561 financeiras que possam ser interpretadas como potencial conflito de interesses.

562

563 **LEGENDAS**

564 **Figura 1. Avaliação da massa corpórea e morfométrica dos tecidos** (A)
565 Massa corpórea (g); (B) Área sob a curva da massa corpórea; (C) Índice de Lee
566 ($\text{g}^{1/3}/\text{cm}^3 \times 1000$); (D) Peso relativo dos músculos posteriores sóleo e gastrocnêmio
567 ($\text{g}/100\text{g}$ de MC); (E) peso relativo ($\text{g}/100\text{g}$ peso) dos coxins adiposos
568 retroperitoneal, periepididimal e mesentérico avaliado em ratos controle não
569 diabéticos (CTR; $n=6$), em ratos diabéticos tipo 1 (DM1; $n=5$) e ratos diabéticos
570 tipo 2 (DM2; $n=5$). Pontos e barras representam média \pm SEM (*One way Anova*
571 *Newman Keuls*). ^a $p < 0,05$ quando comparado com CTR e ^b $p < 0,05$ quando
572 comparado com DM1.

573

574 **Figura 2. Avaliação do perfil glicolipídico e de resistência à insulina.** (A)
575 Níveis glicêmicos em jejum (mg/dL); (B) níveis glicêmicos durante teste de
576 tolerância à glicose (GTT) (mg/dL); (C) área sobre a curva dos níveis glicêmicos
577 durante GTT; (D) níveis séricos de insulina ($\mu\text{LU}/\text{mL}$); (E) níveis de colesterol
578 total (mg/dL); (F) níveis de triglicerídeos (mg/dL); (G-H) índices HOMA e TyG
579 avaliado em ratos controle não diabéticos (CTR; $n=6$), em ratos diabéticos tipo 1
580 (DM1; $n=5$) e ratos diabéticos tipo 2 (DM2; $n=5$). Pontos e barras representam
581 média \pm SEM (*One way Anova Newman Keuls*). ^a $p < 0,05$ quando comparado
582 com CTR e ^b $p < 0,05$ quando comparado com DM1.

583

584 **Figura 3. Expressão gênica de marcadores moleculares lipogênicos e**
585 **inflamatórios hepáticos.** Expressões relativas de RNAm de receptores
586 ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR- α e PPAR- γ), ácido graxo
587 sintase (FASN), diacilglicerol acetiltransferase (DGAT), fator de necrose tumoral
588 alfa (TNF- α) e interleucina 10 (IL-10) avaliado no fígado de ratos controle não
589 diabéticos (CTR; $n=6$), em ratos diabéticos tipo 1 (DM1; $n=5$) e ratos diabéticos
590 tipo 2 (DM2; $n=5$). Todas as amostras foram normalizadas pelos níveis de
591 GAPDH e os resultados foram expressos a partir do cálculo dos valores de $2^{-\Delta\text{CT}}$.
592 Pontos e barras representam média \pm SEM (*One way Anova Newman Keuls*). ^a
593 $p < 0,05$ quando comparado com CTR e ^b $p < 0,05$ quando comparado com DM1.

594

595 **Figura 4. Análise histomorfológica dos danos hepáticos.** Cortes
596 representativos ($10 \mu\text{m}$) do fígado corados com H&E e Oil Red são mostradas

597 no painel acima. Cada lâmina foi classificada de acordo com o escore da
598 DHGNA/EHNA. O “V” indica a localização da veia centrolobular, balonização de
599 hepatócitos (setas), infiltrado inflamatório (pontas de seta) (A –C). (D – F)
600 demonstra o grau de esteatose hepática (20x e quantificada usando Software
601 ImageJ). (G) área de esteatose hepática avaliada em ratos controle não
602 diabéticos (CTR; n=6), em ratos diabéticos tipo 1 (DM1; n=5) e prole de ratas
603 expostas à dieta rica em sacarose (DM2; n=5). Pontos e barras representam
604 média \pm SEM (*One way Anova Newman Keuls*). ^a $p < 0,05$ quando comparado
605 com CTR e ^b $p < 0,05$ quando comparado com DM1.

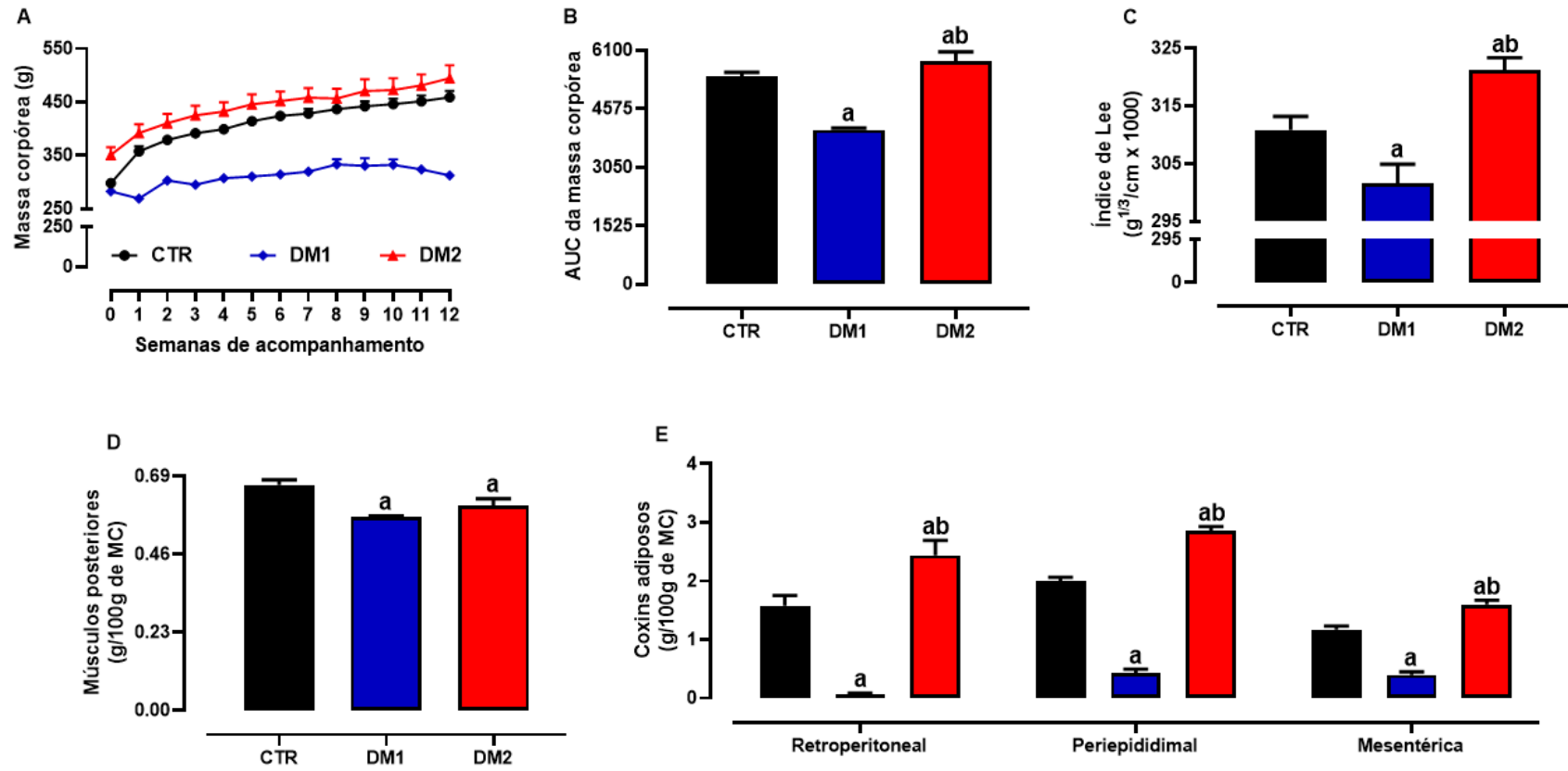
606

607 **Figura 5. Avaliação histomorfológica da fibrose hepática.** Cortes
608 representativos (10 μm) do fígado corados com Picrosírius red (PSR) são
609 mostradas no painel acima. (A-C) Imagens representativas no microscópio
610 óptico de cortes hepáticos por coloração PSR da região do parênquima e (D-F)
611 da região perivascular. (G) Quantificação da área vermelha positiva para PSR
612 no fígado de (20x e quantificada usando Software ImageJ) avaliada em ratos
613 controle não diabéticos (CTR; n=6), em ratos diabéticos tipo 1 (DM1; n=5) e prole
614 de ratas expostas à dieta rica em sacarose (DM2; n=5). Pontos e barras
615 representam média \pm SEM (*One way Anova Newman Keuls*). ^a $p < 0,05$ quando
616 comparado com CTR e ^b $p < 0,05$ quando comparado com DM1.

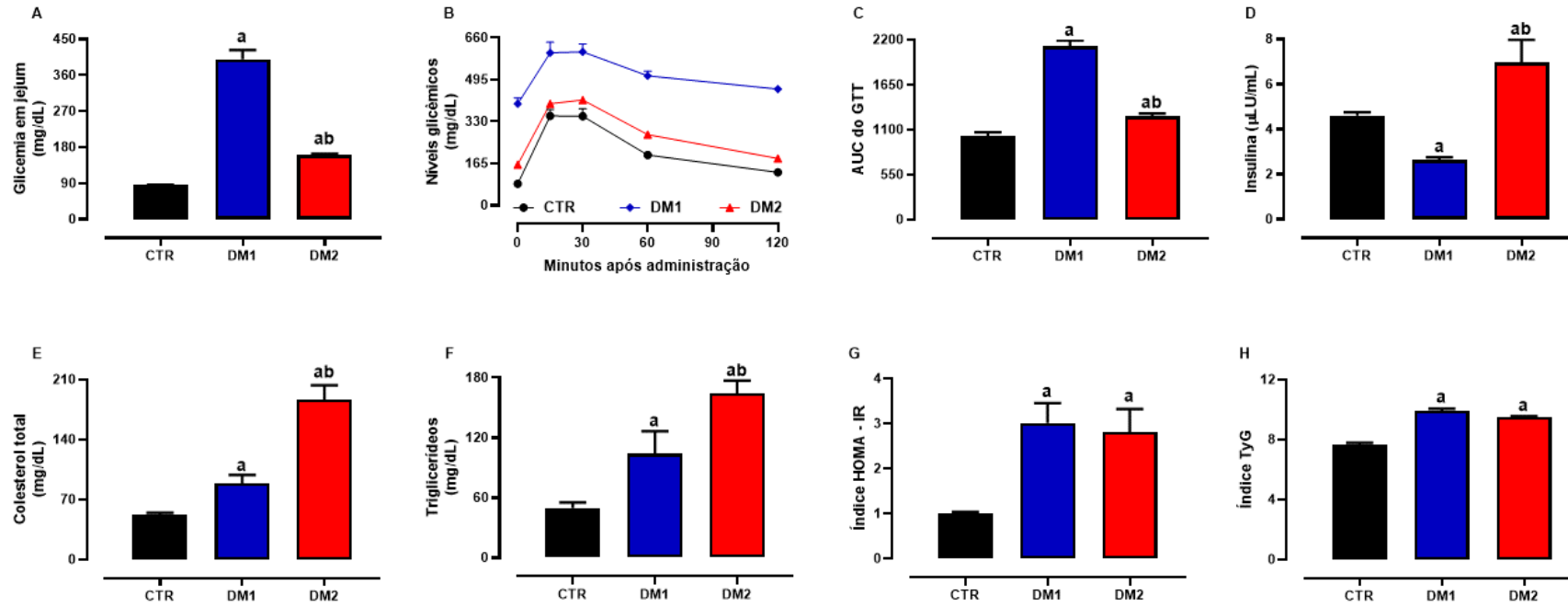
617

618 **Figura 6. Avaliação dos parâmetros ultraestruturais e nanomecânicos.** (A –
619 F) Mapas topográficos ultraestruturais avaliados por microscopia de força
620 atômica. Gráficos das propriedades ultraestruturais G) área (μm^2); H) volume
621 celular (μm^3) e I) rugosidade (nm). Propriedades mecânicas do fígado. J) Adesão
622 (nN) ; K) Módulo de Young (MPa) avaliado em fígado de ratos controle não
623 diabéticos (CTR; n=6), em ratos diabéticos tipo 1 (DM1; n=5) e prole de ratas
624 expostas à dieta rica em sacarose (DM2; n=5). Pontos e barras representam
625 média \pm SEM (*One way Anova Newman Keuls*). ^a $p < 0,05$ quando comparado
626 com CTR e ^b $p < 0,05$ quando comparado com DM1.

627

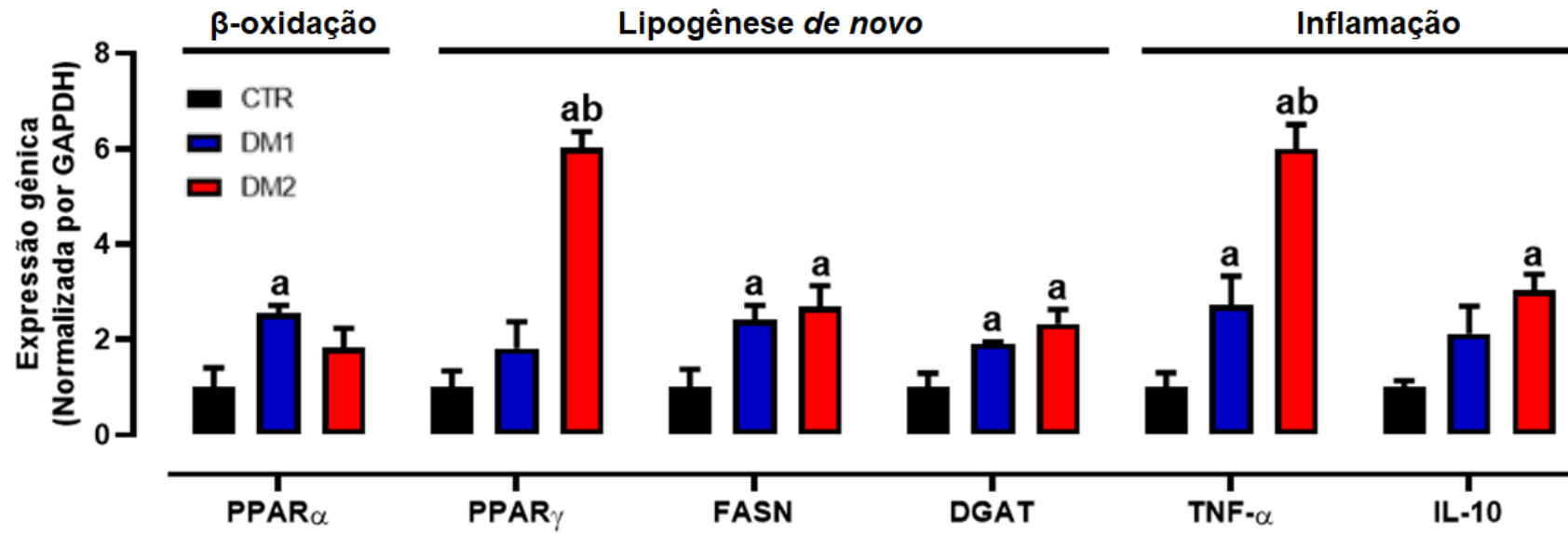
628 **Figura 1.**

629

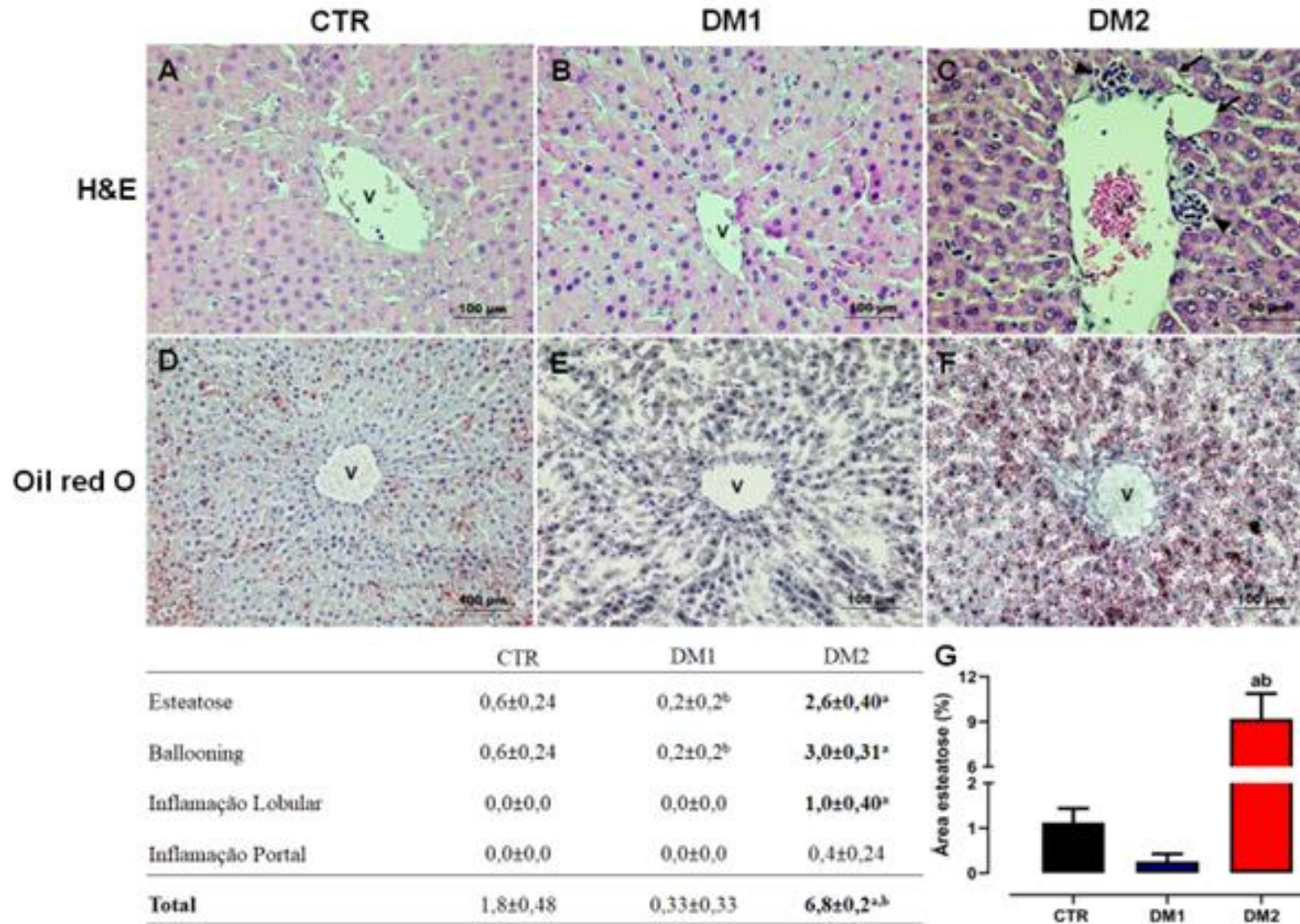
630 **Figura 2.**

631

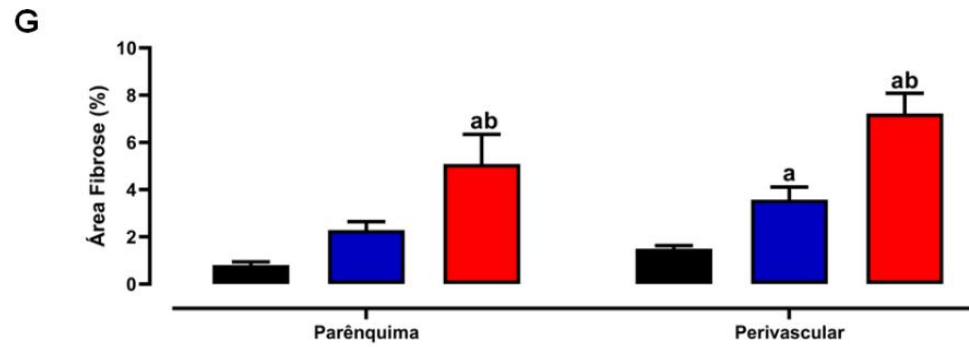
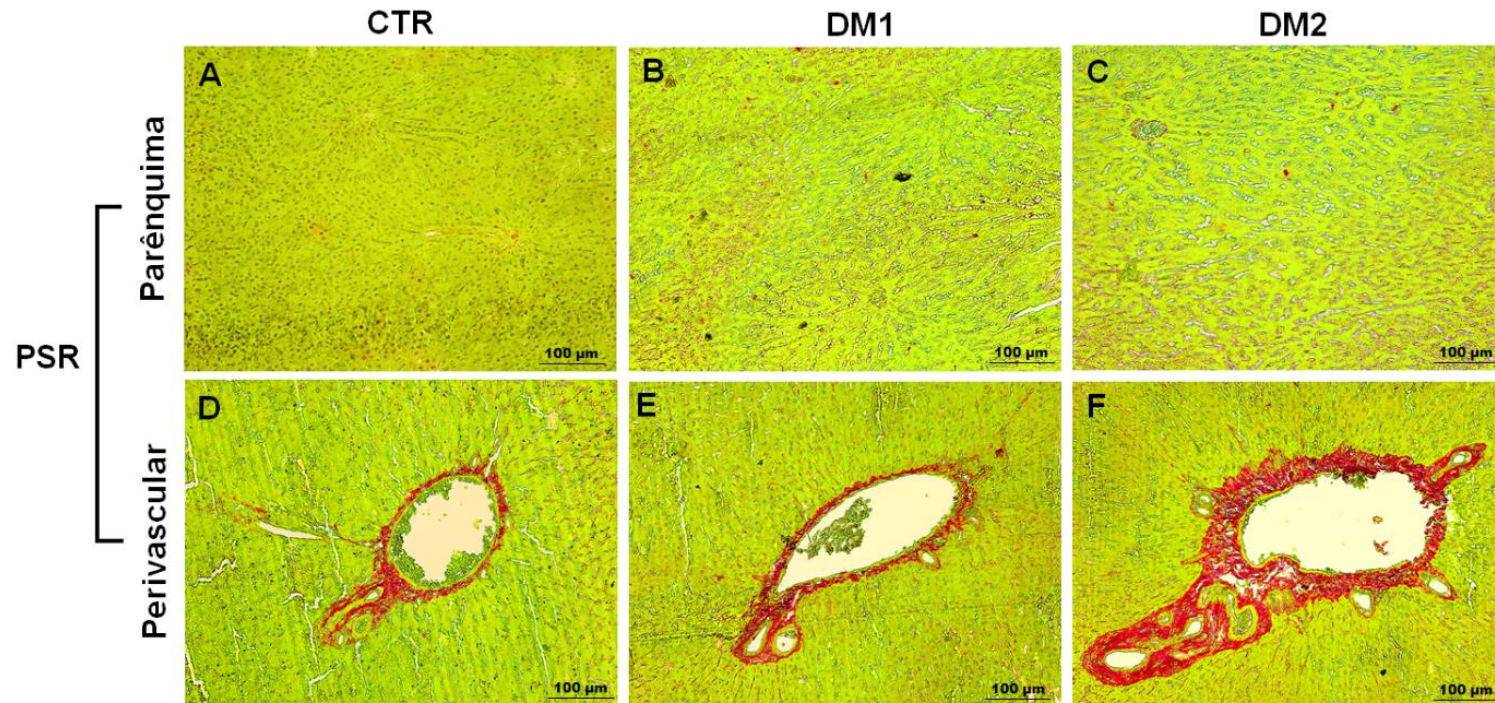
632 Figura 3.

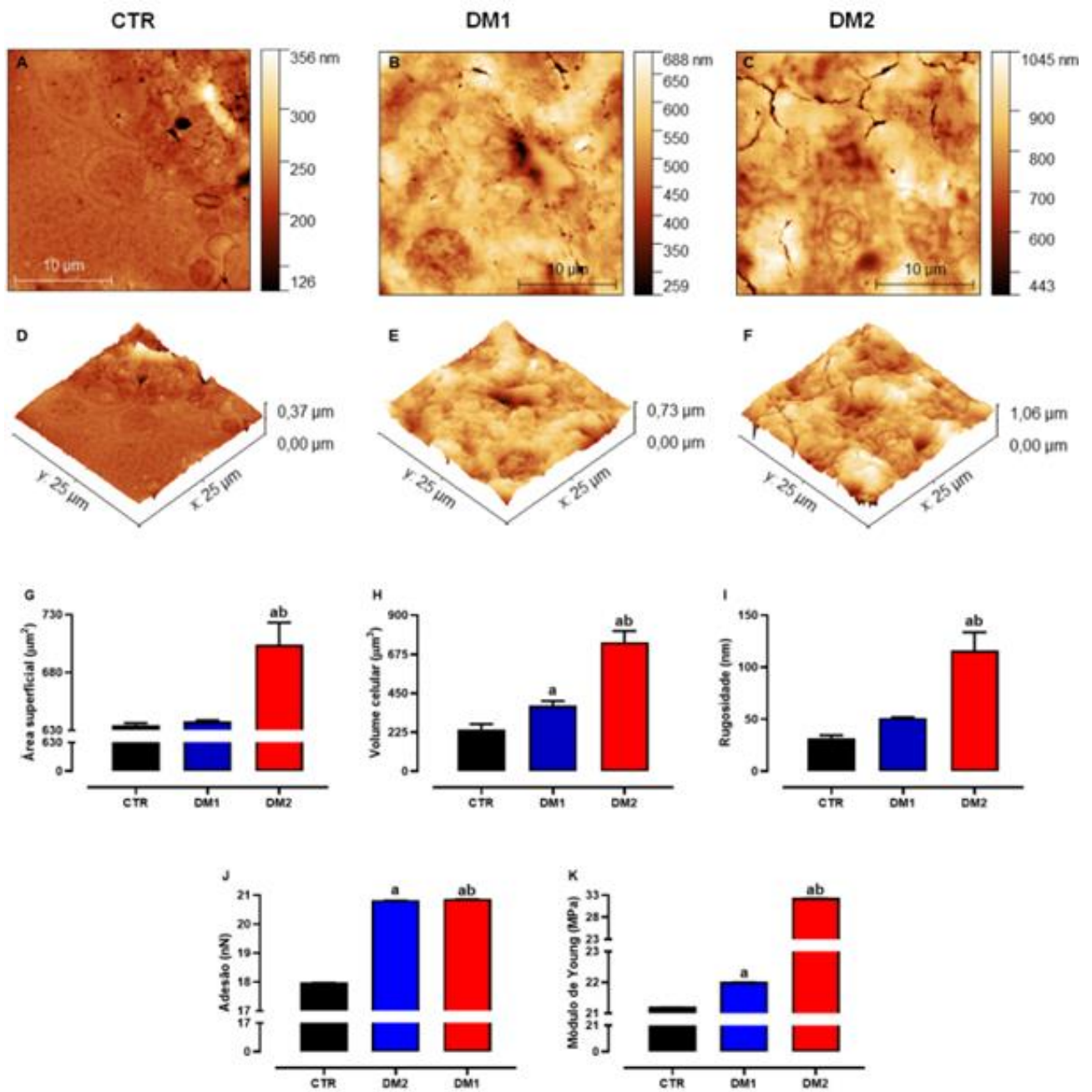


633

634 **Figura 4.**

635

636 **Figura 5.**

639 **Figura 6.**

640

641

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela 1. Sequência de *primers*

Genes*	<i>Sense</i>	<i>Antisense</i>	<i>GenBank n°</i>
GAPDH	GAGACAGCCGCATCTTCTTGT	CGACCTTCACCATCTTGTCTATGA	NM_017008.4
PPAR α	TTCCTGAACTTGACCTTTCT	CTCATTGTTGTACTGGTTGG	NM_031347.1
PPAR γ	CATATCAGAGGGACAAGGAT	GAACTTCACAGCAAACCTCAA	NM_001145366.1
FASN	CTCCACAGCTCTTACAGTGA	CACACTGCTGTTTTCTCTA	NM_017332.2
DGAT	TGGCTACATTTTCAGATTGAG	AACCCACTGGAGTGATAGAC	NM_053437.2
TNF- α	ACTAACTCCCAGAAAAGCAA	AGTAGACAGAAGAGCGTGGT	NM_012675.3
IL-10	TTCATCAACTGCATAGAAGC	GAGGTACAAACGAGGTTTTTC	NM_012854.2

* **PPAR α** : receptor ativado por proliferadores de peroxissomas do tipo alfa; **PPAR γ** : receptor ativado por proliferadores de peroxissomas do tipo gama; **FASN**: ácido graxo sintase; **DGAT**: diacilglicerol acetiltransferase; **TNF- α** : fator de necrose tumoral alfa; **IL-10**: interleucina

4.2 Capítulo II

- **Artigo submetido no periódico *ACS Chemical Neuroscience*;**
- **Qualis CAPES – Medicina I: Classificação A2;**
- **Fator de impacto: 5,78;**
- **Título:** “Atomic force microscopy applied to the study of tauopathies”
- **Autores:** Maria do Socorro do Nascimento Amorim, Álefe Roger Silva França, Ralph Santos-Oliveira, Jonas Rodrigues Sanches, Thamys Marinho Melo, Bruno Araújo Serra Pinto, Leandro R. S. Barbosa e Luciana Magalhães Rebelo Alencar

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

ATOMIC FORCE MICROSCOPY APPLIED TO THE STUDY OF TAUOPATHIES

Journal:	<i>ACS Chemical Neuroscience</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Review
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	do Nascimento Amorim, Maria do Socorro; Federal University of Maranhao, Physics Silva França, Alefe ; Federal University of Maranhao, Physics Santos-Oliveira, Ralph; Comissao Nacional de Energia Nuclear, Nuclear Engineering Institute Rodrigues Sanches, Jonas ; Federal University of Maranhao, Department of Physiological Sciences Marinho Melo, Thamys ; Federal University of Maranhao, Department of Physiological Sciences Araújo Serra Pinto, Bruno ; Federal University of Maranhao, Department of Physiological Sciences R. S. Barbosa, Leandro; CNPEM, Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM) Alencar, Luciana; Federal University of Maranhao, Physics

SCHOLARONE™
Manuscripts

ATOMIC FORCE MICROSCOPY APPLIED TO THE STUDY OF TAUOPATHIES

Maria do Socorro do Nascimento Amorim¹, Álefe Roger Silva França¹, Ralph Santos-Oliveira^{2,3}, Jonas Rodrigues Sanches⁴, Thamys Marinho Melo⁴, Bruno Araújo Serra Pinto⁴, Leandro R. S. Barbosa^{5,6} and Luciana Magalhães Rebelo Alencar¹

¹Federal University of Maranhão, Department of Physics, Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Campus Bacanga, São Luís, 65080-805, Maranhão, Brazil

²Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Rio de Janeiro 21941906, Brazil

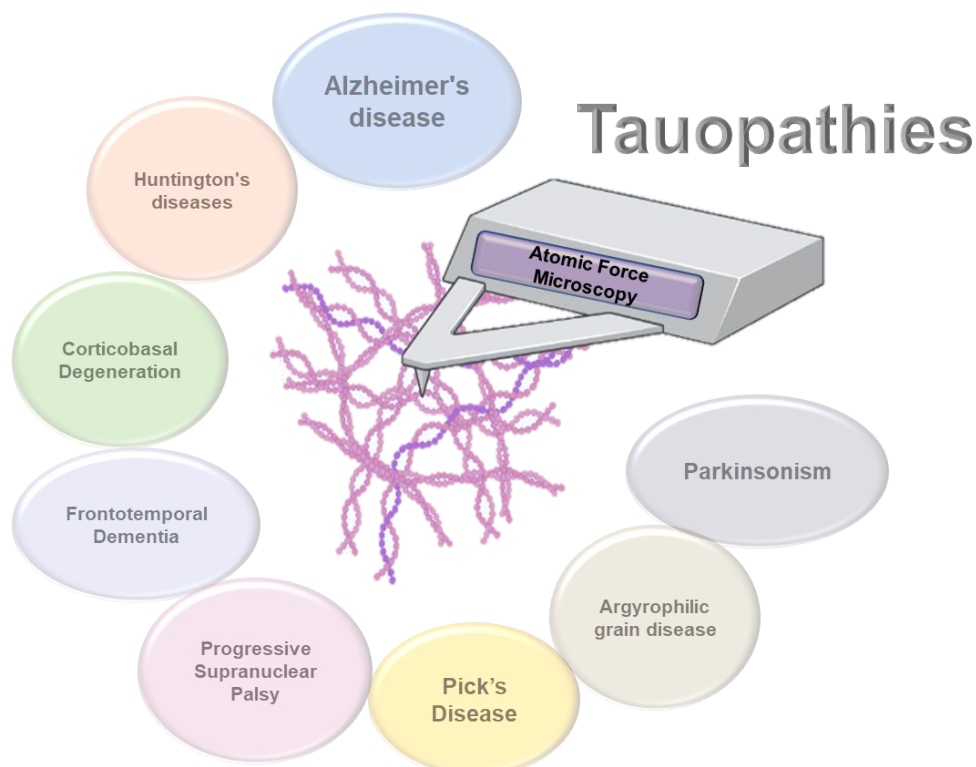
³Rio de Janeiro State University, Laboratory of Nanoradiopharmacy, Rio de Janeiro 23070200, Brazil

⁴Federal University of Maranhão, Department of Physiological Sciences, Laboratory of Experimental Physiology, Campus Bacanga, São Luís, 65080-805, Maranhão, Brazil

⁵Department of General Physics, Institute of Physics, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, SP, Brazil

⁶Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas 13083-100, SP, Brazil

Graphical Abstract



1
2
3 23 **ABSTRACT**

4 24 Atomic Force Microscopy (AFM) is a scanning probe microscopy technique with a physical
5
6 25 principle of measuring interatomic forces between a very thin tip and the surface of a sample,
7
8 26 allowing the obtaining of quantitative data at the nanoscale, contributing to the surface study
9
10 27 and mechanical characterization. Due to its great versatility, AFM has been used to investigate
11
12 28 the structural and nanomechanical properties of several inorganic and biological materials,
13
14 29 including neurons affected by tauopathies. Tauopathies are neurodegenerative diseases featured
15
16 30 by aggregating phosphorylated tau protein inside neurons, leading to functional loss and
17
18 31 progressive neurotoxicity. In the broad universe of neurodegenerative diseases, tauopathies
19
20 32 comprise the most prevalent, with Alzheimer's disease as its main representative. This review
21
22 33 highlights the use of AFM as a suitable research technique for studying cellular damage in
23
24 34 tauopathies, even in the early stages, to elucidate the pathogenic mechanisms of these diseases.

25
26
27 35

28
29
30
31
32
33
34
35
36 **Keywords:** AFM, Tauopathies, Amyloid Fibers, Alzheimer's Disease, Nanomechanics.

37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1. INTRODUCTION

The nanotechnology field ascended greatly with the rise of observation methods called Scanning Probe Microscopy (SPM). These methods revolutionized the field of microscopy by using sharp probes to map the surfaces under study instead of using light as a probing mechanism [1]. Atomic Force Microscopy (AFM) is a versatile and robust SPM technique that allows the analysis of any type of material, organic or not, providing information about its mechanical and ultrastructural properties on an atomic scale [2]. This technique has driven significant advances in biophysics and materials science.

Since its development, AFM has been used to characterize surfaces of non-biological materials [3]. Although its main applications are also focused on nanotechnology and materials science studies, AFM has gained popularity for studying biological materials since its invention [3, 4]. In this sense, using this equipment in biology and medicine is becoming increasingly fundamental, making important contributions in the area [5]. Nanotechnology has helped modern medicine advance by promoting knowledge of pathophysiology and molecular causes of a number of diseases as well as the creation of novel diagnostic techniques. For example, tissue morphology and mechanics are crucial for regulating organ function. AFM can acquire high-resolution images and correlate with mechanical and viscoelastic properties, offering an excellent opportunity to study blood cells [6], cancer cells [7], and viral particles [8], among other biological systems [9].

As a result, tauopathies become one of the most significant biologically relevant systems that may be studied using AFM and its capability for nanomechanical characterization of biological material. Tauopathies are defined as heterogeneous groups of neurodegenerative diseases where misfolded tau protein deposits accumulate in neuronal and/or glial cells, which eventually result in early cell death accompanied by dementia and/or Parkinsonism [10]. Alzheimer's disease stands out as the most prevalent tauopathy nowadays [11].

In the brain, Tau protein is predominantly found in neurons. However, it can also be found in the glia and extracellular matrix, even at low levels and with still elusive functions [12, 13]. The best-understood physiological role of the Tau protein is that which associates it with microtubules, assembling and regulating the dynamic instability of microtubules in neuronal axons, ensuring their structural integrity [14, 15]. Furthermore, Tau is essential for elongation, maturation, and axonal transport [16, 17].

Therefore, this manuscript aims to highlight the most recent applications of AFM in the study of tauopathies, exploring the main contributions this technique can offer to understand cellular alterations at the nanoscopic level and the pathophysiological mechanisms of these diseases, as well as diagnostic methods. We hope to show the strands of studies using the AFM.

1
2
3 73 This technique will still allow many remarkable discoveries with relevant impacts in the studies
4 74 of tauopathies and other neurodegenerative diseases.
5
6 75

76 **2. ATOMIC FORCE MICROSCOPY**

77 A timeline of the evolution of scanning probe microscopy techniques begins with the
78 creation of Scanning Tunneling Microscopy (STM), a precursor technique developed by Gerd
79 Binnig and Heinrich Rohrer in 1981, both of them laureated with the Physics Nobel Prize in
80 1986. The STM uses the tunneling effect as its guiding principle and measures the electron
81 currents flowing between the probe's tip and the sample being examined [18]. A different
82 strategy was thought of because the STM can only analyze conducting samples. So the
83 measurement of the force between the probe tip and the sample atoms started. Atomic Force
84 Microscopy was the name of this novel method.

85 AFM was developed in 1986 by Binnig and collaborators, and the first commercial
86 AFM was introduced in 1989 [19]. This methodology, in general, has as its fundamental
87 principle the measurement of intermolecular or interatomic forces between a very thin tip
88 (probe) and the sample to be analyzed and, subsequently, its transformation into an image that
89 reveals the topographic characteristics of the surface. AFM made studying all types of materials
90 possible since it does not use tunneling current but forces to study surfaces.

91 AFM relies on measuring forces between a small tip (typically a few nanometers in
92 size) and the sample surface. These forces can be van der Waals, electrostatic, magnetic, or
93 other interactions depending on the nature of the sample and tip [20]. Cantilever deflection is
94 measured using a laser beam that reflects off the cantilever and strikes a position-sensitive
95 photodiode, allowing accurate force measurements[20]. The arrangement of these components
96 is schematized in Figure 1. Initially, the probe is placed close to the surface of the sample. When
97 the distance is small enough for electric dipoles to be induced or for existing dipoles to interact,
98 attractive electric forces between the probe and sample atoms manifest. The attraction increases
99 until it reaches a maximum limit, which occurs when the probe gets very close to the sample.
100 After a certain distance, a repulsive force from the electronic superposition of the atoms of the
101 pair probe/sample starts to act, preventing the spatial superposition of the atoms of these
102 surfaces. Repulsion is a consequence of the Pauli exclusion principle, a physical phenomenon
103 that prevents two electrons from simultaneously occupying the same quantum state.

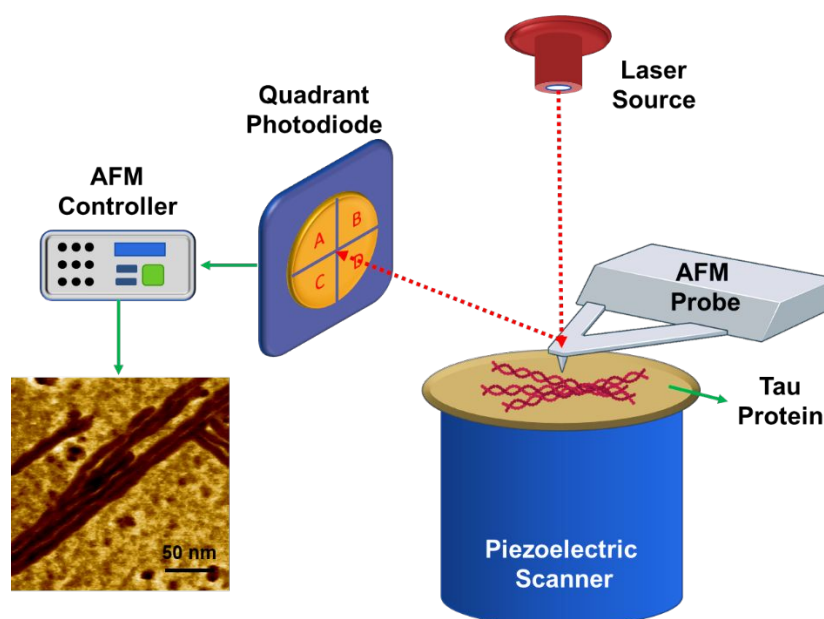


Figure 1: Scheme of operation of an Atomic Force Microscope with its components. The AFM probe scans protein tau fibers with the aid of the piezoelectric scanner. The cantilever deflection detection is evaluated by the reflection of the laser on the back of the cantilever, which is sent to the 4-quadrant detector, identifying horizontal and vertical signal variations. The signals are converted into topographic maps from which the physical properties of the surface are obtained.

Employing the optical detection method, laser reflections are measured in different directions from the reflecting surface at the free end on the back of the cantilever. The tip is attached to the bottom of the cantilever, on the opposite side of the reflecting surface. Under attractive and repulsive forces, the cantilever deforms, changing the angle of the mirrored surface and, consequently, the laser's reflection angle. A detector of four independent photocells captures the laser light, producing a potential difference (PDD) via the photovoltaic effect. Finally, a computer produces an image whose details are proportional to the relative intensity between the four photocells.

AFM operates by measuring the forces between the probe-sample pair. These forces depend on the nature of this pair, the distance between them, the geometry of the tip, and any contamination on the sample's surface. During the scanning process, the atoms at the tip's end interact with those on the sample's surface, immediately below or near it. Since the cantilever works like a spring, the force applied by it obeys Hooke's law: $F = k.d$, where k is the elastic constant of the cantilever and d is its deflection [20].

2.1. AFM Force Curves

The force curve is the main tool for measuring the physical characteristics of surface samples examined by an AFM. Depending on the separation between the tip and the sample,

the pressures may be either attractive or repellent. At a distance, interactions like van der Waals forces are common and produce attractive forces. Short distances between the tip and the sample's electron orbitals overlap, creating repelling forces. [21].

Various information can be obtained from the relationship between the probe-sample distance and the predominant forces at these distances. The force-distance (tip-sample separation) curves obtained through an AFM force spectroscopy measurement evidence the behavior of the tip-sample interaction. Reinforcing this, Figure 2 presents a force curve graph showing the relative motion of the AFM probe for each point on this curve. The horizontal axis shows the separation distance between the probe and the sample. In contrast, the cantilever force is plotted on the vertical axis, and as the probe gets closer to the sample, the distance between them decreases.

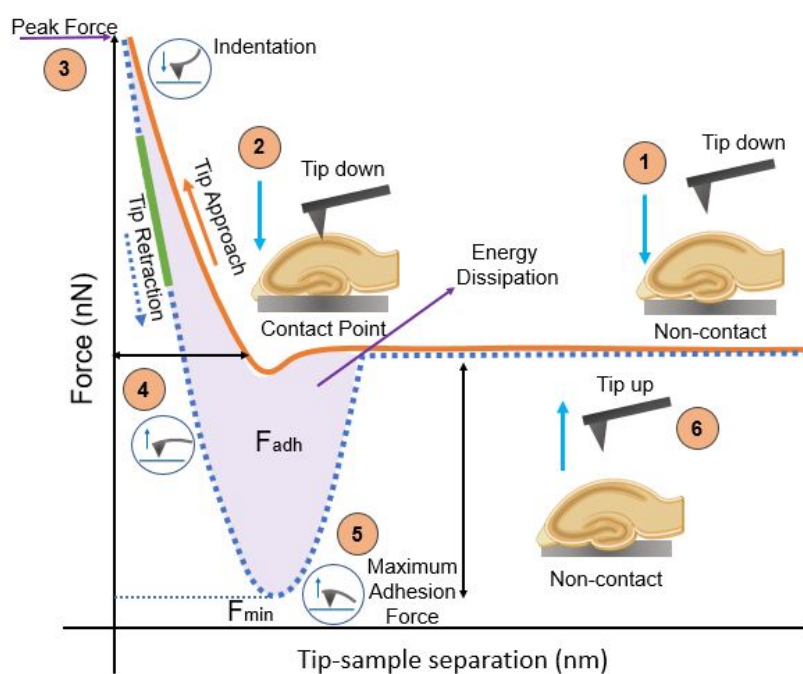


Figure 2: Graphical scheme of a typical curve of force/separation acquired in the hippocampus, showing the approximation curve in orange, and the retraction curve, dotted line in blue. At point 1, the probe is in the non-contact region, approaching the hippocampus. At point 2, contact between the probe and the surface occurs. At point 3, there is the point of peak force, where the probe indents in the hippocampus. From point 4, the probe is moving away from the surface due to the predominance of repulsive forces. At point 5, there is the minimum force point and the maximum adhesion region, where the probe detaches from the hippocampus. The purple region represents hysteresis and is the sum of dissipative and adhesion forces. At point 6 the probe is in the non-contact region, moving away from the surface of the hippocampus.

During the process of acquisition of a force curve, the probe approaches the surface of the sample (orange curve) from a certain distance (ramp size) until reaching the surface of the sample (where the repulsive forces regime starts). From that point, the probe applies a

1
2 153 previously determined force on the sample surface (trigger force), reaching the peak force when
3
4 154 it starts the retraction cycle (blue dotted curve). When the probe retracts from the sample
5
6 155 surface, it eventually encounters resistance to leave it, which induces a deflection of the
7
8 156 cantilever downward (negative force values). This region of negative forces of the force curve
9
10 157 corresponds to the adhesive forces (purple area). The maximum adhesion force corresponds to
11
12 158 the most negative value of force (F_{\min}). From these curves, properties such as elasticity, apparent
13
14 159 viscosity, and adhesion are calculated, providing quantitative maps of these magnitudes. To
15
16 160 investigate the elastic modulus of the force curves, the literature [22-24] considers different
17
18 161 models, such as Hertz, Sneddon, Oliver Phar, or DTM.
19
20 162

21 163 **2.2 AFM in Biological Systems**

22 164 As a crucial instrument in biophysics with many uses, atomic force microscopy (AFM)
23
24 165 enables the analysis of biological systems at the nanoscale and with great resolution. AFM
25
26 166 allows direct imaging and characterization of biological samples, ranging from cells, tissues,
27
28 167 proteins, DNA, and other biomolecules, with nanoscale resolution. This provides insights into
29
30 168 their surface topography, structure, mechanical properties, and other physical properties, which
31
32 169 are critical for understanding their functions and behaviors in biological processes. Moreover,
33
34 170 AFM also enables real-time and in situ studies of biological samples in their native
35
36 171 environments, including in liquid or physiological conditions. This allows the investigation of
37
38 172 dynamic biological processes with a high spatial and temporal resolution, such as cell adhesion,
39
40 173 membrane interactions, protein folding, and molecular recognition. AFM can also be used to
41
42 174 study the effects of external stimuli on biological samples, such as temperature, pH, and
43
44 175 chemical treatments, providing valuable information about their responses and properties. It is
45
46 176 interesting to note that AFM can be used in conjunction with other imaging and spectroscopic
47
48 177 methods to provide supplementary data about biological samples, including fluorescence
49
50 178 microscopy, Raman spectroscopy, and infrared spectroscopy. This fact makes it possible to
51
52 179 correlate the structural, mechanical, and chemical characteristics of biological samples, fully
53
54 180 describing their characteristics and functions.

55 181 AFM has been extensively used in biophysical studies to investigate various biological
56
57 182 processes and phenomena, including cell adhesion, membrane dynamics, protein-protein
58
59 183 interactions, protein folding and unfolding DNA-protein interactions, and many others. AFM-
60
184 derived data can be used to obtain quantitative measurements, such as force-distance curves,
185 stiffness maps, and adhesion forces, which can be used to develop and test biophysical models
186 and theories.

1
2
3 187 In particular, the ability of the AFM to study the surface of biological systems
4 188 operating in liquid media and under physiological conditions is highlighted here. The technique
5
6 189 also allows obtaining data with nanometric resolution, making it possible to study isolated
7
8 190 proteins, for example, with no chemical fixation or labeling [25]. The Atomic Force Microscope
9
10 191 also allows users to change operating modes to study a mechanical property of interest. The
11
12 192 Atomic Force Microscope also allows users to change operating modes to study a mechanical
13
14 193 property of interest. For example, AFM was used to analyze the Young's modulus of various
15
16 194 cells.[26-29].

16 195 Still, in this sense, the rigidity of tumor cells in the breast and surrounding tissues were
17
18 196 analyzed to understand the cellular and tissue mechanics of cancerous tissues [30]. This study
19
20 197 concluded that tumor tissues are much more rigid than isolated tumor cells. This fact highlights
21
22 198 the potential of AFM to investigate diseases from a biophysical point of view. Additionally in
23
24 199 this field of research, Tang et al. [31] used AFM to examine the nanobiomechanical
25
26 200 characteristics of prostate tumor tissues. The scientists established that when the degree of
27
28 201 pathology increases, the tissues' elasticity and viscosity diminish. This work demonstrates how
29
30 202 a parameter for the clinical differentiation and diagnosis of tumor tissue can be obtained by
31
32 203 using AFM to investigate the biomechanical characteristics of unhealthy tissues.

32 204 An essential objective of biomedical research is the early diagnosis of human diseases.
33
34 205 There is an increase in diagnostic research using molecular detection techniques based on
35
36 206 nanotechnology. AFM is a desirable tool in this area because it allows for the detection of
37
38 207 molecules with extreme sensitivity, aiding in the diagnosis and comprehension of the
39
40 208 pathogenesis of the disease.

40 209 As exemplifying the above, it is known that the laboratory diagnosis of Dengue by
41
42 210 serological and virological tests is expensive, requires several days for incubation, and still
43
44 211 presents several cross-reactions (*e. g.* Covid-19 and Zika virus), leading to false-positive or -
45
46 212 negative results [32-34]. Taking this into account, researchers manufactured a device from an
47
48 213 array of piezoresistive silicon nanowires (SiNWs) for the detection of DNA oligomers of the
49
50 214 Dengue virus using the Local Anodic Oxidation of the Atomic Force Microscope (AFM-LAO)
51
52 215 technique [35]. In this study, the authors investigated the influence of surface roughness on the
53
54 216 sensitivity of devices.

54 217 SiNWs with varying surface dimensions were created by devices that were etched with
55
56 218 various isopropyl alcohol concentrations. For the purpose of testing Dengue DNA, SiNWs were
57
58 219 next functionalized using glutaraldehyde, peptide nucleic acid (PNA), and (3-
59
60 220 Aminopropyl)triethoxysilane (APTES). According to the findings, the SiNW device that is
221
222 221 most susceptible to Dengue DNA has the smoothest surface and is least vulnerable to attack

1
2 222 from adding 10 vol percent IPA. This outcome demonstrates the AFM's potential as a quicker
3 and earlier diagnostic tool than conventional techniques.
4

5
6 224 Recent applications in biomedicine also involve using AFM to study the architecture
7 and dynamics of the bacterial envelope on a microscopic scale. The technique was used by
8 225 Viljoen, Foster, Fantner, Hobbs, and Dufrêne [36] in the study of isolated membranes and living
9 226 cells under physiological conditions, tracking in vitro the response to growth or drugs with
10 227 potential pharmacological application, observing the structural dynamics of the surface in
11 228 analysis.
12 229

13
14 230 AFM has also been employed for immunotherapy and the detection of cancer cells, as
15 231 demonstrated by Kristi et al. [37]. It is intended to demonstrate biological and chemical
16 232 viewpoints to demonstrate which molecular substrates are related to the immune system and
17 233 which may be able to eradicate cancer cells. Due to its versatility, the AFM can be utilized for
18 234 the aforementioned purpose and can quantify the mechanical properties of a sample with
19 235 nanometric accuracy.
20 236

21 237 Regarding brain tissue studies, experiments with AFM in hippocampus neurons show
22 238 that the mechanical properties of the actin-spectrin network are associated with the detection of
23 239 mechanical signals and protection against impacts. Furthermore, it was observed that peripheral
24 240 neurons are more resistant to mechanical trauma than central neurons [38].
25 241

26 242 AFM is a powerful biophysical tool that enables high-resolution imaging,
27 243 characterization, manipulation, and spectroscopy of biological samples at the nanoscale,
28 244 providing valuable insights into their properties, functions, and interactions. It has
29 245 revolutionized our understanding of biological systems and has applications in various fields,
30 246 including cell biology, molecular biology, biochemistry, biophysics, and nanomedicine. Thus,
31 247 we now focus on recent studies in which the AFM was used as the main technique to investigate
32 248 tauopathies.
33 249

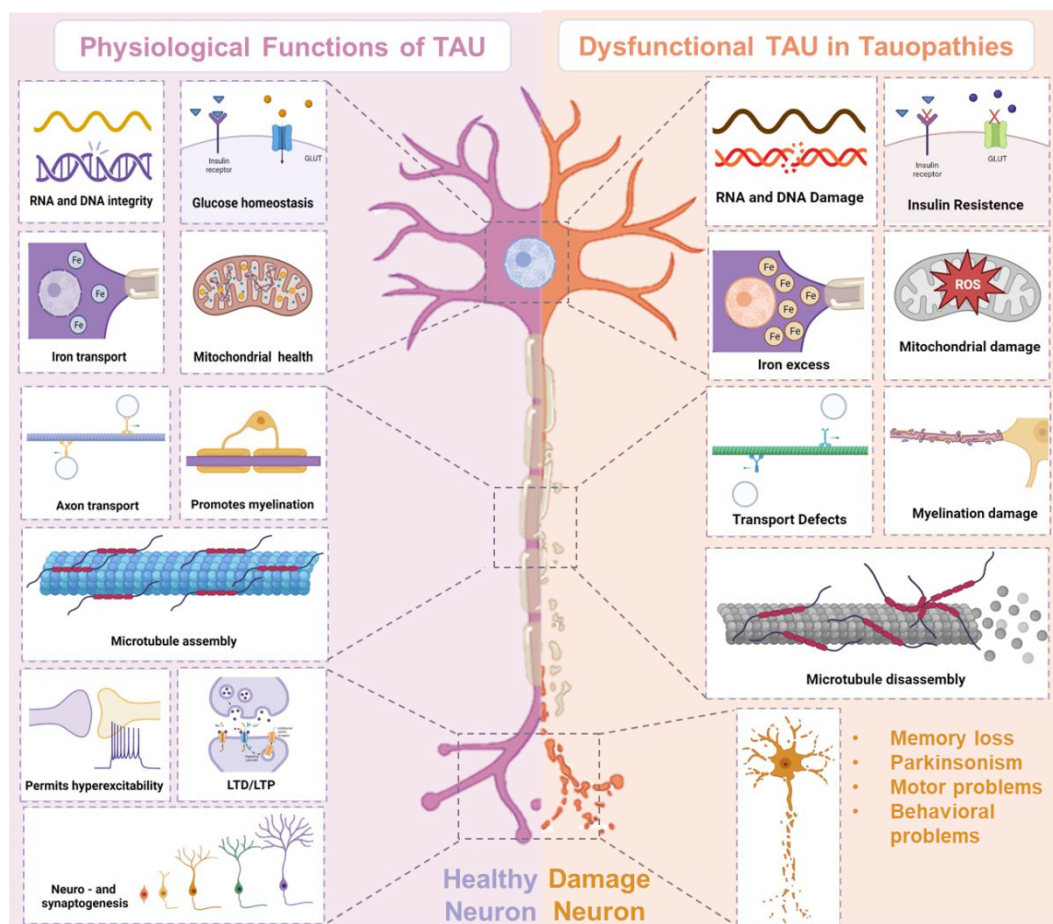
34 250 35 251 36 252 37 253 38 254 39 255 40 256 41 257 42 258 43 259 44 260 45 261 46 262 47 263 48 264 49 265 50 266 51 267 52 268 53 269 54 270 55 271 56 272 57 273 58 274 59 275 60 276

50 250
51 251
52 252
53 253
54 254
55 255
56 256
57 257
58 258
59 259
60 260

51 250 When Dr. Alois Alzheimer first described a series of morphological alterations and the
52 251 existence of two abnormal structures at the cortical level in an elderly woman with progressive
53 252 dementia more than a century ago, it marked the beginning of the research of tauopathies [39].
54 253 Later, these structures were referred to as neurofibrillary tangles and senile plaques (SP) (NFT).
55 254 As a result, research on NFT was expanded. Nearly 80 years later, it was determined that these
56 255 tangles were made up of clusters of coupled tau protein helical filaments that had undergone
57 256
58 257
59 258
60 259

256 hyperphosphorylation [40, 41]. Nowadays, it is known that several diseases are associated with
 257 the presence of these aberrant findings and are grouped as tauopathies.

258 Tau protein is encoded by the microtubule-associated protein tau (MAPT) gene in six
 259 isoforms with the presence of three or four microtubule-binding domains (MTBDs), which are
 260 essential for microtubule binding and determinants for their classification as 3R Tau or 4R Tau,
 261 respectively [42]. Initially, Tau was identified as an axonal microtubule-associated protein.
 262 However, many new physiological functions in different cellular compartments were
 263 discovered later. Regarding microtubules, Tau is pivotal for the assembly and stability of their
 264 bundle [14], regulation of axonal transport [43, 44], and protection from cleavage [45].
 265 Concerning synaptic activity, Tau acts on long-term potentiation and depression [46, 47],
 266 regulation of neuronal hyperexcitability [48], neuro- and synaptogenesis [49], and last but not
 267 least, learning and memory [46, 50]. Besides, Tau also plays a role in the myelination process
 268 [51], mitochondrial health [52], the integrity of genomic DNA and cytoplasmic and nuclear
 269 RNA [53, 54], regulation of iron transport [55], glucose homeostasis in neurons [55], control
 270 of anxiety and insomnia [56] and motor function [57]. The mentioned functions are schematized
 271 in Figure 3, and for more details, read Kent's review [58].



272

273 **Figure 3.** Physiological roles of Tau in the nervous system and dysfunctional Tau in tauopathies.

274

1
2
3 275 As aforementioned, tauopathies encompass approximately 26 different types of
4 276 neurodegenerative disorders similar to each other by accumulating highly-phosphorylated form
5
6 277 of the microtubule-associated protein tau in neurons and glia, leading to neurotoxicity followed
7
8 278 by dementia, Parkinsonism, and behavioral changes [59]. The profile of these domains
9
10 279 primarily divides them into 3R- (for example, Pick's disease), 4R- (for example, progressive
11
12 280 supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and argyrophilic grain disease), or mixed 3R/4R-
13
14 281 tauopathy (for example, Alzheimer's and Huntington's diseases, frontotemporal dementia, and
15
16 282 parkinsonism 17) types. [60]. Similar quantities of 3R and 4R Tau can be found in the adult
17
18 283 brain in a healthy state, but this ratio is frequently changed in neurodegeneration [61].
19
20 284 Tauopathies readily stand out as the most common neurodegenerative disorders worldwide
21
22 285 when aggregated, despite the lack of precise surveys. In fact, about 416 million individuals, or
23
24 286 22% of all people over 50 worldwide, are affected by Alzheimer's disease alone [62].

25
26 287 The understanding of genesis of neurodegeneration, mediated by unstable Tau in
27
28 288 tauopathies, is still not fully explained. Notwithstanding, in some cases, the Tau aggregation
29
30 289 seems to be related to mutations of the MAPT gene (*e.g.*, frontotemporal dementia with
31
32 290 Parkinsonism 17). Still, tauopathies are often multifactorial disorders (*e.g.*, Alzheimer's disease)
33
34 291 with multiple genes and environmental factors responsible for their genesis. Regardless of the
35
36 292 cause, there is a consensus that the Tau hyperphosphorylation and formation of NFTs act as a
37
38 293 turning point for the onset of cognitive and motor symptoms [63]. Tau might first misfold in
39
40 294 tauopathies, becoming an excellent target substrate for kinase enzymes and a poor one for
41
42 295 phosphatases. These interactions can result in Tau hyperphosphorylation and detachment from
43
44 296 microtubules [64]. Although the phosphorylation process is primarily important for tau
45
46 297 aggregation, various post-translational alterations, including acetylation, glycation,
47
48 298 glycosylation with O-linked N acetylglucosamine (O-GlcNAcylation), ubiquitination, and
49
50 299 truncation, have also been reported [65–69].

51
52 300 After these alteration processes, the physiological functions of Tau are lost, resulting
53
54 301 in cellular damages such as loss of microtubule dynamics and cleavage, "traffic jam" of axonal
55
56 302 transport proteins, inability to propagate action potentials in neurons, loss of plasticity and early
57
58 303 neuronal death, demyelination, oxidative stress, toxic accumulation of iron in the cytoplasm
59
60 304 and central insulin resistance. These factors progressively result in learning and memory losses,
305
306 behavioral changes, and Parkinsonism [58], as shown in Figure 3.

307
308 Anterograde amnesia, bradykinesia, ophthalmoplegia, symmetric or axial rigidity,
309
310 aphasia, social disinhibition, compulsive behavior, apathy, impairment of sensory functions,
and cortical atrophy are among the most common cognitive, motor, and behavioral and
neurological symptoms among tauopathies [60]. Noteworthy, tauopathies characterized by

1
2
3 310 isolated NFTs seem to lead to greater motor damage and, more mildly, to cognitive losses. In
4 311 contrast, the association of NFTs with senile plaques seems to decrease motor damage but, on
5
6 312 the other hand, considerably worsen cognitive impairment [61].

7
8 313 In Alzheimer's disease, marked by amyloid deposits and tau aggregates in the brain, it
9
10 314 is known that NFTs appear earlier than senile plaques, being responsible for triggering cognitive
11 315 losses in individuals who are not yet elderly (in some cases, patients up to 30 years old).

12
13 316 NFTs begin to build up in the locus coeruleus and then progress to the entorhinal cortex
14 317 before spreading to other parts of the brain. The so-called Braak stages of tauopathies, ranging
15 318 from 1 to 6, are based on this pattern. Stages 1 to 2 are known as the prodromal phase, which
16 319 is characterized by mild but noticeable cognitive (episodic memory) and functional
17 320 impairments; stages 3 to 4 are known as the moderate stages, which are characterized by
18 321 behavior changes; and stages 5 to 6 are known as the severe stages, which are characterized by
19 322 severe cognitive impairment, depersonalization, and death as due to motor weakness. [70].

20
21 323 Even with all these findings and intracellular changes promoted directly or indirectly
22 324 by damage to the tau protein, knowledge about ultrastructural changes in neuronal cells with
23 325 tauopathies is still incipient. AFM and mapping techniques acquire significant prominence to
24 326 illuminate this obscure field.

25
26
27
28
29
30
31
32 327

33 328 **4. AFM IN TAUOPATHIES**

34
35 329 Studying intrinsically disordered proteins (IDPs) connected to diseases can teach us
36
37 330 new things about the molecular processes that result in structural changes in these proteins
38 331 following brain injury. Perini et al. [71] used AFM to examine the biomechanical characteristics
39 332 of neurons cultured with tau26-44 and its reverse counterpart in order to achieve this goal. The
40 333 study's demonstration that brain plasticity occurs before obvious cell damage plays a role in
41 334 degenerative alterations was a significant finding. With neurons cultured for a short period of
42 335 time (up to 4 hours) with non-lethal species, this was confirmed. The authors hypothesized that
43 336 tau26-44 initially modifies plasmatic membrane elasticity by altering the cell surface shape.
44 337 After its ion is adsorbed on the outer surface of the neuronal membrane, this process starts.

45
46 338 As a result, this might cause neuronal "death" signaling to be transduced. This peptide
47 339 is not collected or interiorized by neurons until much later (up to 48 hours), causing alterations
48 340 in intracellular elements that result in synaptic loss, neurite retraction, and mitochondrial deficit.
49 341 These findings may contribute to the understanding of the neurotoxic mechanisms involved in
50 342 the development of a variety of human degenerative tauopathies, which are mediated by one of
51 343 the most pathologically significant secreted tau protein species.

1
2 344 Menal et al. conducted another important work using AFM and were interested in
3
4 345 studying the mechanical properties of the brain, such as rigidity. They discovered that
5
6 346 Alzheimer's disease decreased the stiffness of brain tissue in mice under normoxia (RA) and
7
8 347 hypoxic conditions (HI). The mice used in this study were 6 to 8 months old, and the animal
9
10 348 model for AD is characterized by the development of cerebral amyloid plaques and the presence
11
12 349 of neurocognitive deficits. The results showed that the tissue from the control sample was softer
13
14 350 than that from the AD sample (not altered by the IH exposures). In normoxia, the Young's
15
16 351 Modulus (E) was 402 97 Pa for the AD sample and 651 138 Pa for the control sample. Following
17
18 352 hypoxic exposures, E for AD and control was 316 78 Pa and 637 115 Pa, respectively. [72],

19 353 The edema, as determined by the rise in cortical weight and demyelination, was
20
21 354 responsible for the decline in Young's modulus in the DA sample. According to the findings of
22
23 355 this study, the altered mechanical characteristics of brains with AD can be explained by
24
25 356 increased water content and decreased myelin. Thus, the authors emphasized that a tissue's
26
27 357 stiffness is decreased when its water content is increased. Additionally, the demyelination seen
28
29 358 in AD-affected brains, which is a hallmark of this illness, adds to the decrease in tissue stiffness.

30 359 Studies by Park et al. explored the viscoelastic properties of human brain tissue using
31
32 360 nanoindentation to find potential biomarkers for Alzheimer's disease. The researchers found
33
34 361 that the AD-affected brain tissue displayed bigger orifices with an irregular distribution in
35
36 362 contrast to healthy tissue. The results are in line with the neuropathological criteria for
37
38 363 diagnosing AD, which state that AD-affected brain tissues have ruptured neuropil [73]. This
39
40 364 fact served as the driving force behind the investigation of surface roughness in both tissues,
41
42 365 which was carried out by computing the average of the deviations in the surface height, which
43
44 366 in turn were measured from the mean plane of the tissue samples (also called mean roughness
45
46 367 - Ra). Normal brain tissue had a Ra value of 256 78 nm, while AD-affected brain tissue had a
47
48 368 Ra value of 367 102 nm, showing that AD-affected brain tissue has a rougher surface as
49
50 369 compared to the normal one.

51 370 In this same study of nanoindentation experiment, 1,200 indentations were made in 20
52
53 371 target locations in both gray and white matter for each sample, using 6 distinct loading
54
55 372 frequencies for each target region for 10 people. It is notable that when a higher charge
56
57 373 frequency is applied, brain tissues act like a more rigid material. One of the well-known
58
59 374 qualities of soft surfaces is this. Additionally, compared to healthy brain tissues, AD-affected
60
375 brain tissues had mild preload slopes and increased sinusoidal loading hysteresis. Consequently,
376 it can be inferred that there was greater energy lost during the cycle. This finding demonstrates
377 that, compared to healthy brain tissues, AD-affected brain tissues have a more viscous reaction
378 when exposed to lower loading frequencies.

1
2
3 379 Alzheimer's patients frequently have the, $A\beta_{1-42}$ protein in their brains, which is
4 380 particularly damaging to nerve cells. In order to comprehend the associated neurotoxicity of
5 your presence, Gao et al. [74] employed AFM to monitor changes in cell dynamics under $A\beta_{1-42}$
6 381 induced toxicity. Human neuroblastoma cells (SH-SY5H) were treated with various doses
7 382 of the oligomer $A\beta_{1-42}$. Young's modulus was utilized to analyze how cells behaved when $A\beta_{1-42}$
8 383 was present. The authors' key conclusion is that there are two stages in the dynamics of cell
9 384 mechanics during neurodegeneration.
10 385

11 386 E values (Young's modulus) increased quickly at least in the initial stage, which was
12 387 accompanied by alterations in surface tension, actin polymerization, and osmotic pressure for
13 388 the treated cells. Following that, the cells were exposed to $A\beta_{1-42}$ at a high concentration.
14 389 Gradually, Young's modulus dropped. The breakdown of microtubules was principally
15 390 responsible for this second stage. This work demonstrated that monitoring modifications in
16 391 cellular dynamics could provide a more thorough understanding of the neurodegeneration of
17 392 cells treated with the oligomer $A\beta_{1-42}$.

18 393 Parkinsonism, the second most prevalent neurodegenerative illness, is also categorized
19 394 as a tauopathy. The onset of this condition is linked to the presynaptic protein -synuclein (-syn),
20 395 which is fundamentally disordered. Even though additional proteins are implicated in PD,
21 396 research on these proteins can aid in understanding the genesis of PD in a number of ways [75].
22 397 Lewy bodies, which are pathological brain lesions made of self-assembling α -syn, are linked
23 398 to PD. High-Speed Atomic Force Microscopy was used by Zhang et al. [76] to examine the
24 399 structural flexibility of -synuclein in an aqueous solution environment (HS-AFM). The authors
25 400 of this work discovered that the -syn monomer adopts a globular shape and can quickly produce
26 401 protrusions that resemble tails. The monomer starts out in a globular conformation (0 s) and
27 402 changes into extended, two-tailed, and tail conformations over time (13.8 s, 26.0 s, 33.6 s, and
28 403 125.6 s) (130.4 s and 136.6 s). It is also remarkable that the monomer can intercalate with the
29 404 other conformations and then revert to its original globular state (16.8 s and 100.2 s). The
30 405 pathophysiology of Parkinson's disease is still unknown. Thus studies employing -syn
31 406 characterization may aid in the search for answers. They may also point researchers to the right
32 407 approach as they consider how to cure this tauopathy.

33 408 Along with -synuclein, Lewy bodies of people with Parkinson's disease and amyloid
34 409 plaques in AD include an OTU family deubiquitinating enzyme. OTU deubiquitinase ubiquitin
35 410 aldehyde-binding 1 (OTUB1) is an agent that lessens the death of neuronal cells after
36 411 intracerebral hemorrhage, according to investigations by Xie, Li, Shen, Cao, Ning, Yuan, Ji,
37 412 Wang, and Ke [77]. Additionally, OTUB1 directly affects the buildup of Tau and

1
2
3 413 phosphorylated Tau. Thus, the fact that it is present in the brain shows that it is essential to the
4 414 proper functioning of neurons. Its inclusion in Lewy bodies and connection to the Tau protein
5
6 415 also support the idea that it played a significant role in the development of neurodegenerative
7
8 416 disorders. In order to examine OTUB1 and its interaction with brain cells using AFM, Kumari
9
10 417 et al. [78] pursued this goal.

11 418 The fact that the OTUB1 oligomer has an annular ring-like structure was confirmed
12
13 419 by the researchers using the AFM technique. OTUB1 initially generates oligomeric species of
14
15 420 specific geometry that later change into fibers that resemble amyloid. This finding is significant
16
17 421 because amyloidogenic proteins accumulate in cells during neurodegenerative diseases, altering
18
19 422 the cytoskeleton. When OTUB1 oligomeric was applied to neuronal cells, the roughness of the
20
21 423 membrane was reported to be impaired. This revealed that OTUB1 oligomers had an effect on
22
23 424 the cytoskeleton of neuronal cells in a manner similar to other oligomeric amyloid proteins. As
24
25 425 a result, OTUB1's unique molecular structure amplifies neuronal toxicity, cytoskeletal
26
27 426 disruption, rapid ROS release, and mitochondrial damage.

28 427 The scientists' confirmation using the AFM technique that OTUB1 initially produces
29
30 428 oligomeric species of specific geometry that subsequently transform into amyloid-like fibers
31
32 429 supported the observation that the OTUB1 oligomer has an annular ring-like structure. This
33
34 430 observation is noteworthy because neurodegenerative illnesses alter the cytoskeleton as a result
35
36 431 of the accumulation of amyloidogenic proteins in cells. Neuronal cells were treated with
37
38 432 OTUB1 oligomeric, and they observed impairment of membrane surface roughness. This
39
40 433 suggested that, like other oligomeric amyloid proteins, OTUB1 oligomers also have an impact
41
42 434 on the cytoskeleton of neuronal cells. The unusual molecular structure of OTUB1 enhances
43
44 435 neuronal toxicity, cytoskeletal disruption, fast ROS release, and mitochondrial damage, in
45
46 436 conclusion.

47 437 Therefore, Maeda et al. [79] speculated that FTDP-17 mutations would encourage Tau
48
49 438 oligomer formation. They used both in vitro and in vivo testing techniques to use AFM to
50
51 439 evaluate tau aggregation in FTDP-17 mutations. This research shows that FTDP-17 mutations
52
53 440 encourage the production of Tau oligomers and that P301L tau oligomers form smaller
54
55 441 oligomers than the other oligomers. These findings suggested that Tau's oligomeric form may
56
57 442 be a mechanism via which FTDP-17 mutations induce neurodegeneration. They further claim
58
59 443 that a specific mutation, P301L, increases the synthesis of Tau oligomers by reducing the
60
61 444 amount of Tau that must be present in each particle. These findings support other studies
62
63 445 showing toxic Tau intermediate structures but not the filaments themselves.

64 446 The different oligomer sizes for aggregation and the quantity of Tau molecules
65
66 447 incorporated into the oligomers can be explained by the shorter sequences. According to the

448 authors, tau aggregations vary between tauopathies. The fact that the clusters of P301L and
 449 other mutations are distinct makes sense. This is important because the P301L mutation is not
 450 the cause of AD but rather other tauopathies. The scientists then showed that FTDP-17-linked
 451 Tau mutations promote the creation of Tau oligomers, supporting the idea that these mutations
 452 are essential for the onset of this tauopathy. This research also demonstrated that P301L tau and
 453 other tau constructs produced a variety of oligomers, indicating the potential need for varied
 454 strategies to stop Tau aggregation in different tauopathies.

455 Table 1 summarizes the use of atomic force microscopy techniques in the study of
 456 tauopathies and the results found in the literature over the last ten years, serving as a quick
 457 guide for investigations in tauopathies using AFM techniques. It also shows the operating
 458 modes used in each research and details about the scanning environment, probe used, and the
 459 approach used to obtain the results.

460

461 Table 1. Table showing research results from the last five years using the AFM technique in the study
 462 of tauopathies. Operation modes, probe specifications, the approach, and the main results obtained are presented.

OPERATION MODE	APPROACH	RESULTS	REFERENCE
Utilizing silicon cantilevers with a nominal spring constant of 0.05 N/m and a tip ratio of 10nm, the experiments were carried out in a liquid environment.	The experiments involved silicon cantilevers with a nominal spring constant of 0.05 N/m and a tip ratio of 10nm that were used in a liquid environment..	-The greater hardness of the axon about the cellular soma. -Neuronal axons become more rigid after incubation with tau26-44 in vitro.	[71]
Samples were examined in the open air at a constant temperature of 37°C. A gold-coated silicon nitride cantilever with a notional spring constant of 0.01 N/m was used to measure the force curves.	Characterization of brain tissue stiffness in mice induced by Alzheimer's disease compared to wild-type mice under normoxia (RA) and hypoxia (HI) conditions.	- Oxidative stress caused by obstructive sleep apnea (OSA) does not cause changes in the stiffness of the cerebral cortex of rats affected with AD.	[72]
At a regulated temperature of 37°C, samples were examined in the open air. Using a gold-coated silicon nitride cantilever with a notional spring constant of 0.01 N/m, the force curves were observed.	Investigation of the viscoelastic properties of human brain tissue in AD using nanoindentation	- Brain tissue affected by AD showed enlarged holes and irregular distribution. - AD brain tissue has a rough surface than control brain tissue. - Brain tissues behave like a more rigid material when applying a higher frequency load. - Compared to healthy brain tissues, AD-affected tissues are more dense at lower loading frequencies.	[73]
In order to capture images of brain cells and conduct nanoindentation experiments, the experiment was carried out	Monitoring dynamic changes in neural cells mechanics under drug-induced toxicity by Beta-amyloid ($A\beta_{1-42}$)	- Young's modulus of cells incubated with $A\beta_{1-42}$ increased in the first few hours.	[74]

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	in QNM mode in an environment with air. A silicon cantilever probe with a nominal spring constant of 2 N/m was employed for the analysis in air. A probe with a silicon nitride cantilever and a nominal spring constant of 0.7 N/m was employed for liquid analysis.		- Young's modulus gradually decreased, mainly attributed to microtubule disassembly.
14 15 16 17 18 19 20 21 22 23	Samples were analyzed in high-speed AFM mode (HS AFM) using probes with spring constants between 0.1 and 0.2 N/m and resonance frequency between 400-700 kHz. 50 x 50 nm scans were performed with 128 x 128 pixels resolution.	Study the structural flexibility of α -synuclein associated with Parkinson's Disease in an aqueous solution environment.	-The spherical shape of the α -syn monomer allows it to produce tail-like bumps in seconds. -A globular monomer can adopt a fully expanded conformation. [76]
24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40	Using a probe with a silicon cantilever with a resonance frequency between 300-320 kHz and a spring constant between 13-70 N/m, morphological information on the OTUB1 protein was collected in tapping mode. Scans were carried out in contact mode for cell analysis utilizing a silicon cantilever probe that was coated in gold and had a nominal spring constant of 0.1 N/m.	Study of OTUB1 and its interaction with neural cells in Parkinson's Disease	- OTUB1 initially generates oligomeric species with a certain shape, which later develop into fibers resembling amyloid. - Impairment of membrane surface roughness in neuronal cells treated with OTUB1 oligomers. [78]
41 42 43 44 45 46 47 48 49	Utilizing cantilevered probes with a spring constant of 0.2 N/m, a resonance frequency of 9 kHz, and a tip radius of 20 nm, the experiment was carried out in tapping mode in an aquatic environment.	In vitro and in vivo testing of frontotemporal disease FTDP-17 mutations for tau aggregation.	- FTDP-17 mutations increase the formation of Tau oligomers. [79] - P301L tau oligomers form smaller oligomers than the others.

463

464 **5 CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES**

465 In this paper, we review AFM applications in biological systems, more specifically, in
466 the study of tauopathies, showing the application of this technique as an effective method of
467 diagnosis and elucidation of the genesis of some neurodegenerative diseases. Because of this,
468 it is noteworthy that the development of the AFM brought new possibilities for studying
469 biological systems at the nanoscale. Its ability to obtain three-dimensional topographies with

1
2
3 470 high atomic resolution has become an indispensable technique when considering nanoscience
4 471 and nanotechnology.

5
6 472 It was underlined that AFM could identify Young's modulus and the magnetic or
7 473 electrostatic properties of surfaces, as well as fresh information on the adhesion and viscoelastic
8 474 surface properties of many systems. AFM can also examine any sample in any medium. The
9 475 AFM is a special instrument for assessing cell, tissue, and membrane surfaces, for instance, at
10 476 the nanoscale, thanks to all these features. As a result, it opens up new avenues for research into
11 477 various domains, including the study of tauopathies.

12
13 478 This review shows how this powerful microscopy technique was used in the study of
14 479 isolated neural cells, before and after interaction with tau protein, in brain tissues of Alzheimer's
15 480 and Parkinson's Disease, among other studies. Understanding the additional functions of Tau is
16 481 essential to elucidate the genesis of tauopathies, but it is also necessary to determine the most
17 482 appropriate therapeutic strategy. Therefore, it is necessary to devote more attention to this class
18 483 of diseases.

19 484 Furthermore, it is noted that it is also necessary to turn attention to other tauopathies,
20 485 although the number of incidences is lower. It became clear that the AFM technique can help
21 486 in many ways when dealing with biological materials associated with various diseases.
22 487 Therefore, extending this technique to other applications in tauopathies is important since there
23 488 is still little in the literature seeking other ways to unite the knowledge already acquired so far.
24 489

25
26 490 **Funding:** This study was funded by CAPES Financial Code 001, FAPEMA, Projeto
27 491 UNIVERSAL-06929/22, Bolsa de Produtividade CNPq, Luciana Magalhães Rebelo Alencar -
28 492 304774/2021-9.

29 493 **Acknowledgments:** This study was funded by CAPES Financial Code 001,
30 494 FAPEMA, Projeto UNIVERSAL-06929/22, Bolsa de Produtividade CNPq, Luciana
31 495 Magalhães Rebelo Alencar - 304774/2021-9, FAPESP (2017/26131-5).

32 496 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.
33 497

34 498 REFERENCES

35 499 [1] K. Bian, C. Gerber, A.J. Heinrich, D.J. Müller, S. Scheuring, Y. Jiang, Scanning probe microscopy,
36 500 Nature Reviews Methods Primers, 1 (2021) 36.

37 501
38 502 [2] M. Marrese, V. Guarino, L. Ambrosio, Atomic force microscopy: a powerful tool to address scaffold
39 503 design in tissue engineering, Journal of functional biomaterials, 8 (2017) 7.

40 504

- 1
2
3 505 [3] S. Kasas, G. Dietler, Probing nanomechanical properties from biomolecules to living cells, *Pflügers*
4 506 *Archiv-European Journal of Physiology*, 456 (2008) 13-27.
5 507
6 508 [4] J.A. Last, P. Russell, P.F. Nealey, C.J. Murphy, The applications of atomic force microscopy to vision
7 509 science, *Investigative ophthalmology & visual science*, 51 (2010) 6083-6094.
8
9 510
10 511 [5] K.-C. Chang, Y.-W. Chiang, C.-H. Yang, J.-W. Liou, Atomic force microscopy in biology and
11 512 biomedicine, *Tzu Chi Medical Journal*, 24 (2012) 162-169.
12
13 513
14 514 [6] M.S.N. Amorim, J.A. Batista, F.M. Junior, A. Fontes, R.S.-. Oliveira, L.M.R. Alencar, New Insights into
15 515 Hemolytic Anemias: Ultrastructural and Nanomechanical Investigation of Red Blood Cells Showed Early
16 516 Morphological Changes, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 18 (2022) 405-421.
17
18 517
19 518 [7] J.F.S. Diniz Filho, A.O.d.S. de Barros, M.S.O. Pijeira, E. Ricci-Junior, V. Midlej, M.P.M.A. Baroni, C.C.
20 519 Dos Santos, L.M.R. Alencar, R. Santos-Oliveira, Ultrastructural Analysis of Cancer Cells Treated with the
21 520 Radiopharmaceutical Radium Dichloride (^{223}Ra) RaCl_2): Understanding the Effect on Cell Structure,
22 521 *Cells*, 12 (2023) 451.
23
24 522
25 523 [8] M.L.A. Dorneles, R. Cardoso-Lima, P.F.N. Souza, D. Santoro Rosa, T.M. Magne, R. Santos-Oliveira,
26 524 L.M.R. Alencar, Zika Virus (ZIKV): A New Perspective on the Nanomechanical and Structural Properties,
27 525 *Viruses*, 14 (2022) 1727.
28
29 526
30 527 [9] E.R.D. Rates, C.D. Almeida, E.d.P.F. Costa, R.J.d.M. Farias, R. Santos-Oliveira, L.M.R. Alencar, Layer-
31 528 by-Layer Investigation of Ultrastructures and Biomechanics of Human Cornea, *International Journal of*
32 529 *Molecular Sciences*, 23 (2022) 7833.
33
34 530
35 531 [10] Y. Zhang, K.-M. Wu, L. Yang, Q. Dong, J.-T. Yu, Tauopathies: New perspectives and challenges,
36 532 *Molecular Neurodegeneration*, 17 (2022) 28.
37
38 533
39 534 [11] A.A. Tahami Monfared, M.J. Byrnes, L.A. White, Q. Zhang, Alzheimer's disease: epidemiology and
40 535 clinical progression, *Neurology and therapy*, 11 (2022) 553-569.
41
42 536
43 537 [12] P. LoPresti, S. Szuchet, S.C. Papasozomenos, R.P. Zinkowski, L. Binder, Functional implications for
44 538 the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes, *Proceedings of the National*
45 539 *Academy of Sciences*, 92 (1995) 10369-10373.
46
47 540
48 541 [13] K. Yamada, J.K. Holth, F. Liao, F.R. Stewart, T.E. Mahan, H. Jiang, J.R. Cirrito, T.K. Patel, K.
49 542 Hochgräfe, E.-M. Mandelkow, Neuronal activity regulates extracellular Tau in vivo, *Journal of*
50 543 *Experimental Medicine*, 211 (2014) 387-393.
51
52 544
53 545 [14] E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary
54 546 degeneration, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2 (2012) a006247.
55
56 547
57 548 [15] P. Barbier, O. Zejneli, M. Martinho, A. Lasorsa, V. Belle, C. Smet-Nocca, P.O. Tsvetkov, F. Devred,
58 549 I. Landrieu, Role of Tau as a microtubule-associated protein: structural and functional aspects,
59 550 *Frontiers in aging neuroscience*, 11 (2019) 204.

- 1
2 551
3
4 552 [16] J. Knops, K. Kosik, G. Lee, J. Pardee, L. Cohen-Gould, L. McConlogue, Overexpression of Tau in a
5 553 nonneuronal cell induces long cellular processes, *The Journal of Cell Biology*, 114 (1991) 725-733.
6 554
7
8 555 [17] K. Stamer, R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow, E.-M. Mandelkow, Tau blocks traffic of organelles,
9 556 neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress, *The Journal of cell biology*,
10 557 156 (2002) 1051-1063.
11 558
12
13 559 [18] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy,
14 560 *Physical Review Letters*, 49 (1982) 57-61.
15 561
16
17 562 [19] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters*, 56 (1986) 930-
18 563 933.
19 564
20
21 565 [20] D. Sarid, R. Coratger, F. Ajustron, J. Beauvillain, Scanning force microscopy-with applications to
22 566 electric, magnetic and atomic forces, *Microscopy Microanalysis Microstructures*, 2 (1991) 649-649.
23 567
24
25 568 [21] A. Bergmann, D. Feigl, D. Kuhn, M. Schaupp, G. Quast, K. Busch, L. Eichner, J. Schumacher, A low-
26 569 cost AFM setup with an interferometer for undergraduates and secondary-school students, *European*
27 570 *Journal of Physics*, 34 (2013) 901.
28
29 571
30 572 [22] P. Hermanowicz, Determination of Young's modulus of samples of arbitrary thickness from force
31 573 distance curves: numerical investigations and simple approximate formulae, *International Journal of*
32 574 *Mechanical Sciences*, 193 (2021) 106138.
33
34 575
35 576 [23] E.K. Dimitriadis, F. Horkay, J. Maresca, B. Kachar, R.S. Chadwick, Determination of elastic moduli
36 577 of thin layers of soft material using the atomic force microscope, *Biophysical journal*, 82 (2002) 2798-
37 578 2810.
38
39 579
40 580 [24] M.E. Dokukin, I. Sokolov, Quantitative mapping of the elastic modulus of soft materials with
41 581 *HarmoniX* and *PeakForce QNM* AFM modes, *Langmuir*, 28 (2012) 16060-16071.
42
43 582
44 583 [25] Z. Yang, D. Tang, J. Hu, M. Tang, M. Zhang, H.L. Cui, L. Wang, C. Chang, C. Fan, J. Li, Near-Field
45 584 *Nanoscopic Terahertz Imaging of Single Proteins*, *Small*, 17 (2021) 2005814.
46
47 585
48 586 [26] Y. Fujii, Y. Ochi, M. Tuchiya, M. Kajita, Y. Fujita, Y. Ishimoto, T. Okajima, Spontaneous spatial
49 587 correlation of elastic modulus in jammed epithelial monolayers observed by AFM, *Biophysical journal*,
50 588 116 (2019) 1152-1158.
51
52 589
53 590 [27] M. Offroy, A. Razafitianamaharavo, A. Beaussart, C. Pagnout, J.F. Duval, Fast automated
54 591 processing of AFM *PeakForce* curves to evaluate spatially resolved Young modulus and stiffness of
55 592 turgescent cells, *RSC advances*, 10 (2020) 19258-19275.
56
57 593
58 594 [28] A. Ansardamavandi, M. Tafazzoli-Shadpour, R. Omidvar, F. Nili, An AFM-based nanomechanical
59 595 study of ovarian tissues with pathological conditions, *International Journal of Nanomedicine*, (2020)
60 596 4333-4350.

- 1
2 597
3
4 598 [29] P.D. Garcia, C.R. Guerrero, R. Garcia, Nanorheology of living cells measured by AFM-based force-
5 599 distance curves, *Nanoscale*, 12 (2020) 9133-9143.
6
7 600
8 601 [30] S.J. Pratt, R.M. Lee, S.S. Martin, The mechanical microenvironment in breast cancer, *Cancers*, 12
9 602 (2020) 1452.
10
11 603
12 604 [31] X. Tang, W. Ruan, J. Zeng, M. Chen, Y. Wang, H. Yang, Measuring the biomechanical properties of
13 605 prostate tumor tissues by atomic force microscopy, in: *Eleventh International Conference on*
14 606 *Information Optics and Photonics (CIOP 2019)*, vol. 11209, SPIE, 2019, pp. 910-916.
15
16 607
17 608 [32] H. Harapan, M. Ryan, B. Yohan, R.S. Abidin, F. Nainu, A. Rakib, I. Jahan, T.B. Emran, I. Ullah, K.
18 609 Panta, Covid-19 and Dengue: double punches for dengue-endemic countries in Asia, *Reviews in*
19 610 *medical virology*, 31 (2021) e2161.
20
21 611
22 612 [33] C.-L. Kao, C.-C. King, D.-Y. Chao, H.-L. Wu, G. Chang, Laboratory diagnosis of dengue virus infection:
23 613 current and future perspectives in clinical diagnosis and public health, *J Microbiol Immunol Infect*, 38
24 614 (2005) 5-16.
25
26 615
27 616 [34] T. Langerak, N. Mumtaz, V.I. Tolk, E.C. van Gorp, B.E. Martina, B. Rockx, M.P. Koopmans, The
28 617 possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis, *PLoS pathogens*, 15
29 618 (2019) e1007640.
30
31 619
32 620 [35] S.N. Yusoh, K.A. Yaacob, Study on the Physical Properties of a SiNW Biosensor to the Sensitivity of
33 621 DNA Detection, *Materials*, 14 (2021) 5716.
34
35 622
36 623 [36] A. Viljoen, S.J. Foster, G.E. Fantner, J.K. Hobbs, Y.F. Dufrêne, Scratching the surface: bacterial cell
37 624 envelopes at the nanoscale, *MBio*, 11 (2020) e03020-03019.
38
39 625
40 626 [37] N. Kristi, A. Gafur, L. Kong, X. Ma, Z. Ye, G. Wang, Atomic force microscopy in mechanoimmunology
41 627 analysis: a new perspective for cancer immunotherapy, *Biotechnology Journal*, 15 (2020) 1900559.
42
43 628
44 629 [38] Y. Zhang, K. Abiraman, H. Li, D.M. Pierce, A.V. Tzingounis, G. Lykotrafitis, Modeling of the axon
45 630 membrane skeleton structure and implications for its mechanical properties, *PLoS computational*
46 631 *biology*, 13 (2017) e1005407.
47
48 632
49 633 [39] A. Alzheimer, *Über eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*, *All Z Psychiatr*, 64 (1907) 146-148.
50
51 634
52 635 [40] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.-C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, L.I. Binder, Abnormal
53 636 phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (Tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology,
54 637 *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83 (1986) 4913-4917.
55
56 638
57 639 [41] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, M. Quinlan, Y.-C. Tung, M.S. Zaidi, H.M. Wisniewski, Microtubule-
58 640 associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments, *Journal of Biological*
59 641 *Chemistry*, 261 (1986) 6084-6089.
60
61
62 642

- 1
2
3 643 [42] Y. Shi, W. Zhang, Y. Yang, A.G. Murzin, B. Falcon, A. Kotecha, M. van Beers, A. Tarutani, F. Kametani,
4 644 H.J. Garringer, Structure-based classification of tauopathies, *Nature*, 598 (2021) 359-363.
5 645
6 646 [43] W. Nam, B.I. Epureanu, Dynamic model for kinesin-mediated long-range transport and its local
7 647 traffic jam caused by tau proteins, *Physical review. E*, 95 (2017) 012405.
8
9 648
10 649 [44] V. Siahaan, J. Krattenmacher, A.A. Hyman, S. Diez, A. Hernández-Vega, Z. Lansky, M. Braun,
11 650 Kinetically distinct phases of Tau on microtubules regulate kinesin motors and severing enzymes,
12 651 *Nature cell biology*, 21 (2019) 1086-1092.
13
14 652
15 653 [45] L. Qiang, W. Yu, A. Andreadis, M. Luo, P.W. Baas, Tau protects microtubules in the axon from
16 654 severing by katanin, *Journal of Neuroscience*, 26 (2006) 3120-3129.
17
18 655
19 656 [46] T. Ahmed, A. Van der Jeugd, D. Blum, M.-C. Galas, R. D'Hooge, L. Buee, D. Balschun, Cognition and
20 657 hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion, *Neurobiology of aging*, 35
21 658 (2014) 2474-2478.
22
23 659
24 660 [47] T. Kimura, D.J. Whitcomb, J. Jo, P. Regan, T. Piers, S. Heo, C. Brown, T. Hashikawa, M. Murayama,
25 661 H. Seok, Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus,
26 662 *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369 (2014) 20130144.
27
28 663
29 664 [48] N. Pallas-Bazarra, J. Jurado-Arjona, M. Navarrete, J.A. Esteban, F. Hernández, J. Ávila, M.
30 665 Llorens-Martín, Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal
31 666 neurogenesis, *The EMBO journal*, 35 (2016) 1417-1436.
32
33 667
34 668 [49] Q. Chen, Z. Zhou, L. Zhang, Y. Wang, Y.-w. Zhang, M. Zhong, S.-c. Xu, C.-h. Chen, L. Li, Z.-p. Yu, Tau
35 669 protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF,
36 670 *Neurochemistry international*, 60 (2012) 233-242.
37
38 671
39 672 [50] Q.-L. Ma, X. Zuo, F. Yang, O.J. Ubeda, D.J. Gant, M. Alaverdyan, N.C. Kiosea, S. Nazari, P.P. Chen,
40 673 F. Nothias, Loss of MAP function leads to hippocampal synapse loss and deficits in the Morris Water
41 674 Maze with aging, *Journal of Neuroscience*, 34 (2014) 7124-7136.
42
43 675
44 676 [51] S. Yi, Q. Liu, X. Wang, T. Qian, H. Wang, G. Zha, J. Yu, P. Wang, X. Gu, D. Chu, Tau modulates
45 677 Schwann cell proliferation, migration and differentiation following peripheral nerve injury, *Journal of*
46 678 *cell science*, 132 (2019) jcs222059.
47
48 679
49 680 [52] L. Szabo, A. Eckert, A. Grimm, Insights into Disease-Associated Tau Impact on Mitochondria, *Int J*
50 681 *Mol Sci*, 21 (2020).
51
52 682
53 683 [53] A. Sultan, F. Nessler, M. Violet, S. Bégard, A. Loyens, S. Talahari, Z. Mansuroglu, D. Marzin, N.
54 684 Sergeant, S. Humez, Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection, *Journal of Biological*
55 685 *Chemistry*, 286 (2011) 4566-4575.
56
57 686
58 687 [54] G. Siano, M. Varisco, M.C. Caiazza, V. Quercioli, M. Mainardi, C. Ippolito, A. Cattaneo, C. Di Primio,
59 688 Tau modulates VGLUT1 expression, *Journal of molecular biology*, 431 (2019) 873-884.

- 1
2 689
3
4 690 [55] W. Wan, L. Cao, B. Kalionis, P. Murthi, S. Xia, Y. Guan, Iron Deposition Leads to
5 691 Hyperphosphorylation of Tau and Disruption of Insulin Signaling, *Frontiers in neurology*, 10 (2019) 607.
6 692
7
8 693 [56] N. Ahmadian, S. Hejazi, J. Mahmoudi, M. Talebi, Tau Pathology of Alzheimer Disease: Possible Role
9 694 of Sleep Deprivation, *Basic and clinical neuroscience*, 9 (2018) 307-316.
10 695
11
12 696 [57] P. Lei, S. Ayton, S. Moon, Q. Zhang, I. Volitakis, D.I. Finkelstein, A.I. Bush, Motor and cognitive
13 697 deficits in aged tau knockout mice in two background strains, *Molecular neurodegeneration*, 9 (2014)
14 698 1-12.
15 699
16 700 [58] S.A. Kent, T.L. Spires-Jones, C.S. Durrant, The physiological roles of Tau and A β : implications for
17 701 Alzheimer's disease pathology and therapeutics, *Acta neuropathologica*, 140 (2020) 417-447.
18 702
19
20 703 [59] C. Sexton, H. Snyder, D. Beher, A.L. Boxer, P. Brannelly, J.P. Brion, L. Buée, A.M. Cacace, G.
21 704 Chételat, M. Citron, Current directions in tau research: Highlights from Tau 2020, *Alzheimer's &*
22 705 *Dementia*, 18 (2022) 988-1007.
23
24 706
25
26 707 [60] G. Höglinger, G. Respondek, G. Kovacs, New classification of tauopathies, *Revue Neurologique*,
27 708 174 (2018) 664-668.
28
29 709
30 710 [61] D.R. Williams, Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases
31 711 associated with microtubule-associated protein tau, *Internal medicine journal*, 36 (2006) 652-660.
32
33 712
34 713 [62] A. Gustavsson, N. Norton, T. Fast, L. Frölich, J. Georges, D. Holzapfel, T. Kirabali, P. Krolak-Salmon,
35 714 P.M. Rossini, M.T. Ferretti, Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease
36 715 continuum, *Alzheimer's & Dementia*, 19 (2023) 658-670.
37
38 716
39 717 [63] M.G. Spillantini, M. Goedert, Tau pathology and neurodegeneration, *The Lancet Neurology*, 12
40 718 (2013) 609-622.
41
42 719
43 720 [64] X. Fan, L. Xia, Z. Zhou, Y. Qiu, Z. Chenhao, X. Yin, W. Qian, Tau Acts in Concert With
44 721 Kinase/Phosphatase Underlying Synaptic Dysfunction, *Frontiers in Aging Neuroscience*, (2022) 507.
45
46 722
47 723 [65] T.J. Cohen, J.L. Guo, D.E. Hurtado, L.K. Kwong, I.P. Mills, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, The acetylation
48 724 of Tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation, *Nature communications*, 2
49 725 (2011) 252.
50
51 726
52 727 [66] D.J. Irwin, T.J. Cohen, M. Grossman, S.E. Arnold, S.X. Xie, V.M.-Y. Lee, J.Q. Trojanowski, Acetylated
53 728 Tau, a novel pathological signature in Alzheimer's disease and other tauopathies, *Brain*, 135 (2012)
54 729 807-818.
55
56 730
57 731 [67] C.S. Arnold, G.W. Johnson, R.N. Cole, D.L.-Y. Dong, M. Lee, G.W. Hart, The microtubule-associated
58 732 protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine, *Journal of Biological Chemistry*,
59 733 271 (1996) 28741-28744.
60 734

- 1
2 735 [68] M.D. Ledesma, P. Bonay, C. Colaço, J. Avila, Analysis of microtubule-associated protein tau
3 736 glycation in paired helical filaments, *Journal of Biological Chemistry*, 269 (1994) 21614-21619.
4
5 737
6 738 [69] D. Cripps, S.N. Thomas, Y. Jeng, F. Yang, P. Davies, A.J. Yang, Alzheimer disease-specific
7 739 conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48,
8 740 Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation, *Journal of Biological Chemistry*, 281 (2006) 10825-10838.
9
10 741
11 742 [70] S. Takeda, Progression of Alzheimer's disease, tau propagation, and its modifiable risk factors,
12 743 *Neuroscience Research*, 141 (2019) 36-42.
13
14 744
15 745 [71] G. Perini, G. Ciasca, E. Minelli, M. Papi, V. Palmieri, G. Maulucci, M. Nardini, V. Latina, V. Corsetti,
16 746 F. Florenzano, Dynamic structural determinants underlie the neurotoxicity of the N-terminal Tau 26-
17 747 44 peptide in Alzheimer's disease and other human tauopathies, *International journal of biological*
18 748 *macromolecules*, 141 (2019) 278-289.
19
20 749
21 750 [72] M.J. Menal, I. Jorba, M. Torres, J.M. Montserrat, D. Gozal, A. Colell, G. Piñol-Ripoll, D. Navajas, I.
22 751 Almendros, R. Farré, Alzheimer's disease mutant mice exhibit reduced brain tissue stiffness compared
23 752 to wild-type mice in both normoxia and following intermittent hypoxia mimicking sleep apnea,
24 753 *Frontiers in neurology*, 9 (2018) 1.
25
26 754
27 755 [73] K. Park, G.E. Lonsberry, M. Gearing, A.I. Levey, J.P. Desai, Viscoelastic properties of human autopsy
28 756 brain tissues as biomarkers for Alzheimer's diseases, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 66
29 757 (2018) 1705-1713.
30
31 758
32 759 [74] Q. Gao, Y. Fang, S. Zhang, H.S.H. Wong, Y.E. Chan, S.S.M. Wong, K.K. Yung, K.W. Lai, Dynamic effect
33 760 of beta-amyloid 42 on cell mechanics, *Journal of Biomechanics*, 86 (2019) 79-88.
34
35 761
36 762 [75] C.L. Avila, C.M. Torres-Bugeau, L.R. Barbosa, E.M. Sales, M.O. Ouidja, S.B. Socías, M.S. Celej, R.
37 763 Raisman-Vozari, D. Papy-Garcia, R. Itri, Structural characterization of heparin-induced glyceraldehyde-
38 764 3-phosphate dehydrogenase protofibrils preventing α -synuclein oligomeric species toxicity, *Journal of*
39 765 *Biological Chemistry*, 289 (2014) 13838-13850.
40
41 766
42 767 [76] Y. Zhang, M. Hashemi, Z. Lv, B. Williams, K.I. Popov, N.V. Dokholyan, Y.L. Lyubchenko, High-speed
43 768 atomic force microscopy reveals structural dynamics of α -synuclein monomers and dimers, *The Journal*
44 769 *of chemical physics*, 148 (2018) 123322.
45
46 770
47 771 [77] L. Xie, A. Li, J. Shen, M. Cao, X. Ning, D. Yuan, Y. Ji, H. Wang, K. Ke, OTUB1 attenuates neuronal
48 772 apoptosis after intracerebral hemorrhage, *Molecular and cellular biochemistry*, 422 (2016) 171-180.
49
50 773
51 774 [78] R. Kumari, R. Kumar, S. Kumar, A.K. Singh, P. Hanpude, D. Jangir, T.K. Maiti, Amyloid aggregates of
52 775 the deubiquitinase OTUB1 are neurotoxic, suggesting that they contribute to the development of
53 776 Parkinson's disease, *Journal of Biological Chemistry*, 295 (2020) 3466-3484.
54
55 777
56 778 [79] S. Maeda, Y. Sato, A. Takashima, Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to
57 779 chromosome-17 mutations enhance tau oligomer formation, *Neurobiology of aging*, 69 (2018) 26-32.
58
59
60

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica de amplo crescimento em nível global. Por conta disso, desperta muito interesse da comunidade científica e, nesse contexto, estudos de caracterização e mecanísticos da doença são de grande importância.

Nossos resultados destacaram marcantes diferenças metabólicas, morfológicas e funcionais entre o DM1 e o DM2. O DM1, caracterizado pela falta de insulina decorrente da destruição massiva de células β -pancreáticas, contrasta significativamente com o DM2, associado à resistência à insulina e à produção excessiva de insulina. Estas diferenças são fundamentais para a compreensão das bases fisiopatológicas e do manejo clínico destas doenças.

Um dos principais contributos deste estudo reside na caracterização ultraestrutural e nanomecânica do fígado de ratos com DM1 e DM2, realizada por meio da Microscopia de Força Atômica (AFM). Esta abordagem representa uma inovação na comunidade científica e enriquece substancialmente nossa compreensão dos efeitos dessas condições metabólicas no nível celular. Através da AFM, conseguimos avaliar as propriedades mecânicas, elétricas e viscoelásticas das células hepáticas, bem como gerar mapas topográficos de alta resolução das estruturas celulares afetadas. Esta análise detalhada oferece *insights* valiosos sobre os mecanismos subjacentes à esteatose e fibrose hepática observadas nos grupos diabéticos.

Concluimos que este estudo contribui significativamente para uma melhor compreensão das nuances entre o DM1 e o DM2, fornecendo *insights* sobre os mecanismos subjacentes. Além disso, destaca a relevância da dieta na indução dessas doenças e ressalta a necessidade de abordagens terapêuticas específicas para cada tipo de DM. Nossas descobertas podem potencialmente auxiliar na detecção precoce e no desenvolvimento de tratamentos mais direcionados.

Em última análise, o enfrentamento eficaz do diabetes mellitus requer uma abordagem multifacetada que considera não apenas os fatores genéticos e fisiológicos, mas também o papel fundamental da dieta e do estilo de vida na manifestação e progressão da doença.

REFERÊNCIAS

AHLQVIST, E.; PRASAD, R. B.; GROOP, L. 100 YEARS OF INSULIN: Towards improved precision and a new classification of diabetes mellitus. **Journal of Endocrinology**, 252, n. 3, p. R59-R70, 2022.

AHMED, A. M. History of diabetes mellitus. **Saudi medical journal**, 23, n. 4, p. 373-378, 2002.

ARONSON, D.; EDELMAN, E. R. Coronary artery disease and diabetes mellitus. **Cardiology clinics**, 32, n. 3, p. 439-455, 2014.

ASGHARPOUR, A.; CAZANAVE, S. C.; PACANA, T.; SENESHAW, M. *et al.* A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. **Journal of hepatology**, 65, n. 3, p. 579-588, 2016.

ASSOCIATION, A. D. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. **Diabetes care**, 44, n. Supplement 1, p. S15-S33, 2021.

BAIG, M. A.; PANCHAL, S. S. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in neonatal rats: an insight into its applications to induce diabetic complications. **Current diabetes reviews**, 16, n. 1, p. 26-39, 2020.

BAYOL, S. A.; SIMBI, B. H.; FOWKES, R. C.; STICKLAND, N. C. A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring. **Endocrinology**, 151, n. 4, p. 1451-1461, April 1, 2010 2010.

BENECH, J. C.; BENECH, N.; ZAMBRANA, A. I.; RAUSCHERT, I. *et al.* Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 307, n. 10, p. C910-C919, 2014.

BHATT, H. B.; SMITH, R. J. Fatty liver disease in diabetes mellitus. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, 4, n. 2, p. 101, 2015.

BIESSELS, G. J.; DESPA, F. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Endocrinology**, 14, n. 10, p. 591-604, 2018.

BRACCO, P. A.; GREGG, E. W.; ROLKA, D. B.; SCHMIDT, M. I. *et al.* Lifetime risk of developing diabetes and years of life lost among those with diabetes in Brazil. **Journal of global health**, 11, 2021.

BRINGHENTI, I.; ORNELLAS, F.; MARTINS, M. A.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. *et al.* Early hepatic insult in the offspring of obese maternal mice. **Nutr Res**, 35, n. 2, p. 136-145, Feb 2015.

BRITO-CASILLAS, Y.; MELIÁN, C.; WÄGNER, A. M. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models. **Endocrinología y Nutrición (English Edition)**, 63, n. 7, p. 345-353, 2016.

BRUCE, K. D.; CAGAMPANG, F. R.; ARGENTON, M.; ZHANG, J. *et al.* Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. **Hepatology**, 50, n. 6, p. 1796-1808, 2009.

BRUNT, E. M.; TINIAKOS, D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, 16, n. 42, p. 5286, 2010.

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. NAFLD: a multisystem disease. **Journal of hepatology**, 62, n. 1, p. S47-S64, 2015.

CABALLERO, F.; FERNÁNDEZ, A.; MATÍAS, N.; MARTÍNEZ, L. *et al.* Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. **Journal of Biological Chemistry**, 285, n. 24, p. 18528-18536, 2010.

CARIELLO, M.; PICCININ, E.; MOSCHETTA, A. Transcriptional regulation of metabolic pathways via lipid-sensing nuclear receptors PPARs, FXR, and LXR in NASH. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, 11, n. 5, p. 1519-1539, 2021.

CARPENTER, S.; RIGAUD, M.; BARILE, M.; PRIEST, T. J. *et al.* The Ebers Papyrus. **Bard College**, 3, 2006.

CHANG, K.-C.; CHIANG, Y.-W.; YANG, C.-H.; LIOU, J.-W. Atomic force microscopy in biology and biomedicine. **Tzu Chi Medical Journal**, 24, n. 4, p. 162-169, 2012.

CHARLTON, M.; KRISHNAN, A.; VIKER, K.; SANDERSON, S. *et al.* Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 301, n. 5, p. G825-G834, 2011.

CHEN, Y.-Y.; YEH, M. M. Non-alcoholic fatty liver disease: A review with clinical and pathological correlation. **Journal of the Formosan Medical Association**, 120, n. 1, p. 68-77, 2021.

DE LA MONTE, S. M.; TONG, M.; WANDS, J. R. The 20-year voyage aboard the journal of Alzheimer's disease: docking at 'Type 3 Diabetes', environmental/exposure factors, pathogenic mechanisms, and potential treatments. **Journal of Alzheimer's Disease**, 62, n. 3, p. 1381-1390, 2018.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes—evidence reviewed. **Journal of diabetes science and technology**, 2, n. 6, p. 1101-1113, 2008.

DE LEIVA-HIDALGO, A.; DE LEIVA-PÉREZ, A. The Nobel Prize of Physiology or Medicine, 1923: controversies on the discovery of the antidiabetic hormone. **Acta Diabetologica**, p. 1-16, 2023.

DIAS, S.; PHEIFFER, C.; ABRAHAMS, Y.; RHEEDER, P. *et al.* Molecular biomarkers for gestational diabetes mellitus. **International journal of molecular sciences**, 19, n. 10, p. 2926, 2018.

DIRAR, A. M.; DOUPIS, J. Gestational diabetes from A to Z. **World journal of diabetes**, 8, n. 12, p. 489, 2017.

DRAKE, A. J.; REYNOLDS, R. M. Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk. **Reproduction**, 140, n. 3, p. 387-398, September 1, 2010 2010.

EL-SAYYAD, H. I.; AL-HAGGAR, M. M.; EL-GHAWET, H. A.; BAKR, I. H. Effect of maternal diabetes and hypercholesterolemia on fetal liver of albino Wistar rats. **Nutrition**, 30, n. 3, p. 326-336, Mar 2014.

FOWLER, M. J. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. **Clinical diabetes**, 26, n. 2, p. 77-82, 2008.

FRANÇA, L. M.; DOS SANTOS, P. C.; BARROSO, W. A.; GONDIM, R. S. D. *et al.* Post-weaning exposure to high-sucrose diet induces early non-alcoholic fatty liver disease onset and progression in male mice: role of dysfunctional white adipose tissue. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, 11, n. 5, p. 509-520, 2020.

FRANK, L. L. Diabetes mellitus in the texts of old Hindu medicine (Charaka, Susruta, Vagbhata). **The American journal of gastroenterology**, 27, n. 1, p. 76-95, 1957.

FUJII, M.; SHIBAZAKI, Y.; WAKAMATSU, K.; HONDA, Y. *et al.* A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between

diabetes and hepatocellular carcinoma. **Medical molecular morphology**, 46, p. 141-152, 2013.

GARCES, T. S.; SOUSA, G. J. B.; CESTARI, V. R. F.; FLORÊNCIO, R. S. *et al.* Diabetes como um fator associado ao óbito hospitalar por COVID-19 no Brasil, 2020. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 31, p. e2021869, 2022.

GENUTH, S. M.; PALMER, J. P.; NATHAN, D. M. Classification and diagnosis of diabetes. 2021.

GERMANO, C. W.; MEGA, P. F.; MATTOSINHO, T. J. A. P.; DIAS, L. L. C. *et al.* Microvesicular Steatosis in Individuals with Obesity: a Histological Marker of Non-alcoholic Fatty Liver Disease Severity. **Obesity Surgery**, 33, n. 3, p. 813-820, 2023.

GILL, R. M.; ALLENDE, D.; BELT, P. H.; BEHLING, C. A. *et al.* The nonalcoholic steatohepatitis extended hepatocyte ballooning score: histologic classification and clinical significance. **Hepatology Communications**, 7, n. 2, 2023.

GLOVACI, D.; FAN, W.; WONG, N. D. Epidemiology of diabetes mellitus and cardiovascular disease. **Current cardiology reports**, 21, n. 4, p. 1-8, 2019.

GLUCHOWSKI, N. L.; BECUWE, M.; WALTHER, T. C.; FARESE JR, R. V. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, 14, n. 6, p. 343-355, 2017.

GREGORIO, B. M.; SOUZA-MELLO, V.; CARVALHO, J. J.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. *et al.* Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. **Am J Obstet Gynecol**, 203, n. 5, p. 495 e491-498, Nov 2010.

HABEGGER, K. M.; HEPNER, K. M.; GEARY, N.; BARTNESS, T. J. *et al.* The metabolic actions of glucagon revisited. **Nature Reviews Endocrinology**, 6, n. 12, p. 689-697, 2010.

HARRIS, S. E.; POOLMAN, T. M.; ARVANITI, A.; COX, R. D. *et al.* The American lifestyle-induced obesity syndrome diet in male and female rodents recapitulates the clinical and transcriptomic features of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 319, n. 3, p. G345-G360, 2020.

HELLGREN, L. I.; JENSEN, R. I.; WATERSTRADT, M. S.; QUISTORFF, B. *et al.* Acute and perinatal programming effects of a fat-rich diet on rat muscle mitochondrial function and hepatic lipid accumulation. **Acta Obstet Gynecol Scand**, 93, n. 11, p. 1170-1180, Nov 2014.

HENRY, L.; PAIK, J.; YOUNOSSI, Z. M. the epidemiologic burden of non-alcoholic fatty liver disease across the world. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 2022.

HOFFMANN, G. A.; WONG, J. Y.; SMITH, M. L. On force and form: Mechano-biochemical regulation of extracellular matrix. **Biochemistry**, 58, n. 47, p. 4710-4720, 2019.

JENSEN, V. S.; HVID, H.; DAMGAARD, J.; NYGAARD, H. *et al.* Dietary fat stimulates development of NAFLD more potently than dietary fructose in Sprague–Dawley rats. **Diabetology & metabolic syndrome**, 10, n. 1, p. 1-13, 2018.

JEON, Y. G.; KIM, Y. Y.; LEE, G.; KIM, J. B. Physiological and pathological roles of lipogenesis. **Nature Metabolism**, p. 1-25, 2023.

KANDIMALLA, R.; THIRUMALA, V.; REDDY, P. H. Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes? A critical appraisal. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, 1863, n. 5, p. 1078-1089, 2017.

KAUL, K.; APOSTOLOPOULOU, M.; RODEN, M. Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. **Metabolism**, 64, n. 12, p. 1629-1639, 2015.

KING, V.; DAKIN, R. S.; LIU, L.; HADOKÉ, P. W. *et al.* Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation. **Endocrinology**, 154, n. 7, p. 2514-2524, 2013.

KING, V.; NORMAN, J.; SECKL, J.; DRAKE, A. Post-weaning diet determines metabolic risk in mice exposed to overnutrition in early life. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 12, n. 1, p. 73, 2014.

KRUSE, M.; SEKI, Y.; VUGUIN, P. M.; DU, X. Q. *et al.* High-fat intake during pregnancy and lactation exacerbates high-fat diet-induced complications in male offspring in mice. **Endocrinology**, 154, n. 10, p. 3565-3576, Oct 2013.

LAGUESSE, M. Sur la formation des ilots de Langerhans dans le pancreas. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie**, 47, p. 699-701, 1985.

LAIOS, K.; KARAMANOU, M.; SARIDAKI, Z.; ANDROUTSOS, G. Aretaeus of Cappadocia and the first description of diabetes. **Hormones**, 11, p. 109-113, 2012.

LANCEREAUX, E. Note et réflexions sur deux cas de diabète sucré avec alteration du pancréas. **Bull. Acad. Méd**, p. 1215, 1877.

LANGERHANS, P. Beitrage zur mikroskopischen anatomie der bauchspeicheldruse, inaugural disseration. **Gustav Lange**, 1869.

LAZARUS, J. V.; MARK, H. E.; ANSTEE, Q. M.; ARAB, J. P. *et al.* Advancing the global public health agenda for NAFLD: a consensus statement. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 19, n. 1, p. 60-78, 2022.

LEON, B. M.; MADDOX, T. M. Diabetes and cardiovascular disease: epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. **World journal of diabetes**, 6, n. 13, p. 1246, 2015.

LI, Y. Y.; ZHENG, T. L.; XIAO, S. Y.; WANG, P. *et al.* Hepatocytic ballooning in non-alcoholic steatohepatitis: Dilemmas and future directions. **Liver International**, 2023.

LIEBER, S. C.; AUBRY, N.; PAIN, J.; DIAZ, G. *et al.* Aging increases stiffness of cardiac myocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 287, n. 2, p. H645-H651, 2004.

MACFARLANE, I. Mathew Dobson of Liverpool (1735–1784) and the history of diabetes. **Practical Diabetes International**, 7, n. 6, p. 246-248, 1990.

MASON, R. M.; WAHAB, N. A. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, 14, n. 5, p. 1358-1373, 2003.

MORAN, C.; THAN, S.; CALLISAYA, M.; BEARE, R. *et al.* New Horizons—Cognitive Dysfunction Associated With Type 2 Diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 107, n. 4, p. 929-942, 2022.

MOURALIDARANE, A.; SOEDA, J.; VISCONTI-PUGMIRE, C.; SAMUELSSON, A. M. *et al.* Maternal obesity programs offspring nonalcoholic fatty liver disease by innate immune dysfunction in mice. **Hepatology**, 58, n. 1, p. 128-138, Jul 2013.

MUNCIE, J. M.; WEAVER, V. M. The physical and biochemical properties of the extracellular matrix regulate cell fate. **Current topics in developmental biology**, 130, p. 1-37, 2018.

NGUYEN, T. T.; TA, Q. T. H.; NGUYEN, T. K. O.; NGUYEN, T. T. D. *et al.* Type 3 diabetes and its role implications in Alzheimer's disease. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 9, p. 3165, 2020.

OBEN, J. A.; MOURALIDARANE, A.; SAMUELSSON, A.-M.; MATTHEWS, P. J. *et al.* Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Journal of Hepatology**, 52, n. 6, p. 913-920, 2010.

OGURTSOVA, K.; GUARIGUATA, L.; BARENGO, N. C.; RUIZ, P. L.-D. *et al.* IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021. **Diabetes research and clinical practice**, 183, p. 109118, 2022.

PANDEY, S.; DVORAKOVA, M. C. Future perspective of diabetic animal models. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets**, 20, n. 1, p. 25, 2020.

PETERSMANN, A.; MÜLLER-WIELAND, D.; MÜLLER, U. A.; LANDGRAF, R. *et al.* Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, 127, n. S 01, p. S1-S7, 2019.

PORETSKY, L. **Principles of diabetes mellitus**. Springer, 2010. 0387098410.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, 78, p. 13-31, 2016.

RAUBENHEIMER, P. J.; NYIRENDA, M. J.; WALKER, B. R. A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. **Diabetes**, 55, n. 7, p. 2015-2020, 2006.

REBELO, L. M.; DE SOUSA, J. S.; MENDES FILHO, J.; RADMACHER, M. Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. **Nanotechnology**, 24, n. 5, p. 055102, 2013.

REGNELL, S. E.; LERNMARK, Å. Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes. **Diabetologia**, 60, n. 8, p. 1370-1381, 2017.

RODEN, M.; SHULMAN, G. I. The integrative biology of type 2 diabetes. **Nature**, 576, n. 7785, p. 51-60, 2019.

RYDÉN, L.; LINDSTEN, J. The history of the Nobel prize for the discovery of insulin. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 175, p. 108819, 2021.

SAEEDI, P.; PETERSOHN, I.; SALPEA, P.; MALANDA, B. *et al.* Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. **Diabetes research and clinical practice**, 157, p. 107843, 2019.

SCHLEICHER, E.; GERDES, C.; PETERSMANN, A.; MÜLLER-WIELAND, D. *et al.* Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, 2022.

SHAH, A. D.; LANGENBERG, C.; RAPSOMANIKI, E.; DENAXAS, S. *et al.* Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1·9 million people. **The lancet Diabetes & endocrinology**, 3, n. 2, p. 105-113, 2015.

SONG, Y.; LI, J.; ZHAO, Y.; ZHANG, Q. *et al.* Severe maternal hyperglycemia exacerbates the development of insulin resistance and fatty liver in the offspring on high fat diet. **Exp Diabetes Res**, 2012, p. 254976, 2012.

STEFAN, N.; CUSI, K. A global view of the interplay between non-alcoholic fatty liver disease and diabetes. **The lancet Diabetes & endocrinology**, 10, n. 4, p. 284-296, 2022.

STEINMETZ, J. D.; BOURNE, R. R.; BRIANT, P. S.; FLAXMAN, S. R. *et al.* Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet Global Health**, 9, n. 2, p. e144-e160, 2021.

SUN, H.; SAEEDI, P.; KARURANGA, S.; PINKEPANK, M. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes research and clinical practice**, 183, p. 109119, 2022.

SWEETING, A.; WONG, J.; MURPHY, H. R.; ROSS, G. P. A clinical update on Gestational Diabetes Mellitus. **Endocrine reviews**, 2022.

TAHRI-JOUTEY, M.; ANDREOLETTI, P.; SURAPUREDDI, S.; NASSER, B. *et al.* Mechanisms mediating the regulation of peroxisomal fatty acid beta-oxidation by PPAR α . **International journal of molecular sciences**, 22, n. 16, p. 8969, 2021.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R.; RODEN, M. NAFLD and diabetes mellitus. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, 14, n. 1, p. 32-42, 2017.

TREVASKIS, J. L.; GRIFFIN, P. S.; WITTMER, C.; NEUSCHWANDER-TETRI, B. A. *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor agonism improves metabolic, biochemical, and histopathological indices of nonalcoholic steatohepatitis in mice. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 302, n. 8, p. G762-G772, 2012.

TWARDA-CLAPA, A.; OLCZAK, A.; BIAŁKOWSKA, A. M.; KOZIOŁKIEWICZ, M. Advanced glycation end-products (AGEs): Formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs. **Cells**, 11, n. 8, p. 1312, 2022.

VERHULST, M. J.; LOOS, B. G.; GERDES, V. E.; TEEUW, W. J. Evaluating all potential oral complications of diabetes mellitus. **Frontiers in endocrinology**, 10, p. 56, 2019.

VON MERING, I. Diabetes mellitus nach Pancreas extirpation. **Zentral Klin. Medzin**, 10, p. 394, 1889.

WANG, H.; LI, N.; CHIVESE, T.; WERFALLI, M. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria. **Diabetes research and clinical practice**, 183, p. 109050, 2022.

WATT, M. J.; MIOTTO, P. M.; DE NARDO, W.; MONTGOMERY, M. K. The liver as an endocrine organ—linking NAFLD and insulin resistance. **Endocrine reviews**, 40, n. 5, p. 1367-1393, 2019.

WILLIS, T. 1674. *Pharmaceutice rationali, sive diatriba de medicamentorum operationibus in humano corpore.* : Oxford 1674.

YKI-JÄRVINEN, H.; KOIVISTO, V. A. Natural course of insulin resistance in type I diabetes. **New England Journal of Medicine**, 315, n. 4, p. 224-230, 1986.

YOUNOSSI, Z. M.; KOENIG, A. B.; ABDELATIF, D.; FAZEL, Y. *et al.* Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **Hepatology**, 64, n. 1, p. 73-84, 2016.

ZOUNGAS, S.; ARIMA, H.; GERSTEIN, H. C.; HOLMAN, R. R. *et al.* Effects of intensive glucose control on microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of individual participant data from randomised controlled trials. **The lancet Diabetes & endocrinology**, 5, n. 6, p. 431-437, 2017.

APÊNDICE



Federal University of Maranhão (UFMA)

Physics Department

Laboratory of Biophysics and
Nanosystems,

Federal University of Maranhão,

Campus Bacanga, São Luís, Maranhão,
65080-805, Brazil.

Tel./Fax: +5598984070117

luciana.alencar@ufma.br

Dear Editor
ACS Chemical Neuroscience

June 02, 2023

I would like to submit the manuscript entitled "**ATOMIC FORCE MICROSCOPY APPLIED TO THE STUDY OF TAUOPATHIES**" by *Maria do Socorro do Nascimento Amorim, Álefe Roger Silva França, Ralph Santos-Oliveira, Jonas Rodrigues Sanches, Thamys Marinho Melo, Bruno Araújo Serra Pinto, Leandro R. S. Barbosa, and Luciana Magalhães Rebelo Alencar*, to be considered for publication as a review article in ACS Chemical Neuroscience.

Our research group has applied Atomic Force Microscopy (AFM) techniques in biological and nanostructured systems for over ten years. This article arose from our need to review the literature to understand and analyze original data from hippocampus analysis of subjects with Alzheimer's Disease via AFM. However, no review article in the literature focused on the use of the AFM technique in the study of tauopathies is available. This fact motivated us to conduct a detailed search of the recent literature and present the most impressive results showing how the AFM technique was useful in investigating different tauopathies. The results were then commented on in this review, bringing our perspective that a microscopist in the area needs to apply his knowledge in tauopathies studies. In addition to the authors' experience in scanning probe microscopy, this manuscript has experts in the field of tauopathies, joining the two views in this manuscript that will certainly be able to contribute to the scientific community.

Below I list five articles that show our expertise and versatility in using the AFM technique in biological systems, some with more than 200 citations.

- Rates, E. R. D., Almeida, C. D., Costa, E. D. P. F., Farias, R. J. D. M., Santos-Oliveira, R., & **Alencar, L. M. R.** (2022). Layer-by-Layer Investigation of Ultrastructures and Biomechanics of Human Cornea. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7833. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/14/7833>
- da Silva Batista, B., da Silva, L. M., de Menezes, A. S., Barbosa Corrêa, L., Cruz Rosas, E., Santos-Oliveira, R., ... & **Rebelo Alencar, L. M.** (2023). Physical, morphological and bioactive properties of Co–Cr–W–Ta alloys: Influence of insertion of tantalum and surface thermochemical treatment on bioactivity. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 111(6), 1247-1258. **(FRONT COVER)** <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.35229>
- Cardoso-Lima, R., Souza, P. F. N., Guedes, M. I. F., Santos-Oliveira, R., & **Rebelo Alencar, L. M.** (2021). SARS-CoV-2 unveiled: Ultrastructural and nanomechanical analysis. *Langmuir*, 37(36), 10762-10769. **(FRONT COVER)** <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.1c01488>

- de Araujo Dorneles, M. L., Cardoso-Lima, R., Souza, P. F. N., Santoro Rosa, D., Magne, T. M., Santos-Oliveira, R., & **Alencar, L. M. R.** (2022). Zika Virus (ZIKV): A New Perspective on the Nanomechanical and Structural Properties. *Viruses*, 14(8), 1727. <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/8/1727>
- **Rebello, L. M.**, de Sousa, J. S., Mendes Filho, J., & Radmacher, M. (2013). Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 24(5), 055102. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/24/5/055102>

Finally, we take the opportunity to state that this article is original, has not been submitted for publication in other journals, and has not yet been published wholly or as part. We state that we are responsible for the research we have designed and carried out; we have participated in drafting and revising the submitted manuscript. We agree to inform you of any conflict of interest that might arise. As the Corresponding Author, I confirm that the manuscript's content has been read and approved for submission by all the authors.

We hope you find our manuscript suitable for publication now and look forward to hearing from you soon.

Sincerely,



Prof. Luciana Magalhães Rebello Alencar

ANEXO



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



CERTIFICADO*

Certificamos que a proposta intitulada: "INTRODUÇÃO DIETÉTICA PRECOCE DE AÇÚCARES DE ADIÇÃO E SUA CORRELAÇÃO COM A INICIAÇÃO E PROGRESSÃO DA SÍNDROME METABÓLICA E SUAS COMORBIDADES", Processo nº 23115.038755/2018-22, sob a responsabilidade da **Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes**, 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 considerado APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 30/11/2018.

We certify that the proposal: "EARLY DIETARY INTRODUCTION OF ADDED SUGARS AND ITS CORRELATION WITH THE INITIATION AND PROGRESS OF METABOLIC SYNDROME AND THEIR COMBORITIES ", Process n. 23115.038755/2018-22, under the responsibility of **Prof. Dr. Antonio Marcus Andrade Paes**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was APPROVED by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 11/30/2018.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde
Vigência: 05/07/2021 a 05/07/2022

ANIMAIS

Origem: Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão

Espécie: Ratos
(*Rattus norvegicus*)
Wistar

Sexo: Machos **Idade:** 60 dias
Peso: 250 - 350g

Sexo: Fêmeas **Idade:** 60 dias
Peso: 250 - 350g

AMOSTRA

30

+ 10*

30

+ 10*

* Aditivo de Animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



CERTIFICADO (04/2022)

Certificamos que a proposta intitulada: “Intervenções nutricionais como reprogramadoras de desordens neuroendócrinas em prole de ratas obesas” Processo 23115.000747/2022-90, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto**, 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 considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 19 de janeiro de 2022.

We certify that the proposal: “Nutritional interventions as reprogrammers of neuroendocrine disorders in offspring of obese rats”, Process 23115.000747/2022-90, under the responsibility of **Prof. Dr. Bruno Araújo Serra Pinto**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of January 19, 2022.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa Área: Ciências da Saúde
Vigência: 01/02/2022 a 31/01/2024

ANIMAIS

Origem:	Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão				
Espécie:	<i>Rattus norvegicus</i> var. Wistar	Sexo:	Fêmeas	Idade: 30 dias Peso: 45g	AMOSTRA 16
			Machos	Idade: 90 dias Peso: 350g	
					16

Local do experimento: Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão – CCBS/UFMA.

São Luís, 25 de janeiro de 2022