

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISADORA POZZETTI SIBA

**Óleo de peixe previne o comportamento tipo-ansioso associado ao diabetes em roedores: suposto envolvimento da modulação nitrinérgica.**

**CURITIBA**

**2016**

ISADORA POZZETTI SIBA

**Óleo de peixe previne o comportamento tipo-ansioso associado ao diabetes em roedores: suposto envolvimento da modulação nitriérgica.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito oficial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Janaína Menezes Zanoveli

Co-Orientador: Roberto Andreatini

**CURITIBA**

**2016**

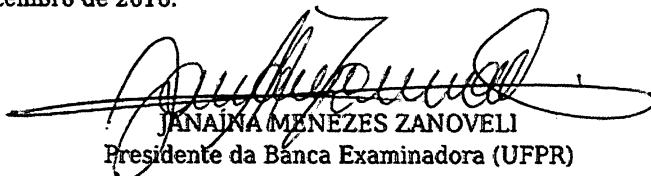


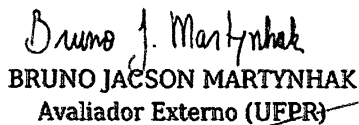
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA  
Código CAPES: 40001016038P0

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

No dia vinte e nove de Setembro de dois mil e dezesseis às 14:30 horas, na sala Auditório - Sala 107, Anexo I do Setor de Ciências Biológicas, do Setor de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **ISADORA POZZETTI SIBA** para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada: "**ÓLEO DE PEIXE PREVINE A ANSIEDADE ASSOCIADA COM O DIABETES EM ROEDORES: SUPOSTO ENVOLVIMENTO DA MODULAÇÃO NITRINÉRGICA**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: JANAÍNA MENEZES ZANOVELI (UFPR), BRUNO JACSON MARTYNHAK (UFPR), JOICE MARIA DA CUNHA (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, JANAÍNA MENEZES ZANOVELI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 29 de Setembro de 2016.

  
JANAÍNA MENEZES ZANOVELI  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
BRUNO JACSON MARTYNHAK  
Avaliador Externo (UFPR)

  
JOICE MARIA DA CUNHA  
Avaliador Interno (UFPR)

## **Agradecimentos**

Serei eternamente grata...

À minha família, por todo apoio e suporte que me proporcionaram.

À professora Janaína, pela oportunidade de ser orientada e por proporcionar grande aprendizado nesta fase da minha vida.

À Mariza, Dani, e todo o pessoal do USP que me auxiliaram na técnica de imunohistoquímica e me proporcionaram muito aprendizado e momentos de diversão.

A todos os colegas e funcionários do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, todos sempre foram muito prestativos e me ajudaram muito, cada um à sua maneira.

Aos amigos, pelos momentos de diversão e descontração.

Aos ratos, pois sem eles, a pesquisa nesta área seria muito limitada.

Agradeço a todos que fizeram parte deste trabalho, de alguma forma.

**“Sem o desvio da norma, o progresso não é possível.”**

**Frank Zappa**

## **NOTA EXPLICATIVA**

Esta dissertação é apresentada em formato alternativo, como artigo científico para publicação, de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná. A dissertação consta de uma revisão bibliográfica e justificativa do trabalho e um artigo científico com os experimentos realizados, resultados e discussão, além da conclusão sintetizando os achados do mesmo.

## RESUMO

A ansiedade é altamente prevalente em indivíduos com diabetes, sendo que os tratamentos atuais não são totalmente eficazes no alívio dos sintomas de ansiedade e frequentemente pioram o quadro glicêmico. Tem sido sugerido que um aumento desregulado na produção de óxido nítrico (NO) pode contribuir com a fisiopatologia que associa ansiedade e diabetes. Portanto, o melhor entendimento desses mecanismos juntamente com a procura por tratamentos mais eficazes são extremamente urgentes. Assim, o presente estudo avaliou o efeito do tratamento crônico com o óleo de peixe (OP), uma fonte de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI- $\omega$ 3) que tem mostrado efeitos benéficos sobre respostas emocionais, assim como o envolvimento da via nitrérgica nas respostas comportamentais relacionadas com a ansiedade em animais diabéticos. Para este fim, um tratamento prolongado (4 semanas) e preventivo com OP (0, 1 ou 3 g/kg; gavagem) foi realizado antes dos animais tornarem-se diabéticos por injeção de estreptozotocina (DBT; 60 mg/kg; i.p.) e o tratamento continuou até completar 8 semanas, quando os animais foram submetidos aos seguintes testes de ansiedade – labirinto em cruz elevado (LCE) e transição claro/escuro (TCE). A seguir, uma imunohistoquímica para óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) foi executada em regiões cerebrais relacionadas a ansiedade, como a amígdala (AMI), hipocampo (HIP; região CA3) e substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (dIPAG). Por fim, para um melhor entendimento do envolvimento da via nitrérgica, animais DBT tratados com OP receberam antes dos testes de ansiedade uma injeção do precursor do NO L-arginina (200 mg/kg, i.p.) ou do inibidor da nNOS 7-NI (10 mg/kg, i.p.). Como esperado, os animais DBT tratados com veículo (VEI), quando comparado aos animais normoglicêmicos (NGL) tratados com VEI, mostraram uma resposta do tipo ansiosa mais pronunciada quando submetidos aos testes de ansiedade, a qual foi completamente prevenida pelo tratamento crônico com OP (3 g/kg; gavagem). Além disto, o tratamento foi capaz de prevenir o prejuízo da atividade locomotora e controlar os altos níveis de glicemia dos animais DBT. Em relação aos níveis de nNOS, o tratamento com OP também foi capaz de prevenir a expressão elevada de nNOS na AMI, HIP e dIPAG observados nos animais DBT tratados com VEI. Reforçando o envolvimento do NO no efeito tipo ansiolítico, ambas as drogas administradas previamente (L-arginina e 7-NI) aboliram o efeito ansiolítico induzido pelo tratamento com OP. De modo geral, nossos dados suportam a hipótese de que uma desregulação na produção de NO em áreas encefálicas como AMI, HIP e dIPAG pode contribuir com mecanismos fisiopatológicos que associam a ansiedade e diabetes; e a prevenção da alteração na expressão de nNOS no encéfalo induzido por um tratamento preventivo prolongado com OP pode ser um mecanismo importante relacionado ao seu efeito do tipo ansiolítico.

**Palavras-chave:** diabetes, ansiedade, óleo de peixe, óxido nítrico sintase neuronal, óxido nítrico.

## ABSTRACT

Anxiety is highly prevalent in individuals with diabetes, and current treatments are not totally effective in relieving anxiety symptoms and often impair the glucose control. An overproduction of nitric oxide (NO) may contribute with the pathophysiology that links anxiety and diabetes. Thus, the better understanding of the mechanisms involved along with the search for more effective treatments are extremely urgent. The present study evaluated the effect of preventive chronic treatment with fish oil (FO), a source of omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA- $\omega$ 3), and the involvement of nitrergic pathway on behavioral responses related to anxiety in diabetic animals. For that, prolonged treatment (4 weeks) with FO (0, 1 or 3 g/kg; gavage) was performed before the animals become streptozotocin-diabetic rats (DBT; 60 mg/kg; i.p.) and the treatment continued until complete 8 weeks when animals were submitted to the following anxiety tests – elevated plus maze (EPM) and light/dark box (LDB). Next, an immunohistochemistry for neuronal NO synthase (nNOS) was performed in brain areas related to anxiety, lateral amygdala (AMY), hippocampus (CA3 region; HIP) and dorsolateral periaqueductal gray (dIPAG). Lastly, to better understand the involvement of the nitrergic pathway, DBT animals treated with FO received before the anxiety tests an injection of L-arginine (200 mg/kg, i.p.), a NO precursor, or 7-nitroindazole (10 mg/kg, i.p.), a nNOS inhibitor. As expected, DBT animals treated with vehicle (VEH), when compared to normoglycemic (NGL) animals treated with VEH, showed a more pronounced anxious-like response when tested in the anxiety tests, which was completely prevented by chronic FO (3g/kg; gavage) treatment. Moreover, this treatment was able to prevent the impairment on locomotor activity and control the high glycaemia levels from DBT animals. Interestingly, FO treatment was capable of preventing the high expression of nNOS in the AMY, HIP and dIPAG observed in VEH-treated DBT animals. Reinforcing the NO involvement in the anxiolytic-like effect, the previous treatment with both L-Arginine and 7-NI abolished the anxiolytic-like effect induced by FO treatment. Altogether, our data support the hypothesis that a dysregulation in the NO production in brain areas as AMY, HIP and dIPAG may contribute with the mechanisms that link anxiety and diabetes, and the prevention of changing in the brain nNOS expression induced by a preventive prolonged treatment with FO may be an important mechanism related to its anxiolytic-like effect.

**Keywords:** diabetes, anxiety, fish oil, neuronal nitric oxide synthase, nitric oxide.



## LISTA DE ABREVIATURAS

**5-HT** - Serotonina

**7-NI** – 7-Nitroindazole

**AGs** – Ácidos graxos

**AGPI- $\omega$ 3** – Ácidos graxos poli-insaturados ômega 3

**AMI** – Amígdala lateral

**BDNF** – Fator neurotrófico derivado do encéfalo

**BLA** – Amígdala basolateral

**CAT** – Catalase

**DHA** – Ácido docosahexanóico

**DM** – Diabetes mellitus

**dIPAG** – substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

**eNOS** – Óxido nítrico sintase endotelial

**EPA** – Ácido eicosapentanóico

**GSH** – Glutathiona peroxidase

**HPA** – Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

**IP** – Via intraperitoneal

**iNOS** – Óxido nítrico sintase induzido

**nNOS** – Óxido nítrico sintase neuronal

**NO** - Óxido nítrico

**$\omega$ -3** – Ômega-3

**dIPAG** - Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral

**HIP** – Hipocampo

**OP** – Óleo de peixe

**SOD** – Superóxido dismutase

**STZ** - Estreptozotocina

**TAG** – Transtorno de ansiedade generalizada

**TP** – Transtorno do pânico

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1. DIABETES.....	11
1.1.1. Etiologia .....	11
1.1.2. Classificação, diagnóstico e patofisiologia.....	11
1.1.3. Modelo experimental do diabetes induzido por estreptozotocina.....	15
2. ÓXIDO NÍTRICO .....	17
3. ANSIEDADE .....	20
4. ANSIEDADE NO DIABETES .....	24
5. ÁCIDOS GRAXOS.....	25
6. ÓLEO DE PEIXE, ANSIEDADE e DIABETES .....	27
7. JUSTIFICATIVA .....	28
2. OBJETIVOS.....	29
1. Objetivos gerais.....	29
2. Objetivos específicos.....	29
3. ARTIGO CIENTÍFICO .....	30
Abstract .....	31
1. Introduction.....	32
2. Matherial and methods.....	34
2.1. Animals.....	34
2.2. Drugs .....	34
2.3. Chronic preventive treatment with fish oil and induction of diabetes...35	
2.4. Elevated plus-maze (EPM) test.....	35
2.5. The Light-Dark box (LDT) test.....	35
2.6. Sample collection.....	36
2.7. Tissue processing .....	36
2.8. Determination of neuronal nitric oxide synthase levels by immunohistochemistry.....	37
2.9. Statistical analysis.....	38
2.10. Experimental procedure.....	38
2.10.1. <i>Evaluation of the preventive treatment with fish oil in diabetic             animals submitted to the anxiety tests and its effect over expression of             nNOS in the amygdala, hippocampus and dIPAG.....</i>	38

2.10.2. <i>Evaluation of the nitrinergic pathway involvement in treated diabetic animals with fish oil on anxiety responses</i> .....	39
<b>3. Results</b> .....	39
3.1. Effect of previous fish oil treatment in diabetic animals submitted to the EPM test.....	39
3.2. Effect of previous fish oil treatment in diabetic animals submitted to the LDT test.....	41
3.3. Effect of the condition (normoglycemic or diabetic) and/or treatments on blood glucose levels and weight gain .....	42
3.4. Effect of previous fish oil treatment on the nNOS expression in the lateral amygdala.....	43
3.5. Effect of previous fish oil treatment on the nNOS expression in the hippocampus CA3 region.....	44
3.6. Effect of previous fish oil treatment on the nNOS expression in the rostral and medial dIPAG.....	45
3.7. Effect of treatment with nNOS inhibitor (7-NI) or NO precursor (L-arg) in diabetic animals submitted to the EPM test.....	46
3.8. Effect of treatment with nNOS inhibitor (7-NI) and NO precursor (L-arg) in diabetic animals treated with fish oil submitted to the LDT test.....	48
<b>4. Discussion</b> .....	50
Acknowledgements.....	56
<b>5. References</b> .....	57
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	63
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS</b> .....	64

## **1. INTRODUÇÃO:**

### **1.1. DIABETES**

#### *1.1.1. Etiologia e Prevalência*

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico heterogêneo, multifatorial e crônico que surge quando há uma deficiência na secreção e/ou resistência à insulina, culminando em deficiência relativa ou absoluta deste hormônio (Brownlee, et al. 2005). Esses fatores levam a um aumento dos níveis de glicose no sangue, denominado de hiperglicemia, principal característica da doença. Sabe-se que a hiperglicemia decorrente do diabetes induz o desenvolvimento de diversos distúrbios secundários, como doenças cardiovasculares (Leiter, 2006), amputação dos membros inferiores (Boulton et al., 2005), retinopatia (Kempen et al., 2004), nefropatia (Stanton, 2014), dor neuropática (Harati, 1996) e transtornos psiquiátricos, sendo a ansiedade citada em diversos estudos (Grigsby et al., 2002; Engum, 2007; Smith et al., 2013; Maia et al., 2014).

De acordo com a Federação Internacional do Diabetes (IDF – 2016), estima-se que existam cerca de 415 milhões de indivíduos portadores de DM no mundo. Além disto, este número pode alcançar 642 milhões de pessoas até o ano de 2040. Porém, estima-se que 193 milhões de pessoas com DM ainda não foram diagnosticadas, sendo esta parte da população mais propensa a desenvolver complicações. Estima-se que cerca de 5 milhões de pessoas morreram em 2015 devido a distúrbios secundários e comorbidades do DM e foram gastos cerca de 728 bilhões de dólares em cuidados de saúde relacionados ao diabetes (IDF atlas, 2016). Estudos mostram que o aumento da prevalência desta doença tem sido relacionado principalmente com mudanças no estilo de vida das pessoas, como o aumento do sedentarismo, da obesidade e com o aumento da expectativa de vida da população (Schmidt et al., 2009; Shaw et al., 2010).

#### *1.1.2. Classificação, diagnóstico e patofisiologia*

Atualmente, o IDF (2016), classifica o diabetes em três principais formas da doença: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2) e DM gestacional (DMG).

O DM1 é caracterizado pela destruição autoimune das células  $\beta$ -pancreáticas, mediados por linfócitos T CD4/CD8 e macrófagos, levando a deficiência na produção de insulina (Mathis et al. 2001; Rother, 2007). A autodestruição destas células inicia-

se meses a anos antes do aparecimento dos primeiros sintomas de hiperglicemia, tal que cerca de 70 a 90% das células  $\beta$  já foram destruídas nesta fase (Voltarelli et al. 2009). Essa forma de DM possui um forte componente genético, sendo que nas últimas décadas vários *loci* foram identificados (Atkinson and Eisenbarth, 2001; Masharani et al. 2007). No entanto, vários estudos têm demonstrado que diversos fatores ambientais podem desencadear a apoptose das células  $\beta$ , como infecções virais, fatores alimentares (aditivos alimentares, consumo do leite de vaca, glúten), poluentes (Hathout et al. 2006), entre outros (Butalia et al., 2016). Estes fatores de risco ajudariam a explicar o aumento da incidência deste tipo de DM nos últimos anos (3 a 5% ao ano), excedendo pela primeira vez o número de meio milhão de indivíduos jovens (0-14 anos) com este distúrbio (Chiang et al. 2014; IDF atlas, 2016). Entretanto, o DM1 acomete cerca de 7-12% da população com diabetes e anteriormente era conhecido como insulínodépendente ou diabetes juvenil, por surgir antes dos 30 anos de idade (Associação Americana de Diabetes, 2007; IDF atlas, 2016); porém, indivíduos de qualquer faixa etária podem ser acometidos com a doença, tal que a maioria dos indivíduos com DM1 são adultos (Vehik et al. 2007; Barat et al. 2008; Chiang et al. 2014; IDF atlas, 2016).

O DM2 apresenta maior incidência entre os pacientes diabéticos, atingindo 90% dos casos, caracterizado principalmente pela resistência à ação da insulina, diminuindo a captação de glicose em tecidos dependentes deste hormônio, como o fígado, músculos e adipócitos. A resistência à ação deste hormônio é definida como uma resposta biológica subnormal a certa concentração desta, decorrente de uma deficiência no mecanismo de sinalização da insulina, que visa regular o nível de açúcar na corrente sanguínea. Diante disso, os tecidos perdem a sensibilidade à ação da insulina e, conseqüentemente, a concentração de glicose sanguínea aumenta (Beardsall et al., 2006; Campbell et al., 2011; Karagiannis et al., 2012). Essa resistência leva a uma hiperinsulinemia compensatória e diminuição da degradação de glicose por tecidos periféricos, continuando por meses ou anos, resultando na disfunção e redução das células  $\beta$  pancreáticas (McLellan et al., 2007; Surampudi et al., 2009). Esta forma do DM, que acomete pacientes com idade igual ou superior a 40 anos, está relacionada ao excesso de peso concomitante a uma redução na prática de exercícios físicos. Atualmente, tem sido cada vez mais frequente o surgimento de DM2 em crianças e adolescentes devido ao estilo de vida sedentário e alterações na dieta, como o aumento do consumo de alimentos ricos

em gorduras saturadas e açúcares (Zimmermann e Aeberli, 2005; Aeberli et al., 2009; Wilson, 2013; Ramkumar e Tondon, 2013; Peplies et al., 2016). Cabe ainda ressaltar que o tratamento com insulina não é essencial, mas pode ser necessário para um melhor controle metabólico, uma vez que a perda da função das células  $\beta$  ocorre progressivamente (Mathis et al., 2001; Skyler et al., 2009).

O DMG é caracterizado pela diminuição da tolerância à glicose decorrente de uma deficiência na ação da insulina. O diagnóstico ocorre pela primeira vez durante a gestação, sendo determinado por um leve aumento nos níveis de glicose no sangue; diferente do DMG, gestantes com um aumento substancial de glicose no sangue (COLOCAR GLICEMIA MÍNIMA) são classificadas como portadoras de DM na gravidez. O DMG tende a ocorrer a partir da 24<sup>a</sup> semana de gravidez, sendo a hiperglicemia acompanhada por sede aumentada e urinação frequente (IDF atlas, 2016). Uma vez que no período pós-gestacional há redução da concentração plasmática de hormônios contrainsulínicos, as necessidades maternas de insulina diminuem, tal que a glicemia é normalizada. No entanto, as gestantes que apresentam DMG possuem alto risco de desenvolverem DM2 posteriormente, pois o DMG é similar ao DM2: ambos são associados à resistência a insulina assim como à diminuição da função das células  $\beta$  (Lawrence et al. 2008; Schaefer-Graf et al., 2002; Associação Americana de Diabetes, 2007). Além disso, o DM gestacional está associado com o aumento de morbidade e mortalidade perinatal (Diretrizes SBD, 2009).

É bem documentado que o DM está associado a muitas complicações micro e macrovasculares, além das comorbidades já supracitadas. Com o intuito de preveni-las, a Associação Americana de Diabetes modificou em 1997 os critérios para diagnóstico do DM. Posteriormente os critérios foram aceitos pela Organização Mundial da Saúde e pela Sociedade Brasileira de Diabetes. Atualmente são três os critérios aceitos para o diagnóstico de DM:

1. Sintomas de poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (aumento de sede) e perda ponderal de peso, acrescidos de glicemia casual acima de 200 mg/dL. Compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições;
2. Glicemia de jejum  $>$  ou  $=$  126 mg/dL. Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia;

3. Glicemia 2 h após sobrecarga oral de 75 g de glicose acima de 200 mg/dL. (Inzucchi, 2012; Diretrizes SBD, 2009).

Sabe-se que além da doença em si há muitas outras condições patológicas associadas, muitas delas decorrentes da hiperglicemia persistente nos pacientes diabéticos. Tem sido sugerido que a hiperglicemia causa danos em diversos tecidos por meio de vários mecanismos, dentre os quais podemos citar o aumento no fluxo de glicose e outros açúcares em tecidos independentes de insulina, através da ativação da via do poliol, da hiperatividade da via hexosamina, do aumento da formação intracelular de produtos finais e da expressão de receptores de glicação avançada (AGEs), e da ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) (Koya and King, 1998; Brownlee, 2001). Diversas evidências indicam que todos esses mecanismos culminam no aumento do estresse oxidativo, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), que reagem com os componentes celulares, contribuindo para o aumento da morte neuronal através da oxidação de proteínas, danos no DNA e peroxidação dos lipídeos de membrana (Mastrocola et al. 2005; Comin et al. 2010). Além de danificar a função destas moléculas, o estresse oxidativo também pode desencadear uma série de respostas celulares, incluindo a ativação da PKC, do fator nuclear de transcrição kappa B (NF- $\kappa$ B) e c-Jun N-terminal quinases (JNK – quinases associadas ao estresse) (Brownlee, 2001). A ativação imprópria destas moléculas reguladoras pode ter efeitos deletérios nas funções celulares, podendo contribuir na patogênese de várias complicações vasculares do diabetes, como anormalidades na função das células endoteliais e vasculares da musculatura lisa, assim como no sistema de coagulação (Kashihara et al. 1992; Suzuki et al. 2001; Gupta et al. 2002). Além da produção de ROS aumentada, os mecanismos antioxidantes intracelulares (atividade da glutathiona peroxidase) estão reduzidos. Evidências sugerem que a superprodução contínua de NO e o conseqüente aumento do seu metabólito (peroxinitrito) também contribui para os danos macrovasculares e microvasculares, tal que estudos identificaram a presença de peroxinitrito tanto em animais quanto em humanos em tecidos como rins, vasos sanguíneos, retina, coração e nervos periféricos, tal como no plasma (Pacher et al. 2007). Também tem sido sugerido que o peroxinitrito formado pelas NO sintases em vasos sanguíneos de indivíduos com DM2 pode ser um mediador dos efeitos citotóxicos da hiperglicemia (Du et al. 2001). Portanto, pode-se inferir que a persistência do estado hiperglicêmico é o fator primário desencadeador de

complicações macrovasculares, microvasculares, bem como neuronal no indivíduo diabético (Ferreira et al., 2011).

Além do exposto acima, estudos relatam que a hiperglicemia decorrente do diabetes induz diversos danos neuronais relacionados com encefalopatias diversas, bem como com o surgimento de doenças neuropsiquiátricas como depressão, disfunção cognitiva (devido à atrofia cerebral, principalmente nas áreas subcorticais), aumento na responsividade ao medo e ao estresse, demonstrados por um aumento na atividade do eixo HPA e transtornos de humor e de ansiedade (DeGroot et al., 2001; Chan et al., 2003; Lin et al., 2008; Roriz-Filho et al., 2009; Anderson et al., 2002), sendo esta última o principal foco de interesse do presente estudo.

### 1.1.3. Modelo experimental do diabetes tipo 1 induzido por estreptozotocina

A estreptozotocina (STZ) foi primeiramente isolada a partir de uma bactéria do solo, denominada *Streptomyces achromogenes*, sendo um antibiótico com atividade de amplo espectro (Reusser, 1971; Xiang et al., 2010). Dentre os diversos químicos disponíveis para induzir o diabetes, a STZ é o modelo de preferência quando se procura mimetizar o DM de humanos em modelos animais, pois as alterações observadas em nível funcional e bioquímico no modelo do diabetes induzido por STZ lembra alterações que usualmente aparecem no DM em humanos, tal que o modelo experimental adotado no presente estudo induziu o DM1, foco de nosso estudo. Portanto, este modelo é considerado clinicamente relevante no estudo da patogênese do diabetes e suas comorbidades em modelos animais (Eleazu et al., 2013). Quimicamente, a STZ é um antibiótico hidrofílico de natureza glicosamina-nitrosuréia (sendo uma molécula similar à glicose), com meia-vida curta que varia de 5 a 15 minutos (Lenzen, 2008; Lee et al., 2010; Goud et al., 2015). O acúmulo da STZ ocorre preferencialmente nas células  $\beta$  pancreáticas através dos transportadores de glicose do tipo GLUT2, expressos na superfície das células  $\beta$  pancreáticas resultando na citotoxicidade destas e induzindo o estado diabético experimental, decorrente da diminuição da secreção de insulina (Karunanayake et al., 1976; Szkudelski, 2001; Eleazu et al., 2013).

O acúmulo intracelular da STZ forma um agente alquilante, diazometano (DAM), que causa metilação do DNA e provoca uma ação diabetogênica (Lenzen, 2008). Ainda mais, as alquilações de bases nitrogenadas quando reparadas causam



alterações no metabolismo de células  $\beta$  por acarretarem diminuição celular de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e conseqüentemente de adenosina trifosfato (ATP). Assim, este esgotamento da energia celular resulta, em última análise, em necrose das células  $\beta$  pancreáticas (Bolzan e Bianchi, 2002; Delfino et al., 2002). A principal complicação decorrente da destruição destas células é a hiperglicemia, que ativa vários processos, tais como o aumento dos níveis de NADPH, quer por auto-oxidação da glicose ou pela produção de diacilglicerol (DAG), ativação da via PKC, fluxo de glicose através da via metabólica do poliálcool, acúmulo de produtos de glicação avançada e secreção de citocinas (Gonzalez et al., 2000b; Giacco e Brownlee, 2010). Todos esses eventos produzem ROS, causando um desequilíbrio entre ROS e a defesa antioxidante endógena, levando ao estresse oxidativo, que além de ser uma característica proeminente do diabetes induzido por STZ, leva às complicações do diabetes (Bonfont-Rousselot, 2002; Ceriello, 1997; King e Loeken, 2004). Interessante que a administração da STZ como modelo de diabetes induzido experimentalmente se justifica pela alta capacidade de mimetizar quadros patológicos observados em pacientes diabéticos como poliúria, polifagia e hiperglicemia (Ramanadham et al., 1989; Goyary e Sharma, 2010).

De interesse para o nosso estudo, várias evidências mostram que ratos com o diabetes induzido por STZ apresentam um comportamento do tipo ansioso mais pronunciado, quando comparado com animais não diabéticos (Can et al. 2011; Aksu et al. 2012; Ates et al. 2014; Gupta et al. 2014; Gambeta et al., 2016). É importante mencionar que, apesar dos efeitos deletérios que a STZ causa *per se* em vários órgãos, os efeitos comportamentais não são causados diretamente por este composto, mas sim pelos mecanismos citados acima, devido ao fato de que a barreira hematoencefálica não possui o transportador GLUT2, impossibilitando a absorção da STZ. A desestabilização da barreira hematoencefálica é causada pelo processo inflamatório como conseqüência da hiperglicemia, lembrando que a STZ é degradada bem antes de tal fato acontecer devido ao seu curto tempo de meia-vida (Kumagai, 1999; Rebolledo-Solleiro et al., 2016).

## 1.2. ÓXIDO NÍTRICO

O NO foi primeiramente identificado nos anos 80 como um fator de relaxamento derivado do endotélio no sistema cardiovascular (<http://www.nobel.se/medicine/laureates/1998/press.html>), tal que estudos posteriores demonstraram que o NO também exerce um papel importante no sistema nervoso central (SNC) sob condições fisiológicas (Garthwaite et al., 1988, Bredt et al., 1990; Shibuki & Okada, 1991) e patológicas (Dawson et al., 1991; Dawson et al., 1992). O NO é um gás solúvel que possui o menor peso molecular de qualquer produto secretado por células de mamíferos (neurônios, células endoteliais e macrófagos), e por isto difunde-se livremente pelas membranas plasmáticas, além de sua expressão ser desencadeada sob demanda. Por esta razão, diferente de outros neurotransmissores, este gás de meia-vida curta não é armazenado em vesículas sinápticas, nem lançado por processos de exocitose (Yun, 1997; Wei et al., 2003; Prast e Philippu, 2001). Quanto à importância do NO, ele age tanto como um neurotransmissor ou como mensageiro secundário, envolvendo-se em numerosas funções fisiológicas como a regulação do sistema cerebrovascular, plasticidade sináptica, e agindo como modulador no comportamento agressivo, de aprendizado e percepção da dor; sendo assim, pode-se dizer que a especificidade de suas reações é mínima (Ceylan et al., 2011; Esplugues, 2002). Sabe-se que o NO é formado estequiometricamente com a citrulina durante sua conversão enzimática da L-arginina por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (Gally et al., 1990; Moncada et al., 1991; Guix et al., 2005).

A família das NOS é composta por três isoformas, as quais foram nomeadas de acordo com o tipo celular onde foram primeiramente identificadas e são predominantemente expressas: a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzida (iNOS). As duas primeiras são expressas constitutivamente nos neurônios e células endoteliais, respectivamente, sendo dependentes da ligação com a cálcio-calmodulina (Mungrue et al., 2003). Ambas enzimas são ativadas em resposta ao aumento intracelular de cálcio. Em contrapartida, a ativação da iNOS é independente da cálcio-calmodulina e sua regulação depende da síntese *de novo* (Ebadi e Sharma, 2003), tal que a expressão desta é desencadeada quando há

estímulos imunológicos ou inflamatórios nos macrófagos, astrócitos, microglia e outras células (Iadecola et al., 1995).

Apesar de todas as isoformas de NOS afetarem a sinalização no cérebro, o NO derivado da nNOS parece ser o maior responsável sobre a modulação dos processos neuronais (Amitai, 2010; Garthwaite, 2008). Uma vez que a nNOS é fisicamente ancorada aos receptores NMDA por proteínas pós-sinápticas, o aumento de cálcio intracelular pela abertura dos canais NMDA após a ligação com o glutamato é o principal estímulo para a síntese de NO nos neurônios (Garthwaite, 2008). Enquanto a nNOS está presente principalmente no citosol de neurônios, a eNOS é encontrada abundantemente nas células do endotélio vascular, sendo esta isoforma um importante vasodilatador endotelial, atuando na regulação do fluxo sanguíneo na periferia, tal como no encéfalo. Porém, ambas as isoformas constituintes da enzima podem atuar no cérebro como um vasodilatador para o controle da circulação sanguínea, acreditando-se ser importante na preservação do fluxo sanguíneo em casos de isquemia cerebral (Molina et al., 2016; Duncan e Heales, 2005). Além disso, vale citar que a insulina (hormônio ausente no DM1) exerce atividade modulatória sobre a biodisponibilidade do NO, tal que esta promove o aumento da expressão de NO no endotélio, promovendo a dilatação dos vasos (Muniyappa et al., 2012; Manrique et al., 2014). A iNOS é expressa em locais com inflamação crônica, sendo primeiro identificada em macrófagos (Sagin et al., 2004; Molina et al., 2016). O controle da expressão da iNOS ocorre principalmente em nível transcricional e pós-transcricional, através de vias de sinalização que envolvem a ação de dois mediadores: o NF- $\kappa$ B, que está relacionado com a indução da NOS por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), e/ou proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Alderton et al., 2001). Devido ao DM1 ser uma doença autoimune, o aumento do fluxo de citocinas pró-inflamatórias ativa a expressão da iNOS (Darville e Eizirik, 1995; Ciésłak et al., 2015). Estudos reportam também que a biodisponibilidade do NO está diminuída nos vasos sanguíneos (sendo assim uma das causas da má circulação em pacientes diabéticos), mas está aumentada em algumas regiões encefálicas (Ding, et al. 2000; Yagihashi, et al. 1996; Koo e Vaziri, 2003; Molina et al., 2016). Os efeitos do NO nas funções celulares são complexos e parecem ser contraditórios, pois o NO pode ser tanto citotóxico quanto proteger as células de injúrias tóxicas, podendo ativar ou inibir vias de transdução de sinais e transcrição de genes (Pfeilschifter et al., 2003). Devido ao fato do NO ser um agente

oxidante ou redutor (dependendo do meio em que se encontra), este pode ser rapidamente destruído pelo oxigênio, resultando em nitrito e nitrato (Kiechele et al., 1993). Por ser um radical livre, este gás também pode reagir rapidamente com um superóxido radical para formar uma das espécies mais reativas de todas, o peroxinitrito, que pode causar estresse oxidativo se este não for devidamente eliminado por mecanismos de defesa antioxidantes, que estão diminuídos em condições patológicas (Ceylan et al., 2011; Steinert et al., 2010). Quanto aos efeitos neurotóxicos causados pelo aumento de ROS, o cérebro é particularmente mais suscetível devido à alta demanda de oxigênio deste órgão (Dringen, 2000).

O NO é um dos principais mensageiros inter/intracelular nos neurônios do sistema nervoso periférico e central. (Duncan e Heales, 2005). Em modelos de excitotoxicidade, tem sido proposto que ativação excessiva dos receptores NMDA é um dos mecanismos da morte celular mediada pelo NO (Contestabile, 2000). Isto ocorre pela produção excessiva de NO, este podendo contribuir para um processo denominado excitotoxicidade glutamatérgica, descrita como uma condição resultante da liberação excessiva de glutamato e a consequente entrada de cálcio no terminal pós-sináptico e ativação da NOS cálcio-dependente. Estudos também reportam a ação modulatória do NO sobre a liberação das monoaminas envolvidas nos transtornos de ansiedade, diminuindo a concentração extracelular da serotonina e dopamina no hipocampo, além de inibir a triptofano hidroxilase, enzima que participa da síntese da serotonina. O NO possui afinidade pelos grupos sulfidril presentes nesta enzima, usando-os como substrato e induzindo uma nitrosilação na molécula; este processo resulta na inativação desta (Fossier, et al. 1999; Kuhn e Arthur, 1996; Wegener, et al. 2000; Harkin, et al. 2003; Dhir, 2011).

A possível atuação de inibidores da NOS constitutivas como neuroprotetores tem sido amplamente investigada. O 7-NI tem rápido acesso ao cérebro, onde seu mecanismo de ação tem sido relacionado à inibição da nNOS e da atividade da MAO-B, de forma reversível (Royland et al., 1999). No entanto, a inibição da nNOS por este composto é dependente da dose, tal que a inibição da nNOS é inversamente proporcional à dose (Volke et al., 1997). Além do 7-NI, outros inibidores da NOS têm sido investigados, como o Nnitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) e o N-nitro-L-arginina (L-NOARG). O LNOARG e o L-NAME foram os primeiros inibidores da NOS; são derivados da Larginina e inibem tanto a nNOS como a eNOS; esta última ação resulta em vasoconstrição e hipertensão, o que não

ocorre com o 7-NI, pois este não inibe a eNOS (Pokk e Väli, 2002). Diferentes autores têm obtido resultados variáveis no que se refere às doses de inibidores da NOS necessárias para produzir um mesmo grau de inibição da enzima no cérebro. De acordo com a literatura, as doses de 7-NI e L-NAME necessárias para diminuir entre 80-90% a atividade da NOS em ratos, são de 20 a 100 mg/Kg e de 10 a 100 mg/Kg, respectivamente; porém, Jung e colaboradores (2012) demonstraram que o 7-NI, na dose de 10 mg/kg foi significativamente eficaz na reversão de comportamento tipo-ansioso induzido por estresse. Já com o L-NOARG, verificou-se que para a diminuição de 70-80% na atividade da NOS, são necessárias doses de 10 a 50 mg/Kg (Pokk e Väli, 2002).

### **1.3. ANSIEDADE**

A ansiedade é uma resposta emocional normal com valor adaptativo que pode ser observada em situações de perigo real ou imaginário. Porém, quando essa resposta de ansiedade passa a ser mal adaptativa interferindo com o cotidiano, passando a ser persistente, excessiva ou desproporcional, este comportamento adaptativo passa a ser considerado patológico (Cryan e Sweeney, 2011). O limite entre ansiedade “normal” e “patológica” não é facilmente definida por ser variável entre a população em função dos traços de personalidade de cada indivíduo (Ganellen et al., 1986; Uhlenhuth et al., 2002; Starcevic et al., 2012).

O estudo da neurobiologia da ansiedade tem englobado a avaliação dos sistemas neuroanatômico, neuroendócrino e dos neurotransmissores. Alterações nesses sistemas podem decorrer por vários motivos, entre eles estão as experiências vividas, o meio ambiente e a predisposição genética (Barik et al., 2013; Martin et al., 2010). Dentre as estruturas encefálicas mais relacionadas ao estudo da ansiedade estão o córtex pré-frontal, os núcleos da rafe e as pertencentes ao sistema límbico, como o hipocampo, amígdala e matéria cinzenta periaquedutal (Graeff e Zangrossi, 2010; Sokolowski e Corbin, 2012). Os sistemas de transdução neuronal (neurotransmissores e seus receptores) mais estudados em relação à ansiedade são o GABAérgico, o glutamatérgico e o monoaminérgico, o último representando o grupo dos neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina (Barik et al., 2013; Martin et al., 2010; Mosienko, 2012; Möhler, 2012). Além dos neurotransmissores clássicos, outras substâncias que participam da

sinalização neuronal também têm sido estudadas em relação à ansiedade, como os neuropeptídeos (ex.: fator liberador de corticotropina, neuropeptídeo Y) e o NO, foco do presente estudo (Magalhães et al., 2010; Volke et al., 1995; Zhang et al., 2010).

O NO tem sido relacionado com a modulação das monoaminas NA, DA e 5-HT (Baldwin, et.al., 2005; Nash e Nutt, 2007; Pereira, et al. 2011). Sabe-se que a 5-HT tem um papel dual na modulação da ansiedade, dependendo do tipo de transtorno de ansiedade. Segundo a teoria do papel dual da serotonina sobre a ansiedade, a ativação de receptores serotoninérgicos na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (dlPAG) causaria uma inibição da resposta defensiva ao um perigo próximo, que estaria relacionada à inibição do pânico, enquanto que a ativação de receptores serotoninérgicos no córtex pré-frontal e na amígdala facilitaria a resposta defensiva a uma ameaça distante, relacionada ao aumento da ansiedade (Graeff, 2002; Graeff e Zangrossi, 2010). Ou seja, estudos mostram que um aumento de 5-HT, em áreas encefálicas específicas, pode tanto melhorar como piorar alguns tipos de transtornos de ansiedade (Miyata, et al. 2007; Zangrossi e Graeff, 2014). A amígdala basolateral (BLA) é importante para a avaliação de indivíduos, objetos ou contexto perigosos, sendo que os estímulos transmitidos ao hipocampo e por fim, processados (LeDoux, 2000; McGaugh et al., 1993). Ambas as estruturas estão ligadas por diversas projeções e são importantes na modulação de respostas autonômicas e afetivas relacionadas à dor, agressão, medo e ansiedade (Echeverry et al., 2004). Estudos reportam a atividade do NO na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade. Echeverry e colaboradores (2004) demonstraram que o estresse de contenção induziu um aumento de neurônios reativos para NADPH diaforese, demonstrando então maior expressão de NO na BLA e nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Além disto, o envolvimento do NO na modulação dos comportamentos de esquiva ativa na dlPAG têm sido bem documentado, no qual a exposição ao predador assim como ao labirinto em cruz elevado (LCE) ativou maior quantidade de neurônios nitrinérgicos nesta área encefálica. A importância da atividade nitrinérgica foi confirmada por estudos em que a inibição do NO por manipulação farmacológica induziu um efeito ansiolítico (Guimarães et al., 1994; Guimarães et al., 2005), tal que doadores de NO induziram comportamentos de fuga (De Oliveira et al. 2000). Quanto aos transtornos de ansiedade, estudos relatam que a BLA modula o comportamento de esquiva passiva, sendo que o mesmo estaria relacionado com o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), enquanto que a

dIPAG modula a esquivas ativa ou respostas explosivas de luta e fuga, relacionada ao transtorno de pânico (TP) (Graeff et al., 1993; Bueno et al., 2005a e b).

Ambos os comportamentos citados acima são mensurados em diferentes testes de ansiedade. No presente estudo, foram empregados testes mistos de ansiedade que promovem respostas condicionadas e incondicionadas relacionadas com o TP e o TAG, como o LCE e o teste de transição claro/escuro (TCE). Ambos os testes incluem elementos de esquivas passiva e ativa ao mesmo tempo. O teste do LCE foi introduzido por Montgomery (1955) e posteriormente validado por Pellow e colaboradores (1985). No teste original, Montgomery (1955 a/b) documentou que ratos exibiram sinais de medo durante exploração em caminhos abertos ou elevados. Já o teste de LCE e do TCE se baseia na aversão inata de roedores a espaços abertos, mesmo com variações de iluminação.

O TAG está entre os transtornos de ansiedade mais comumente observados e atinge uma parcela significativa da população. Este transtorno pode ser debilitante, comprometendo a vida pessoal e profissional dos pacientes, além de aumentar o risco para o surgimento de comorbidades, como exemplo, transtornos de humor, uso abusivo de substâncias, alterações gastrointestinais, alterações cardiovasculares, dor crônica e enxaqueca (Noyes et al., 1992; Hoen-Saric et al., 2004). Mesmo existindo opções eficazes de tratamento farmacológico, acredita-se que muitos pacientes com transtorno de ansiedade não recebam o tratamento adequado ou são refratários aos tratamentos (Andreatini *et al.*, 2001; Cryan e Sweeney, 2011; Koen e Stein, 2011).

O TP tem sido muito abordado nas áreas clínica, científica e de saúde pública nos últimos anos (Associação Americana de Psiquiatria, 1980; Klein, 1999) e é caracterizado por ataques de pânico recorrentes, em conjunto com a preocupação sobre a possibilidade de ataques futuros, assim como o desenvolvimento de fobias pode ocorrer (Klein, 1999; Roy-Byrne et al., 2006; Asmundson et al., 2014). Nestes ataques de ansiedade, o indivíduo sente intenso medo e terror, desejo de fuga, sentimento de morte iminente e perda do controle. Estima-se que a ocorrência de ataques de pânico dura 12 meses para 11,2% dos indivíduos e 28.3% por toda a vida (Kessler et al., 2005a/b).

Os medicamentos usualmente indicados para os pacientes com transtornos de ansiedade são os benzodiazepínicos, os quais atuam como moduladores alostéricos positivos no sítio benzodiazepínico do receptor ácido gama-aminobutírico tipo A

(GABA-A) causando aumento da neurotransmissão inibitória; antidepressivos, principalmente os inibidores da recaptção de serotonina (5-HT) e buspirona, um agonista do receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> (Koen e Stein, 2011; Ravindran e Stein, 2010; Rudolph e Knoflach, 2011). Embora demonstrem eficácia, os efeitos colaterais e muitas vezes a ineficácia destes medicamentos em considerável parte da população dificultam a adesão do paciente ao tratamento (Andreatini et al., 2001; Ravindran e Stein, 2010; Koen e Stein, 2011).

No caso dos benzodiazepínicos, os principais efeitos colaterais são sedação, amnésia, abuso, dependência, síndrome de abstinência e interações com outros depressores do sistema nervoso central (SNC) (Andreatini et al., 2001; Ravindran e Stein, 2010; Koen e Stein, 2011).

Dentre os antidepressivos, a principal classe indicada é a dos inibidores seletivos da recaptção de serotonina, que embora seja conhecida por causar menos efeitos colaterais quando comparado a outras classes de antidepressivos, como os inibidores da monoamina oxidase e os tricíclicos, apresenta alta taxa de abandono do tratamento, que pode ser decorrente da demora em iniciar sua ação terapêutica e o fato de poder causar disfunção sexual e alteração de peso (Andreatini et al., 2001; Ravindran e Stein, 2010; Koen e Stein, 2011).

Além disso, esses medicamentos citados não apresentam eficácia na totalidade de pacientes submetidos ao tratamento. Sendo assim, alguns pacientes acabam sendo tratados com outros fármacos, como por exemplo, a buspirona que apresenta baixa satisfação dos pacientes, ou os antipsicóticos, que podem causar parkinsonismo, dentre outros efeitos colaterais (Andreatini et al., 2001; Ravindran e Stein, 2010; Koen e Stein, 2011).

Recentemente foi introduzido na prática clínica a pregabalina, que apresentou resultados positivos no transtorno de ansiedade generalizada (Boschen, 2011). A pregabalina liga-se à subunidade alfa2-delta dos canais de cálcio voltagem dependentes, reduzindo a entrada de cálcio e conseqüente liberação de neurotransmissor (Lotarski et al., 2011). Entretanto, 20 a 30% dos pacientes tratados com pregabalina apresentam sedação e tontura, podendo ainda acarretar alterações cognitivas (Boschen, 2011).



#### 1.4. ANSIEDADE NO DIABETES

Estudos clínicos apontam que há uma alta incidência de ansiedade entre pacientes diabéticos, tal que a prevalência de transtornos de ansiedade é 2-3 vezes maior em pacientes com diabetes quando comparados a normoglicêmicos (Grigsby et al., 2002; Maia et al., 2014). Ainda mais, estudos com indivíduos portadores de DM1 demonstrou que a prevalência de sintomas de ansiedade entre esses pacientes atinge a taxa 60%, sendo que o TAG é o mais comum (22,7%), seguido do TP (8,2%) e fobia social (5,5%) (Maia et al., 2014). Esta observação desencadeou a hipótese de que o desenvolvimento da ansiedade é uma complicação do diabetes, aumentando sua morbidade e mortalidade (Anderson et al., 2001; Grigsby et al., 2002; Gupta et al., 2013; Jia et al., 2014).

Todavia, a neurobiologia da ansiedade relacionada ao diabetes é pouco entendida. Diversos estudos pré-clínicos reportam que animais diabéticos induzidos por STZ apresentam um comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado (Aksu et al., 2012; Ates et al., 2014; Gupta et al., 2014; Gambeta et al., 2016). Muitas evidências apontam que este comportamento estaria associado a uma desregulação área encefálica-dependente de neurotransmissores como serotonina, dopamina e noradrenalina (Bellush et al., 1989; Ezzeldin et al., 2014; Manjarrez et al., 2006; Miyata et al., 2004). Essas alterações podem estar relacionadas a uma desregulação na síntese e/ou degradação de NO, uma vez que estudos mostram que o neuromodulador NO também está desregulado em animais diabéticos (Ding, et al. 2000; Yagihashi, et al. 1996; Koo e Vaziri, 2003). O envolvimento deste neurotransmissor na fisiopatologia da diabetes parece ser variável e complexo, tal que o aumento ou diminuição da enzima responsável pela produção deste neurotransmissor, a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), tem sido documentado. Yu e colaboradores (1999) observaram uma diminuição no RNA mensageiro da nNOS no córtex e hipocampo de ratos diabéticos induzidos por STZ; em contrapartida, a expressão desta enzima encontra-se aumentada no núcleo paraventricular hipotalâmico, núcleo supraóptico e substância cinzenta periaquedutal dorsolateral em ratos diabéticos (Jang, 2003; Comin, et al. 2010). Assim, pode-se dizer que o comportamento ansiogênico mais pronunciado observado em ratos diabéticos está potencialmente relacionado com a expressão elevada de nNOS nas

áreas citadas acima, uma vez que o aumento do NO nestas áreas está relacionado com os transtornos de ansiedade. (Hawkins e Davies, 2001; Comin, et al. 2010).

Baseado no exposto acima, é evidente a necessidade de maior entendimento na fisiopatologia da ansiedade relacionada ao diabetes. Importante também ressaltar que os antidepressivos, que são as drogas de primeira escolha para o tratamento da ansiedade associada ao diabetes juntamente com ansiolíticos benzodiazepínicos, não são totalmente eficazes em aliviar sintomas de ansiedade nesses pacientes (Koen e Stein, 2011). Mais ainda, um estudo reporta o diazepam, um agente ansiolítico amplamente utilizado, demonstrou que este fármaco reverteu parcialmente o comportamento tipo-ansioso em camundongos diabéticos, ao ponto que em camundongos normoglicêmicos, a droga foi mais eficaz na reversão deste comportamento (Ramanathan et al. 1998; Kamei et al. 2001). Neste sentido, faz-se urgente estudos focando em novos alvos terapêuticos para o tratamento da ansiedade associada ao diabetes, sendo a suplementação com óleo de peixe uma possível alternativa no tratamento da ansiedade associada ao diabetes.

### **1.5. ÁCIDOS GRAXOS**

Os ácidos graxos (AGs) são formados por uma cadeia de átomos de carbono ligados a átomos de hidrogênio. Quando todos os átomos de carbono (exceto os dois últimos na cadeia) encontram-se ligados a átomos de hidrogênio, a gordura é dita estar saturada. Quando dois átomos de carbono adjacentes na cadeia estão ligados a apenas um hidrogênio, uma dupla ligação (insaturação) ocorre entre os pares de carbono, o ácido graxo é dito estar insaturado. O número de insaturações encontradas na cadeia carbônica determina se o ácido graxo é mono (AGMIs) ou poliinsaturado (AGPIs). As diferentes posições e quantidade de duplas ligações ao longo da cadeia determinam à família a qual este ácido graxo pertence, bem como suas diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais (Farooqui, 2009).

Os AGs classificados como essenciais são aqueles ácidos graxos de extrema importância para o funcionamento do organismo (ex. participam no desenvolvimento do cérebro, células sanguíneas – eritrócitos e leucócitos e da pele). As duas famílias de AGs essenciais são os pertencentes à família ômega 3 ( $\omega$ -3) e ômega 6 ( $\omega$ -6), sendo seus precursores, respectivos, o ácido linoléico e o  $\alpha$ -linolênico. Estes AGs não podem ser sintetizados no organismo de mamíferos, pois estes não possuem as

enzimas dessaturases  $\Delta 12$  (inserção de insaturação entre carbonos 3-4) e  $\Delta 15$  (inserção entre carbonos 6-7), as quais são responsáveis pela síntese destes ácidos graxos poliinsaturados e, portanto, devem ser providos pela dieta. Embora não possam ser sintetizados por mamíferos, os AGs essenciais podem sofrer modificações relacionadas à porção carboxi-terminal por inserções de insaturações, inserção de pares de carbonos (no retículo endoplasmático) ou retirada de carbonos da cadeia (no peroxissomo). No entanto, as insaturações presentes na porção metila do ácido graxo permanecem inalteradas (Curi et al., 2002). Neste contexto, ácidos graxos como linoléico (18:2n-6) e  $\alpha$ -linolênico (18:3n-3) adquirem novas duplas ligações e sofrem alongamento de cadeia, dando origem a vários outros ácidos graxos de cadeia longa, entre eles o ácido araquidônico (AA 20:4n-6) proveniente do ácido linoléico, o ácido eicosapentaenóico (EPA 20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA 22:6n-3), provenientes do ácido  $\alpha$ -linolênico (Ratnayake e Galli, 2009; Wei et al., 2010).

A dieta é considerada um fator ambiental importante no desenvolvimento de doenças, principalmente do DM. A sociedade atual apresenta uma dieta com maior ingestão de ácidos graxos saturados, poliinsaturados  $\omega$ -6 e trans. Ao mesmo tempo o consumo de ácidos graxos  $\omega$ -3 diminuiu consideravelmente, principalmente a dieta do ocidente, onde a razão  $\omega$ -6: $\omega$ -3 está entre 20 e 30:1. Esta redução no consumo ocorreu devido à redução no consumo de peixe e aumento de produtos industrializados, como carne de animais alimentados à base de grãos ricos em AGs  $\omega$ -6. À medida que a razão  $\omega$ -6: $\omega$ -3 aumenta, a incidência de DM2 aumenta proporcionalmente, assim como doenças do coração, câncer e outras doenças inflamatórias e autoimunes (Simopoulos, 2001). Em relação ao DM1, estudos recentes relatam a compensação diária de AGs  $\omega$ -3 iniciada no primeiro ano de vida pode ter benefícios contra o desenvolvimento do DM1 e da autoimunidade das ilhotas de Langerhans (Norris et al., 2007; Stene e Joner, 2003). Ainda mais, estudos epidemiológicos demonstram baixa incidência de diabetes em populações com alto consumo de  $\omega$ -3 (De Caterina et al., 2007).

Com base nestes dados, o uso de suplementos alimentares ricos em AGPIs  $\omega$ -3 têm sido encorajados por pesquisadores no mundo todo, como forma de manter ou melhorar a funcionalidade cerebral, bem como prevenir a deterioração do cérebro frente a patologias (Grossfield et al., 2006).

## 1.6. ÓLEO DE PEIXE, ANSIEDADE e DIABETES

O óleo de peixe (OP) é uma das fontes primárias de AGPIs  $\omega$ -3, como o ácido EPA e o DHA, dois compostos presentes nos fosfolipídeos encefálicos, exercendo um papel importante na composição e fluidez das neuromembranas e conseqüentemente possuem efeitos regulatórios em vários sistemas ou sinais de transdução de neurotransmissores (Yehuda et al., 2005; Parker et al., 2006). O conteúdo do DHA no cérebro é muito maior do que a quantidade de EPA, sendo o DHA o principal constituinte dos fosfolipídeos de membrana neuronais. Uma vez que a composição dos ácidos graxos nos fosfolipídeos de membrana é importante para a configuração e função dos receptores de neurotransmissores, tem sido sugerido que o DHA exerce um papel importante na função cerebral. Estudos demonstram a ligação direta deste ácido graxo com um risco reduzido para a doença de Alzheimer, mostrando efeitos positivos sobre a cognição (Morris et al., 2003). O EPA possui funções importantes como mensageiros secundários e neuromoduladores, além de diminuir a liberação de DHA a partir dos fosfolipídeos de membrana (Willumsen et al., 1996; Finnen e Lovell, 1991).

Estes compostos  $\omega$ -3 também possuem atividade antioxidante, tal que estudos relatam que os níveis de NO no encéfalo de ratos diminuíram após uma dieta com  $\omega$ -3 por 14 dias (Bas, et al. 2007). Tais mecanismos antioxidantes devem-se à eficácia do OP em eliminar radicais livres diretamente da membrana plasmática, assim como estimular indiretamente enzimas antioxidantes, como inferido por Singh e colaboradores (2015); neste estudo, o tratamento crônico (90 dias) com óleo de peixe foi capaz de reverter danos cerebrais induzidos por estresse oxidativo, restaurando os níveis de agentes antioxidantes endógenos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH), além de diminuir eficientemente os níveis de LPO. Assim, estudos mostram que a suplementação com OP, que é rico nestes ácidos graxos, melhora a neurotransmissão serotoninérgica no hipocampo e no córtex, induz efeitos antidepressivos e/ou ansiolíticos, além de efeitos neuroprotetores culminando em uma proteção da perda de memória, provavelmente também pelo aumento do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), este importante na neurogênese e neuroplasticidade do cérebro (Song et al., 2003; Vines et al., 2012; Pudell et al., 2014; Redivo et al., 2016).

Além dos efeitos neuroprotetores, o OP demonstrou ser eficaz em inibir a hiperglicemia em ratos diabéticos induzidos com estreptozocina (Linn, et al. 1989). Estudos com ratos mostraram que este óleo pode exercer efeitos benéficos na fisiopatologia do diabetes, uma vez que este preveniu completamente o desenvolvimento da resistência à insulina induzido por uma dieta rica em gordura, efeitos decorrentes da incorporação dos AGs  $\omega$ -3 nos fosfolipídeos do músculo esquelético (Storlien et al., 1987). Um estudo recente *in vitro* demonstrou que o tratamento com EPA foi eficaz em inibir a peroxidação lipídica induzida pela hiperglicemia, em um modelo de vesículas lipídicas de membrana. Este efeito antioxidante é atribuído à habilidade do EPA em bloquear a propagação de ROS que se associam com os lipídeos de membrana, consequentemente eliminando-os e preservando sua estrutura e organização (Mason e Jacob, 2015).

Os fatos citados acima embasam a hipótese de que a alimentação pode modular diversas funções no organismo, pois neste caso, a dieta pobre em  $\omega$ -3 tem sido relacionada com o aumento na incidência de doenças como o diabetes e neuropsiquiátricas (Molendi-Coste et al., 2011).

## **1.7. JUSTIFICATIVA**

Embora existam drogas disponíveis para tratamento de transtornos de ansiedade para os pacientes diabéticos (p.ex. antidepressivos), muitos pacientes são intolerantes aos efeitos adversos (o que acarreta diminuição da qualidade de vida ou abandono do tratamento), apresentam resposta insatisfatória a estes medicamentos ou apresentam o agravante de que muitas dessas drogas alteram a glicemia, piorando ainda mais o quadro hiperglicêmico. Portanto, a pesquisa de compostos alternativos para o tratamento da ansiedade associada ao diabetes adquire grande importância.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1. Objetivo geral:**

Investigar o efeito do tratamento prolongado com óleo de peixe em animais diabéticos submetidos a diferentes testes de ansiedade avaliando o possível envolvimento da via nitriérgica.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- Avaliação do efeito do tratamento preventivo com óleo de peixe (0, 1 e 3g/kg) em animais com o diabetes induzido pela estreptozotocina (STZ) sobre as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade, nos testes do LCE e TCE.
- Avaliação do efeito da expressão de nNOS em áreas relacionadas a ansiedade, como amígdala, hipocampo e dIPAG através de IHQ.
- Avaliação do envolvimento da via nitriérgica no tratamento preventivo do óleo de peixe em ratos diabéticos com drogas que diminuem ou aumentam a expressão de nNOS (7-NI e L-arginina), sobre as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

**Fish oil prevents rodent anxious states comorbid with diabetes: a putative involvement of nitric oxide modulation.**

Isadora Pozzetti Siba<sup>1</sup>, Mariza Bortolanza<sup>2</sup>, Maria Aparecida Barbato Frazão Vital<sup>1</sup>, Roberto Andreatini<sup>1</sup>, Elaine Aparecida Del Bel<sup>2</sup>, Janaína Menezes Zanoveli<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Coronel H dos Santos Street, s/n, P.O. Box 19031, Curitiba-PR, 81540-990, Brazil.

<sup>2</sup> Faculty of Odontology of Ribeirão Preto, Department of Morphology, Physiology and Stomatology, University of São Paulo, Café Avenue, s/n, 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brazil.

\*Corresponding author: Janaina Menezes Zanoveli (address above)

Fax: +55 41 32262042; Phone: +55 41 3361 1717

E-mail: [janaina.zanoveli@ufpr.br](mailto:janaina.zanoveli@ufpr.br)

## Abstract

Anxiety is highly prevalent in individuals with diabetes, and current treatments are not totally effective in relieving anxiety symptoms and often impair the glucose control. An overproduction of nitric oxide (NO) may contribute with the mechanism that links anxiety and diabetes. Thus, the better understanding of the mechanisms involved along with the search for more effective treatments are extremely urgent. The present study evaluated the effect of preventive chronic treatment with fish oil (FO), a source of omega-3 polyunsaturated fatty acid, and the involvement of nitric pathway on behavioral responses related to anxiety in diabetic animals. For that, prolonged treatment (4 weeks) with FO (0, 1 or 3 g/kg; gavage) was performed before the animals become streptozotocin-diabetic rats (DBT; 60 mg/kg; i.p.) and the treatment continued until complete 8 weeks when animals were submitted to the following anxiety tests – elevated plus maze (EPM) and light/dark box test (LDT). Next, an immunohistochemistry for neuronal NO synthase (nNOS) was performed in brain areas related to anxiety, lateral amygdala (AMY), hippocampus (CA3 region; HIP) and dorsolateral periaqueductal gray (dIPAG). Lastly, to better understand the involvement of the nitric pathway, DBT animals treated with vehicle (VEH) or FO received before the anxiety tests an injection of L-arginine (L-Arg; 200 mg/kg, i.p.), a NO precursor, or 7-nitroindazole (7-NI; 10 mg/kg, i.p.), a nNOS inhibitor. As expected, DBT animals treated with VEH, when compared to normoglycemic (NGL) animals treated with VEH, showed a more pronounced anxiogenic-like response and presented high nNOS levels in the AMY, HIP and dIPAG. Moreover, the injection of 7-NI or L-Arg in these VEH-treated DBT animals induced an anxiogenic-like and anxiolytic-like effect, respectively. The chronic FO treatment (3g/kg; gavage) prevented the anxiogenic-like effect and the impairment on locomotor activity besides improving the high glycaemia levels from DBT animals. Interestingly, FO treatment also prevented the high nNOS levels in the AMY, HIP and dIPAG observed in DBT animals and the previous treatment with both L-Arg and 7-NI abolished the anxiolytic-like effect induced by FO treatment. Altogether, our data support the hypothesis that a dysregulation in the NO production in brain areas as AMY, HIP and dIPAG may contribute with the mechanisms that link anxiety and diabetes, and the prevention of changing in the brain nNOS expression induced by a preventive prolonged treatment with FO may be an important mechanism related to its anxiolytic-like effect.

**Keywords:** streptozotocin; elevated plus maze; omega-3 polyunsaturated fatty acids; neuronal nitric oxide synthase; anxiety.



## 1. Introduction

Anxiety comorbid with diabetes are rising problems that demand immediate research attention. Studies point out that the prevalence of anxiety disorders reaches 60% among diabetic individuals, when compared to non-diabetic population (Grigsby et al. 2002; Maia et al. 2014). Anxiety comorbid with diabetes not only worsen the quality of life but also glycemic control, along with increase in the morbidity and mortality rates (Huang et al. 2011; Maia et al. 2014).

Studying neurobehavioral consequences such as anxiety in preclinical diabetic model can help to elucidate the pathophysiology of this comorbidity and to identify the specific targets for therapy. Streptozotocin is an agent of choice to induce diabetes in animals. It inhibits insulin secretion by specific necrosis of pancreatic beta cells resulting in insulin dependent diabetes (Lenzen, 2008). Previous reports have shown that streptozotocin-diabetic (DBT) animals exhibit a more pronounced anxiety-like behavior when evaluated in different anxiety tests (Aksu et al. 2012; Ates et al. 2014; Gupta et al. 2014; Gambetta et al., 2016). In an attempt to better understand the pathophysiological mechanisms that link diabetes to anxiety, some hypotheses have been proposed (Bellush et al. 1989, 1991; Miyata et al. 2004; Manjarrez et al. 2006; Jia et al. 2014; Ezzeldin et al. 2014; da Silva Dias et al. 2016). Of interest for this study, it has been shown that a dysregulation in the nitric oxide (NO) production plays an important role in the pathophysiology of anxiety (Spiacci et al. 2008; Krass et al. 2010; Barik et al. 2013; Möhler 2012) as well as in the diabetes development (Shankar et al. 1998; Reagan and McEwen 2002; Ding et al. 2000; Yagihashi et al. 1996; Koo and Vaziri 2003; Jang et al. 2003; Comin et al. 2010).

The NO is a short-lived gas produced from its precursor, L-arginine, by nitric oxide synthase (NOS) in response to the influence of excitatory amino acids on NMDA receptors (Moncada and Higgs 1993; Calabrese et al. 2007; Dhir and Kulkarni 2011). The neuronal NOS (nNOS) isoform is constitutive in the central nervous system and located in discrete brain regions. Due to its high liposolubility, NO can diffuse to both pre- and post-synaptic neurons over a considerable distance (Scheighofer and Ferriol 2000; Esplugues 2002) and acts as a retrograde molecule that stimulates the glutamate release in a cGMP-dependent manner (Ko et al. 1999; Choi et al. 2000; Wang et al. 2012) as well as the release of other neurotransmitters as gamma-aminobutyric acid and serotonin in brain areas related to anxiety such as

the hippocampus (HIP; Guimarães et al. 2005; Wegener et al. 2010). Physiologically, NO is involved in neural signaling and synaptic plasticity, regulation of autonomic and osmotic functions and learning and memory (Dawson and Dawson 1998; Da Cunha et al. 2005; Zinn et al. 2009). However, evidence suggest that sustained NO overproduction and the consequent increase of its metabolite, the oxygen free radical peroxynitrite, contributes to inflammation and neural damage observed in several diseases (Gonzalez-Hernandez et al., 2000; Heneka et al. 2013), among them anxiety (Sestakova et al. 2013, Campos et al. 2013, Vila-Verde et al. 2016).

The role of NO and the regulation of nNOS activity in the pathophysiology of anxiety associated with diabetes seems to be a variable and complex phenomena. Preclinical studies show in DBT rats an increase in the expression of nNOS mRNA and also in the nNOS activity in brain areas such as dorsolateral periaqueductal gray matter (dIPAG) and hypothalamic nucleus (Jang et al. 2003; Serino et al. 1998; Wang 1996), brain areas involved in the mediation or modulation of emotional responses. Also, Comin and collaborators (2010) observed that streptozotocin-induced DBT rats exhibited an increase in the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d)-positive neurons, a marker used to visualize NO-producing neurons, in the dentate gyrus of the HIP, striatum, paraventricular nucleus of the hypothalamus, supraoptic nucleus and dIPAG. Although some few studies have investigated the anxiety comorbid with diabetes, no study has been conducted to investigate if the preventive treatment with fish oil (FO), a compound rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids ( $\omega$ 3-PUFAs), would be able to influence the anxiety responses from DBT animals, and if some interaction would occur with the nitrenergic pathway.

A body of translational evidence has implicated dietary deficiency of  $\omega$ 3-PUFAs, including eicosapenaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), in the etiology of different psychiatric disorders as anxiety disorders (Messamore and McNamara 2016). It is known that FO is one of the primary sources of  $\omega$ 3-PUFAs and that EPA and DHA are important compounds present in the encephalic phospholipids, exerting an important role in the composition and fluidity of neuromembranes. Consequently, it presents regulatory effects on diverse neurotransmitter systems (Yehuda et al. 2005; Pudell et al., 2014). In addition, antioxidant and neuroprotective activities have been reported (Abdel-Wahabet al. 2015; Wu et al. 2016). Therefore, the aim of the current study was (i) to explore if a

previous and continuous treatment with FO (8 weeks) would be able to prevent the pronounced anxiogenic-like behavior due to diabetes induction by streptozotocin, (ii) to examine the involvement of NO production in the animals treated or not with FO in brain area such as amygdala, HIP and dIPAG by using immunohistochemistry technique for nNOS expression analysis, and (iii) a possible implication of the nitrenergic pathway in mediating the likely anxiolytic-like effect induced by preventive FO treatment in rodent anxious states comorbid with diabetes.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Animals**

All experiments were conducted in adult male Wistar rats (weighing 150-170 g) provided by the Federal University of Paraná (UFPR) colony. Animals were maintained in a temperature-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) under 12h/12h light/dark cycle (lights on at 7 a.m.) with food and water available *ad libitum*. All animals (four rats/cage) were housed in plastic cages (41 x 32 x 16.5 cm) in which diabetic animals had the shaving changed daily due to polydipsia and polyuria developed by the diabetic condition. Behavioral experiments (elevated plus maze and light-dark box tests) were conducted during the light phase of the cycle (between 9 a.m. and 4 p.m.). All experiments were carried out according to Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for care and use of Laboratory Animals and all efforts were made to minimize the number of animals as well as the animal suffering. All experimental procedures were approved by the local Ethics Committee for Research on Animals UFPR (CEUA/BIO-UFPR; #845).

### **2.2. Drugs**

The following substances were used: Fish Oil (FO, kindly donate by Laboratório Herbarium Botânico S/A, Colombo, Parana, Brazil), Streptozotocin (STZ, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA), sodium citrate (Merck S.A. Indústrias Farmacêuticas, Brazil), precursor of NO synthesis L-arginine (L-arg; Sigma-Aldrich, USA) and neuronal NO synthase (nNOS) inhibitor 7-nitroindazole (7-NI; Sigma-Aldrich, USA). STZ (60 mg/Kg, i.p.) was dissolved immediately before use in citrate buffer (10 mM, pH 4.5). FO (0, 1 or 3 g/Kg) was administered orally (by gavage), L-arg (200 mg/kg, i.p.) was dissolved in sterile saline and 7-NI (10 mg/kg,

i.p.) was dissolved in 10% of tween 80 and sterile saline. The doses were based on previous studies (Redivo et al. 2016; Dias et al. 2015; Volke et al. 1998; Joung et al. 2012).

### **2.3. Chronic preventive treatment with fish oil and induction of diabetes**

The preventive and continuous treatment with FO (8 weeks) consisted on daily single administration of this substance via gavage, between 10 a.m. and 12 a.m.; this routine lasted for 59 days, wherein in the day 28 the animals were submitted to induction of the type 1 diabetes by a single intraperitoneal (i.p.) injection of STZ (60 mg/Kg, i.p.), freshly dissolved in citrate buffer (10 mM, pH 4.5) in overnight fasten rats. The normoglycemic group, a control group run in parallel, received only citrate buffer (10 mM, pH 4.5, equivalent volume). The diabetic condition was confirmed 72 h after the STZ treatment using a drop of blood from the tail vein added to test strips impregnated with glucose oxidase (Accu-Check Active™, Roche). Only rats with blood glucose levels  $\geq 250$  mg/dL were considered diabetic and kept in the study.

### **2.4. Elevated plus-maze (EPM) test**

The EPM test was originally validated by Pellow et al. (1985). The apparatus consisted of two open arms (50 x 10 cm) and two enclosed arms with the same dimensions in the perpendicular position. The both arms were extended from a central platform (a square of 10 cm<sup>2</sup>) and the maze was elevated 50 cm above the floor. After habituation in the experimental room, each animal was gently placed in the central platform with the nose directed to one of the enclosed arms, and during a 5 min test, the spent time in the open arms and the number of entries in the enclosed arms of the EPM was recorded by a video camera. After each experimental session, the maze was cleaned with 5% ethanol solution. Rodents naturally avoid the open arms of the EPM, and anxiolytic compounds typically increase the exploration in these arms without changing the number of enclosed arm entries (Pellow et al. 1985).

### **2.5. The Light-Dark box test (LDT)**

The LDT is another anxiety test based on the innate aversion of rodents to brightly illuminated areas and the conflicting tendency of rodents to explore novel environments (Crawley and Goodwin, 1980). The apparatus consisted a box made of

wood with two chambers of equal dimensions (24 x 24 x 27 cm) divided by a barrier possessing a doorway (10 x 10 cm) through which rats could cross into the two chambers: one painted black, not illuminated, and one painted white and illuminated with a 50 lux light source. The test was conducted according to Vicente and Zangrossi (2014). Briefly, the rats were placed on the light compartment, with the face turned to the door that separates both compartments; after the first transition to the dark compartment, the behavior of the animal was recorded for five minutes by a video camera. During this period, the total time spent in the lit compartment and the number of transitions between the two compartments was measured. Rodents naturally avoid the illuminated areas, and anxiolytic compounds typically increase the exploration in these areas without changing the number of transitions between the compartments. After each experimental session, the box was cleaned with 5% ethanol solution.

## **2.6. Sample collection**

Two hours after the last behavioral experiment (LDT), rats were deeply anesthetized with thiopental (100 mg/kg, Sigma–Aldrich, USA) and rapidly perfused transcardially with 300 ml of cold 0.9% saline solution. Animals were then immediately perfused with a volume of 300–500 ml of 4% paraformaldehyde (pH 7.4; Sigma–Aldrich, USA). Brains were immediately removed, post-fixed in 4% paraformaldehyde for 2 h and cryoprotected in 30% sucrose solution. Brains were snap frozen in isopentane (–40 °C, Sigma–Aldrich, USA) and stored at –80 °C until histological processing.

## **2.7. Tissue processing**

A 30 µm coronal section was processed (in mm from bregma; Paxinos and Watson 2009) using cryostat (LeicaR, model CM1850) throughout the rostrocaudal extent of the amygdala (-2.76 mm), hippocampus (-2,56 mm) and dorsolateral periaqueductal gray (dIPAG, -5.8 mm, -7.64 mm). The tissue were collected with an antifreeze solution and stored at -20<sup>o</sup> until the immunohistochemistry be performed.

## **2.8. Determination of neuronal nitric oxide synthase levels by immunohistochemistry**

Immunohistochemistry was performed to label the neuronal nitric oxide synthase (nNOS), a specific marker of nitrergic neurons (Bortolanza et al. 2015). Antigen recovery was performed by heating sections for 30 min in a water-bath at 60 °C in a 0.1 M citrate buffer solution at pH 6.0. Next, sections were allowed to cool to room temperature for one hour. Inactivation of endogenous peroxidase activity was performed by treating the sections for 30 min with 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1 M phosphate-buffered saline containing 0.15% Triton X-100. Non-specific binding sites were blocked using 2% bovine serum albumin (BSA, Jackson Immuno Research, U.S.A.) containing 5% normal rabbit serum for 1 h at room temperature. Following these procedures, free-floating sections were incubated overnight with a 1:15,000 dilution of a sheep anti-nNOS antibody (kindly donated by Prof. Dr. Piers C. Emson, Babraham Institute, Cambridge, U.K.). To detect primary antibodies, the following biotinylated secondary antibodies were applied for 90 min: rabbit anti-sheep for nNOS. All biotinylated secondary antibodies were used at a dilution of 1:400 and were obtained from Vector Laboratories (Burlingame, California, U.S.A.). Sections were incubated in avidin-biotin-peroxidase complex for 120 min (Vector Laboratories) and 3,3'-diaminobenzidine for 5 min (Sigma).

The quantification of nNOS-ir was performed on one side of the brain by an experimentally blind investigator. Three slices of each region were examined within the AMY (lateral quadrant) and HIP (CA3 region), while the dlPAG were analyzed along the rostrocaudal axis. Images were acquired through a 20x objective and digitized with a video camera (Leica DFC420), captured real magnification in gray scale and evaluated with ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov>). For this procedure, a mean gray value of the stain was expressed in arbitrary gray scale units where the scale ranges from 0 to 255 (0 representing the darkest, most intense labeling) to form one density measurement performed in the sections. After this, integrated optical density was calculated by multiplying the selected area with the mean gray value. Sampled areas consisted of regions of interest measuring 0.25 mm<sup>2</sup>. The average gray value from an unstained area was subtracted from each section to correct for background immunoreactivity.

## 2.9. Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was employed to ensure that the data satisfied the criteria for carrying out parametric analysis. When criteria were satisfied the results are reported as mean  $\pm$  standard error mean (SEM). The data obtained from behavioral tests (EPM and LDT) were analyzed by unpaired Student *t* test (to compare normoglycemic and diabetic animals treated with vehicle) and one-way analysis of variance (ANOVA; to compare all different treatments performed in diabetic animals). All immunohistochemistry data were analyzed using one-way ANOVA. When appropriated, Newman-Keuls tests were used for *post-hoc* analyses. Differences were considered statistically significant when  $p \leq 0.05$ .

## 2.10 Experimental procedure

*2.10.1. Evaluation of the preventive treatment with fish oil in diabetic animals submitted to the anxiety tests and its effect over expression of nNOS in the amygdala, hippocampus and dIPAG.*

To evaluate the potential anxiolytic-like effect of fish oil (FO), rats were distributed randomly into 2 groups: normoglycemic (NGL) and diabetic (DBT) animals. The group NGL received vehicle (water), whereas the DBT group was subdivided into the following treatments: vehicle (water) and FO (1 or 3 g/kg). All the treatments were administered orally by gavage, and started four week before the STZ administration, being maintained for additional four weeks after the diabetes induction. On day 58, the rats were subjected to EPM and in the day 59, the animals were submitted to LDT. In these days of behavioral test the FO or VEH treatment occurred after the test. The body weight was evaluated weekly, whereas the blood glucose levels were assessed 3 days after the diabetes induction (day 31) and immediately before the euthanasia (to confirm the maintenance of diabetes and to evaluate the effect of chronic treatment with FO in glucose levels). Two hours after, the animals were euthanized and the brains collected as described previously. The samples were processed and analyzed to the determination of nNOS expression in the amygdala, hippocampus and dIPAG by Immunohistochemistry. For more detail, see Timeline of the experiments (Figure 1).

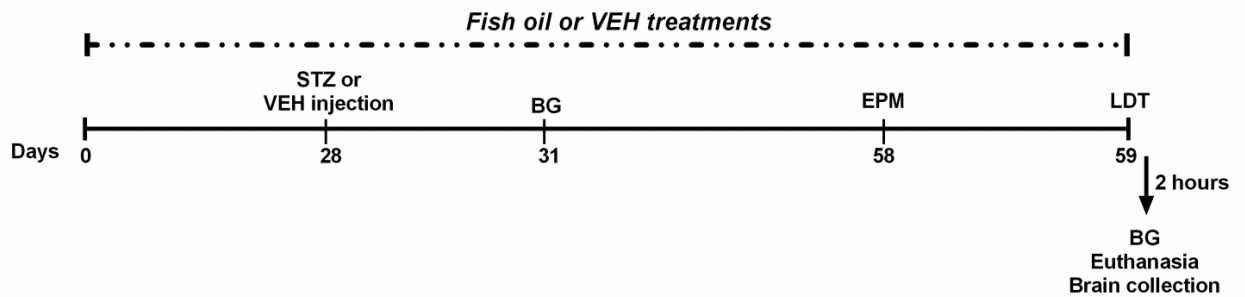


Figure 1 – Timeline of the experiment. Diabetic rats induced by streptozotocin (STZ) were submitted to the preventive and continuous treatment with Fish oil (1 or 3 g/kg) or vehicle (VEH). The elevated plus maze (EPM) was conducted on the 58th day. The light-dark box test (LDT) was conducted in the next day, 59th. Body weight was evaluated weekly and blood glucose levels (BG) were measured on the 31th day and immediately after the behavioural tests (59th day). Two hours after, brains were collected to be further processed to the determination of neuronal nitric oxide synthase levels in brain areas.

### 2.10.2 Evaluation of the nitrinergic pathway involvement in treated diabetic animals with fish oil on anxiety responses.

The same experimental protocol used to the behavioral experiments was applied in this experiment (see Figure 1), except that the DBT animals treated with vehicle or FO were submitted to an injection (i.p.) of L-arg, 7-NI or saline, 30 (7-NI, Saline) or 60 (L-arg) minutes prior to the behavioral experiments. Again, in the days of behavioral test the FO or VEH treatment occurred after the test. The NGL and DBT groups also received an injection of saline (control groups).

## 3. Results

### 3.1. Effect of previous fish oil treatment in diabetic animals submitted to the EPM and LDT.

Unpaired Student *t* test showed that DBT animals treated with vehicle presented a decrease in the time on open arms, an anxiogenic-like effect, when compared to NGL animals [ $t(12)=4.21$ ;  $p\leq 0.05$ ; Fig. 2A]; regarding the locomotor activity, Fig. 2B shows a reduction in the number of enclosed arms entries of DBT/VEH group [ $t(12)=3.02$ ;  $p\leq 0.05$ ; Fig. 2B]. One-way ANOVA showed that the FO treatment (Fig. 2A) altered the anxiety-like response [ $F(2,18)=68.57$ ;  $p\leq 0.05$ ]. Newman-Keuls *post hoc* test showed a significant anxiolytic-like effect when animals were treated with the dose of 1 and 3 g/kg ( $p\leq 0.05$ ) being the more expressive effect when animals were treated with the highest dose of FO. Also, one-way ANOVA showed that FO treatment altered the number of enclosed arms entries [ $F(2,18)=13.94$ ;  $p\leq 0.05$ ; Fig.



2B], *i.e.* while FO (1g/Kg) decreased the number of enclosed arms entries ( $p \leq 0.05$ ), indicative of an impairment of the locomotor activity; the highest dose of FO (3g/Kg) prevented the impairment of locomotor activity ( $p \leq 0.05$ ).

As shown in the Fig.2C the time in the lit compartment was reduced in DBT animals treated with vehicle when compared to NGL animals [ $t(12)=5.84$ ;  $p \leq 0.05$ ] and the number of transitions was also reduced in these DBT animals, indicative of locomotor activity impairment [ $t(12)=3.33$ ;  $p \leq 0.05$ ; Fig. 2D].

One-way ANOVA showed a significant difference between the DBT groups regarding the time spent on lit compartment ( $[F(2,18)=5.24$ ;  $p \leq 0.01$ ]; Fig. 2, panel C) as the number of transitions between these compartments ( $[F(2,18)=9.18$ ;  $p \leq 0.001$ ]; Fig. 2, panel D). Newman-Keuls *post hoc* test showed that the treatment with doses of 1 or 3 g/Kg with FO significantly increased the time on lit compartment when compared with DBT/VEH group, an anxiolytic-like effect ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 2, panel C). As can be seen in the Fig. 2 (panel D) the treatment with FO (1 g/kg) wasn't able to alter the number of transitions from DBT animals ( $p > 0.05$ ); however the highest dose was, indicating an improvement on locomotor activity performance ( $p \leq 0.05$ ).

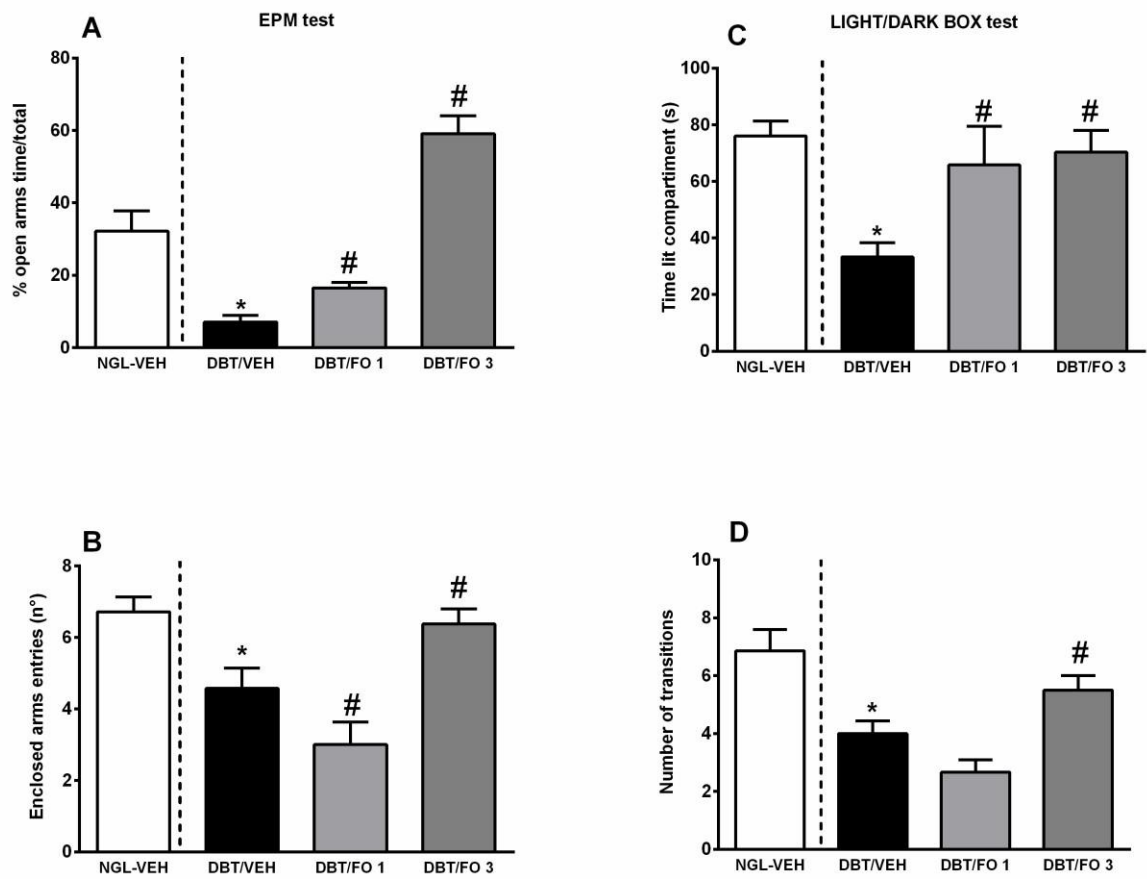


Figure 2 – Effect of preventive fish oil (FO; 1 or 3 g/kg; v.o.) or its respective vehicle (VEH) treatments in diabetic (DBT) rats submitted to the EPM and LDT. The animals were evaluated in the EPM test – spent time (%) in the open arms (panel A) and number of enclosed arms entries (panel B) and in the LDT – spent time in the lit compartment (panel C) and number of transitions (panel D). Values were expressed as mean  $\pm$  SEM of 6-8 animals/experimental group. \* indicates  $p \leq 0.05$  compared to NGL animals treated with VEH and # indicates  $p \leq 0.05$  compared to DBT animals treated with VEH.

### 3.2. Effect of the condition (normoglycemic or diabetic) and/or treatments on blood glucose levels and weight gain.

As shown in the table 1, regarding to glycaemia and weight gain analysis, the unpaired Student *t* test showed difference among NGL and DBT groups treated with vehicle [ $t(12)=29.94$ ;  $p \leq 0.05$ ;  $t(12)=11.98$ ;  $p \leq 0.05$ , respectively]. While one-way ANOVA showed a change in the glycaemia levels [ $F(2,18)=7.85$ ;  $p \leq 0.05$ ], any difference was observed between the treated FO DBT animals on Weight Gain [ $F(2,18)=1.02$ ;  $p > 0.05$ ]. *Post hoc* Newman Keuls test showed a decrease in the glycaemia levels in the DBT/FO 3 animals group compared to DBT/VEH animals group ( $p \leq 0.05$ ).

Table 1 - Effect of condition (normoglycemic-NGL or diabetic-DBT) and/or treatment (fish oil-FO – 1 or 3 g/Kg – or vehicle-VEH) on glycaemia and weight gain.

Condition/Treatment	Glycaemia (mg/dL)	Weight Gain (g)
NGL/VEH	104 ± 3.6	161 ± 4.3
DBT/VEH	575 ± 15.2*	65 ± 6.6*
DBT/FO 1	542 ± 20.6	76 ± 4.1
DBT/FO 3	448 ± 31.5 <sup>#</sup>	75 ± 5.0

Results are expressed as mean ± SEM; n = 6–8, \* $p \leq 0.05$  when compared to NGL/VEH; # $p \leq 0.05$  when compared to DBT/VEH.

### 3.3. Effect of previous fish oil treatment on the nNOS expression in the lateral amygdala.

One-way ANOVA showed a significant difference between the groups regarding the nitrinergic cells in the lateral amygdala ( $[F(2,13)=12.44; p \leq 0.05]$ ; Fig. 3). Newman-Keuls *post-hoc* test demonstrated that DBT/VEH group presented an increase in the nNOS expression compared to NGL-VEH and FO treatment was able to prevent this increase ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 3) on nNOS expression.

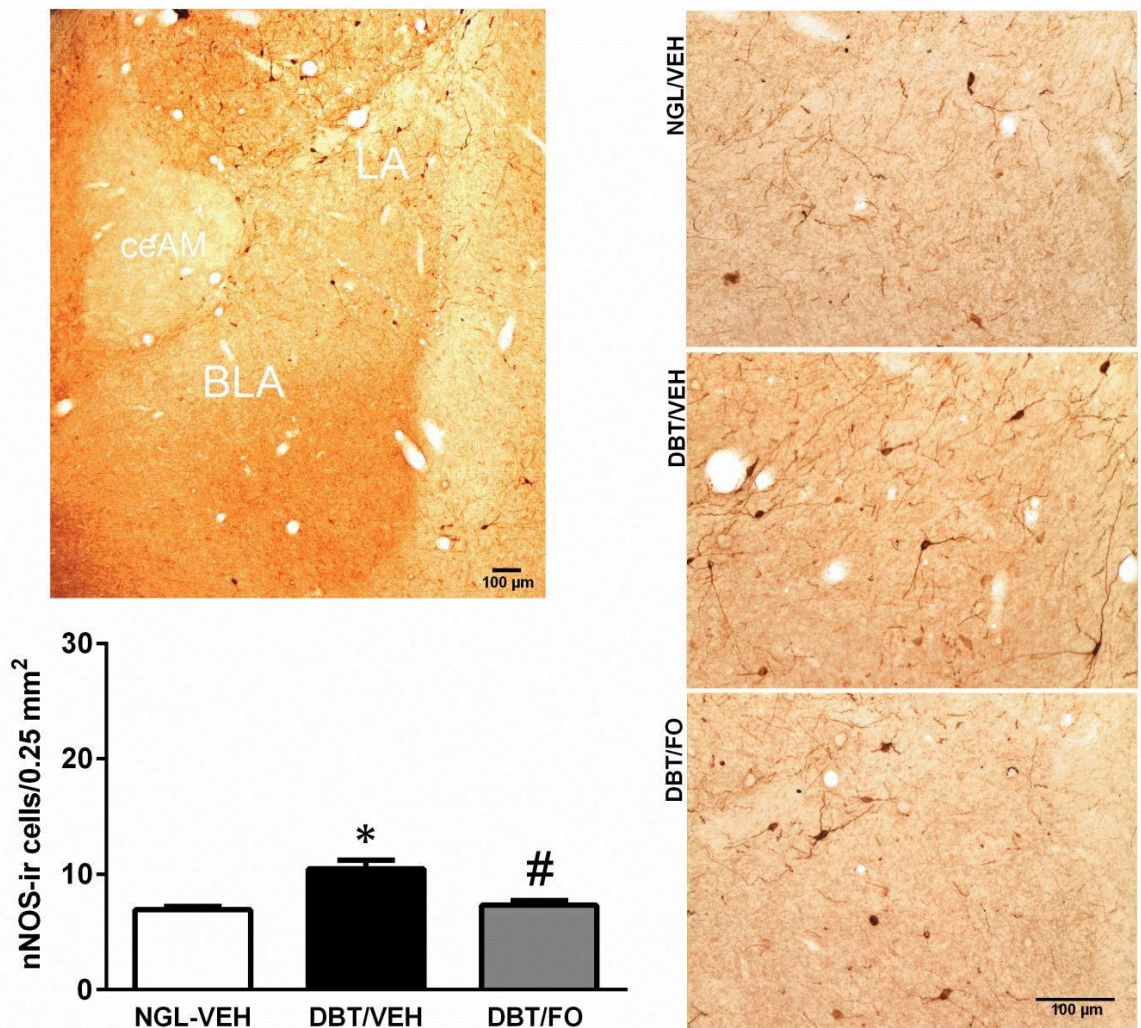


Figure 3. Effect of preventive fish oil (FO; 3 g/kg; v.o.) or vehicle (VEH) treatment on nNOS expression in the lateral amygdala (region marked) of different groups. The values were expressed as the mean  $\pm$  SEM of 5-6 animals/experimental group. \*indicates  $p \leq 0.05$  compared with normoglycemic (NGL) animals treated with VEH and # indicates  $p \leq 0.05$  compared to DBT animals treated with VEH. ceAm – Amygdala central; BLA – basolateral amygdala; LA – lateral amygdala.

### 3.4. Effect of previous fish oil treatment on the nNOS expression in the hippocampus CA3 region.

As shown in the Fig. 4, one-way ANOVA showed a significant difference in the nNOS expression in the hippocampus CA3 region [ $F(2,13)=7.76$ ;  $p \leq 0.05$ ]. Newman-Keuls *post-hoc* test demonstrated that nNOS expression was elevated in the DBT/VEH group compared to NGL/VEH ( $p \leq 0.05$ ) and this increase was prevented by FO treatment ( $p \leq 0.05$ ).



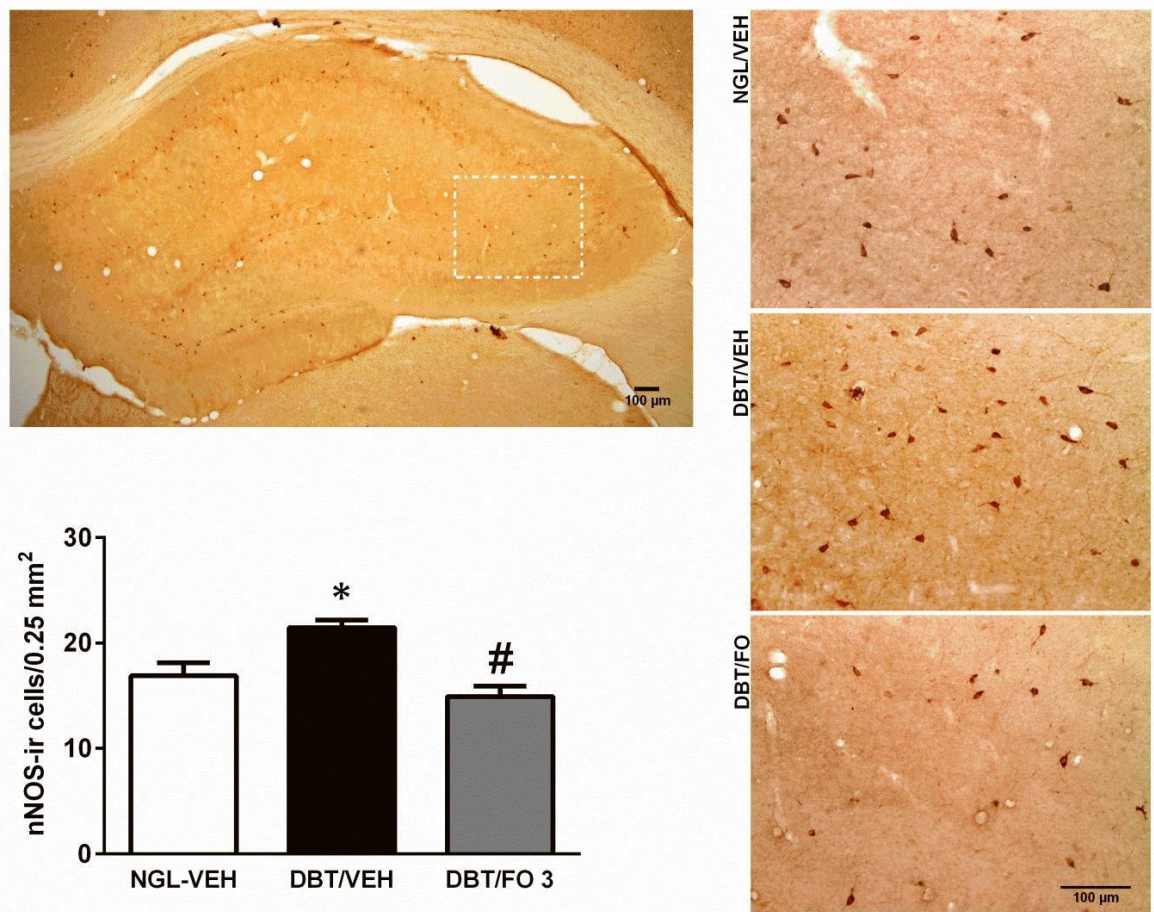


Figure 4. Effect of preventive fish oil (FO; 3 g/kg; v.o.) or vehicle (VEH) treatment on nNOS expression in the hippocampus (CA3 region) of different groups. The values were expressed as the mean  $\pm$  SEM of 5-6 animals/experimental group. \*indicates  $p \leq 0.05$  compared with normoglycemic (NGL) animals treated with VEH and diabetic (DBT) animals treated with FO VEH and # indicates  $p \leq 0.05$  compared to DBT animals treated with VEH.

### 3.5. Effect of previous fish oil treatment on the nNOS expression in the rostral dIPAG.

As can be seen in the Fig. 5, one-way ANOVA showed a significant difference between the groups when immunoreactivity for nNOS was evaluated in the rostral dIPAG ( $[F(2,14)=6.37; p \leq 0.05]$ ; Fig. 5). Newman-Keuls *post-hoc* test demonstrated that the expression of nNOS was increased in DBT/VEH group when compared to NGL/VEH ( $p \leq 0.05$ ) and that FO treatment prevented this increase on nNOS expression ( $p \leq 0.05$ ).

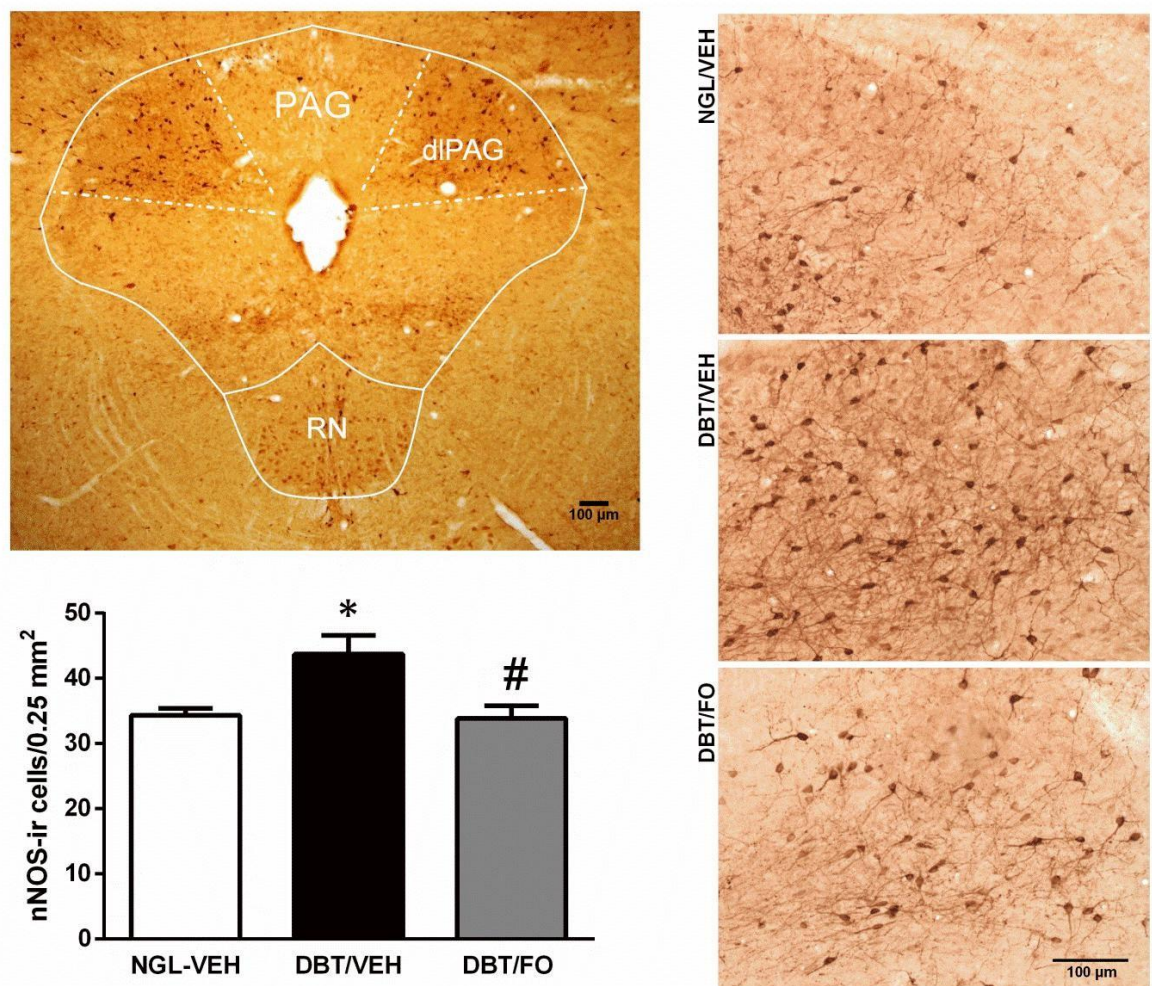


Figure 5. Effect of preventive fish oil (FO; 3 g/kg; v.o.) or vehicle (VEH) treatment on nNOS expression in the dIPAG rostral of different groups. The values were expressed as the mean  $\pm$  SEM of 5-6 animals/experimental group. \*indicates  $p \leq 0.05$  compared with normoglycemic (NGL) animals treated with VEH and diabetic (DBT) animals treated with FO VEH and # indicates  $p \leq 0.05$  compared to DBT animals treated with VEH.

### 3.6. Effect of previous fish oil treatment on the nNOS expression in the medial dIPAG.

One-way ANOVA did not show statistical difference in the medial portion of the dIPAG between the groups ( $F(2,14)=0.88$ ;  $p>0.05$ ).



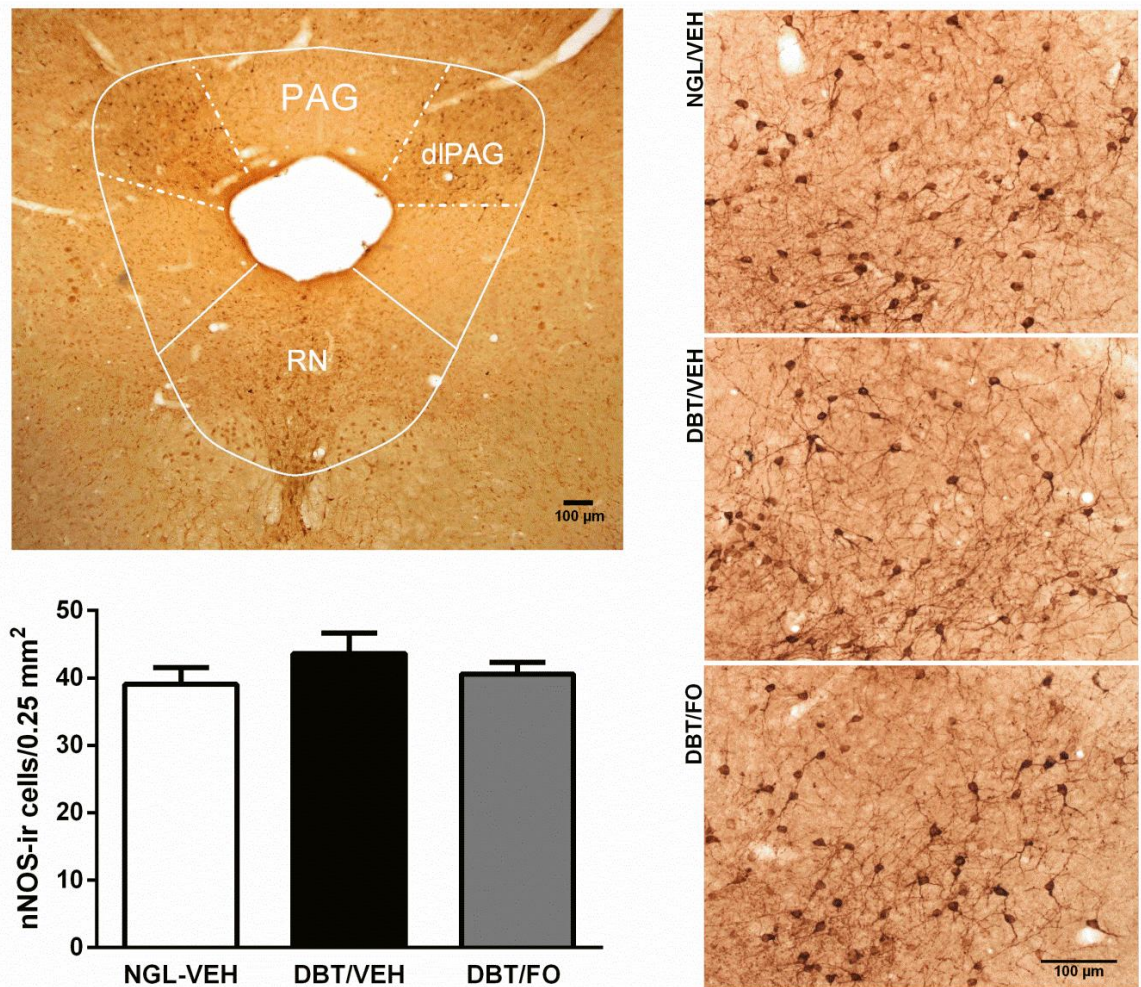


Figure 6. Effect of preventive fish oil (FO; 3 g/kg; v.o.) or vehicle (VEH) treatment on nNOS expression in the dIPAG medial of different groups. The values were expressed as the mean  $\pm$  SEM of 5-6 animals/experimental group.

### 3.7. Effect of treatment with nNOS inhibitor (7-NI) or NO precursor (L-arg) in VEH-treated diabetic animals submitted to the EPM and LDT.

As can be seen in the Fig. 7A, unpaired Student *t* test showed that DBT animals treated with vehicle presented an anxiogenic-like effect when compared to NGL ones, *i.e.* they spent less time in the open arms of EPM [ $t(13)=8.34$ ;  $p\leq 0.05$ ; Fig. 7 panel A]. Also, a decrease in the number of enclosed arms entries was observed [ $t(13)=2.64$ ;  $p\leq 0.05$ ; Fig. 7B].

One-way ANOVA showed difference between the treatments in DBT animals when spent time in open arms was evaluated ( $[F(2,14)=50.15$ ;  $p\leq 0.05$ ]; Fig. 7 panel A) and no difference was observed between the groups on number of entries in enclosed arms ( $[F(2,14)=1.82$ ;  $p>0.05$ ]; Fig. 7, panel B). Newman-Keuls *post hoc* test demonstrated that DBT animals treated with VEH and that received 7-NI presented

an anxiolytic-like effect ( $p \leq 0.05$ ; panel A) while animals that received L-arg presented an anxiogenic-like effect ( $p \leq 0.05$ ; panel A), when compared to DBT animals treated with VEH/SAL.

As shown in the Fig. 7C, the time in the lit compartment was reduced in DBT animals treated with vehicle when compared to NGL animals [ $t(13)=6.38$ ;  $p \leq 0.05$ ] and the number of transitions was also reduced in these DBT animals, indicative of locomotor activity's impairment [ $t(13)=3.74$ ;  $p \leq 0.05$ ; Fig. 7D].

One-way ANOVA showed difference between the diabetic groups when time on lit compartment ( $[F(2,14)=64.44$ ;  $p \leq 0.05$ ]; Fig. 7 panel C) was evaluated, but there was no difference in the number of transitions ( $[F(2,14)=2.02$ ;  $p > 0.05$ ]; Fig. 7, panel D). Newman-Keuls *post hoc* test demonstrated that DBT animals treated with VEH and that received 7-NI presented an anxiolytic-like effect ( $p \leq 0.05$ ; panel C) while animals that received L-arg presented an anxiogenic-like effect ( $p \leq 0.05$ ; panel C), when compared to DBT animals treated with VEH/SAL.



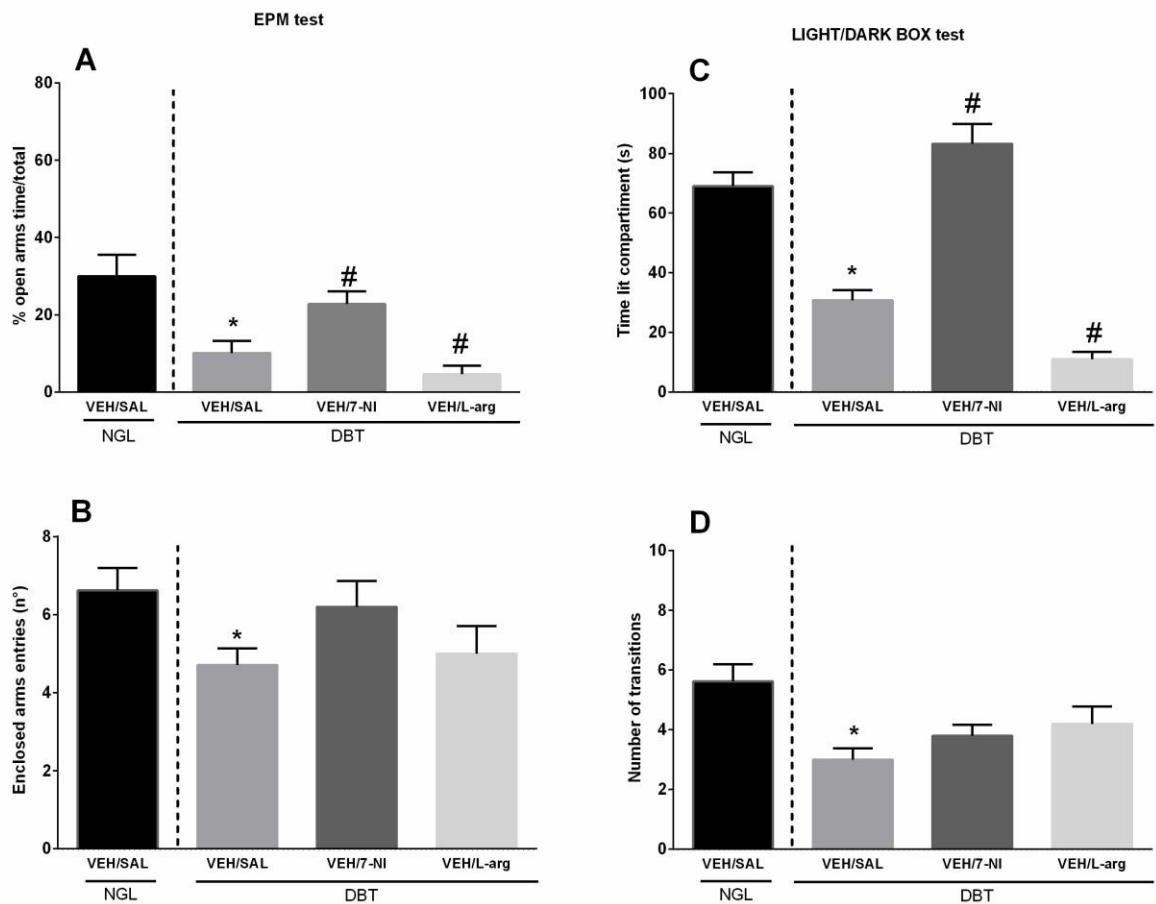


Figure 7. Effect of treatment with L-arg (200 mg/kg; i.p.), 7-NI (10 mg/kg; i.p.) or saline (SAL) in diabetic (DBT) animals treated with vehicle (VEH) on the time spent in open arms (panel A) and number of enclosed arms entries (panel B) during the EPM test and the spent time in the lit compartment (panel C) and number of transitions (panel D) during the LDT. The values were expressed as the mean  $\pm$  SEM of 5-8 animals/experimental group. \* indicates  $p \leq 0.05$  compared to normoglycemic (NGL) animals treated with VEH/SAL, # indicates  $p \leq 0.05$  compared to DBT animals treated with VEH/SAL.

### 3.8. Effect of treatment with nNOS inhibitor (7-NI) or NO precursor (L-arg) in FO-treated diabetic animals submitted to the EPM and LDT.

As can be seen in the Fig. 8A, unpaired Student *t* test showed that DBT animals treated with vehicle presented an anxiogenic-like effect when compared to NGL ones, *i.e.* they spent less time in the open arms of EPM [ $t(18)=6,12$ ;  $p \leq 0.05$ ; Fig. 8 panel A]. Also, a decrease in the number of enclosed arms entries was observed [ $t(18)=3.07$ ;  $p \leq 0.05$ ; Fig. 8B]. One-way ANOVA showed difference between the treatments in DBT animals groups when time in open arms ( $[F(3,32)=29.00$ ;  $p \leq 0.05$ ]; Fig. 8 panel A) or number of entries in enclosed arms ( $[F(3,32)=3.69$ ;  $p \leq 0.05$ ]; Fig. 8, panel B) were evaluated. Newman-Keuls *post hoc* test demonstrated that when compared to DBT/VEH group treated with saline, the DBT/FO group treated with

saline presented a pronounced anxiolytic-like effect ( $p \leq 0.05$ ). The injection of 7-NI or L-arg in DBT/FO group induced an anxiogenic-like effect when compared to DBT/FO group treated with saline ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 8, panel A). Newman-Keuls *post hoc* test also demonstrated in the DBT/FO group treated with saline prevented the impairment on locomotor activity ( $p \leq 0.05$ ; Fig 8, panel B).

As shown in the Fig. 8C the time in the lit compartment was reduced in DBT animals treated with vehicle when compared to NGL animals [ $t(17)=8.25$ ;  $p \leq 0.05$ ] and the number of transitions was also reduced in these DBT animals, indicative of locomotor activity's impairment [ $t(17)=3.90$ ;  $p \leq 0.05$ ; Fig. 8D]. One-way ANOVA showed difference between the diabetic groups when time on lit compartment ( $[F(3,31)=37.66$ ;  $p \leq 0.05$ ]; Fig. 8 panel C) or number of transitions ( $[F(3,31)=5.01$ ;  $p \leq 0.05$ ]; Fig. 8, panel D) were evaluated. Newman-Keuls *post hoc* test demonstrated that DBT/FO group treated with saline presented an anxiolytic-like effect when compared to DBT/VEH group treated with saline ( $p \leq 0.05$ ). 7-NI or L-arginine injection in the DBT/FO animals group blocked this anxiolytic-like effect ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 8, panel C). Newman Keuls *post hoc* test demonstrated an increase in the number of transitions when DBT-FO animals treated with saline were compared to DBT-VEH animals treated with saline, indicative of an improvement on locomotor activity ( $p \leq 0.05$ ; panel D).

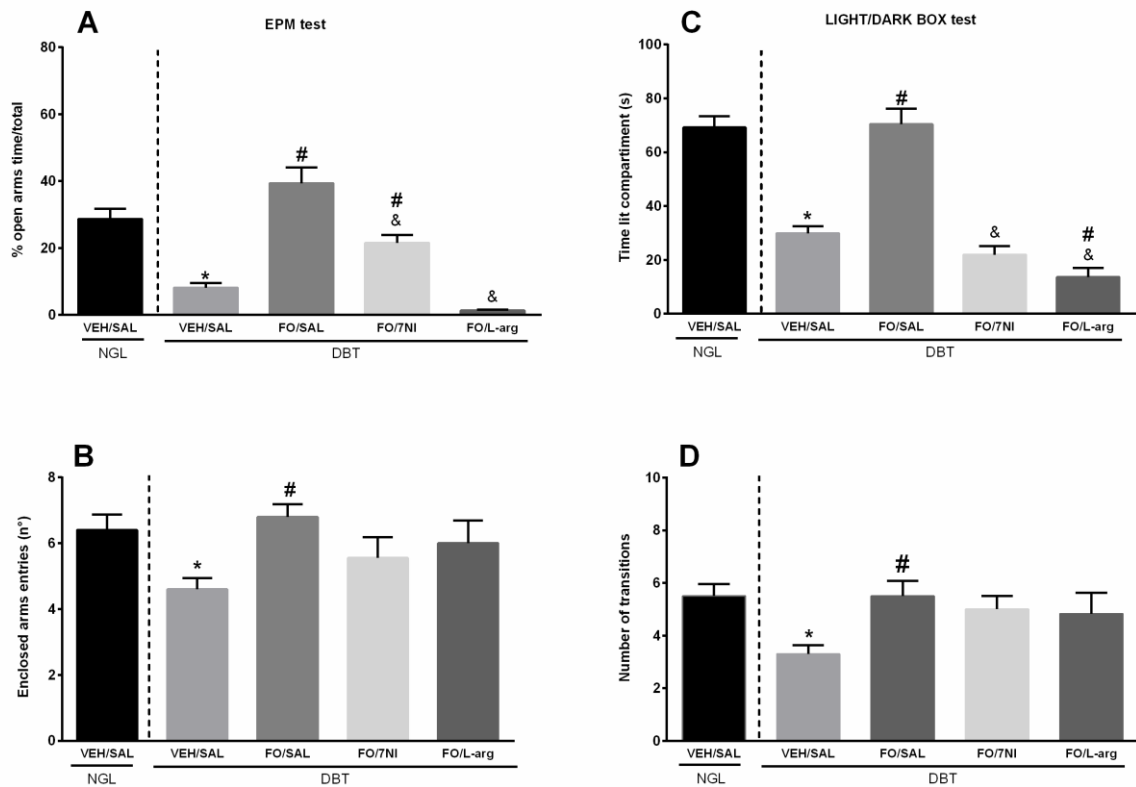


Figure 8. Effect of treatment with L-arg (200 mg/kg; i.p.), 7-NI (10 mg/kg; i.p.) or saline (SAL) in diabetic (DBT) animals treated with fish oil (FO; 3 g/kg; v.o.) on the time spent in open arms (panel A) and number of enclosed arms entries (panel B) during the EPM test and the spent time in the lit compartment (panel C) and number of transitions (panel D) during the LDT. The values were expressed as the mean  $\pm$  SEM of 7-9 animals/experimental group. \* indicates  $p \leq 0.05$  compared to normoglycemic (NGL) animals treated with vehicle (VEH), # indicates  $p \leq 0.05$  compared to DBT animals treated with VEH/SAL and & indicates  $p \leq 0.05$  compared to DBT animals treated with FO/SAL.

#### 4. Discussion

The present study demonstrates for the first time that a prolonged FO treatment is effective in preventing anxiety-like behavior associated with diabetes in streptozotocin-induced DBT rats, and that nitric pathway may be involved in the mechanism related to its anxiolytic-like effect. Chronic diabetic state during 4 weeks developed a more pronounced anxiety-like responses as indicated by enhanced aversion to elevated and open arms and to brightly illuminated light area in EPM and LDT, respectively. On the other hand, the preventive chronic and continuous treatment with FO reversed the anxiety-like behavior anomaly as a consequence of diabetes. Moreover, this treatment prevented the elevated nNOS expression in brain areas related to anxiety and had its anxiolytic-like effect blocked by the NO precursor injection.

Using the animal model of type 1 diabetes by streptozotocin injection studies has demonstrated that these hyperglycemic rodents exhibit increased anxiety-like behaviors in different paradigms, such as the social interaction test, the OFT, elevated T maze, contextual conditioned fear and the EPM tests (Can et al. 2011; Aksu et al. 2012; Ates et al. 2014; Gupta et al. 2014; Gambeta et al. 2016). Corroborating previous findings from our laboratory (Gambeta et al. 2016), the present study showed that DBT rats treated with VEH, when compared to normoglycemic rats, exhibited a more pronounced anxiogenic-like behaviors. In addition and according to previous studies (Can et al. 2011; Aksu et al. 2012; Ates et al. 2014; Gupta et al. 2014; de Moraes et al. 2014; Gambeta et al. 2016; Redivo et al. 2016), DBT animals presented hyperglycemia and reduced weigh gain. The prolonged FO treatment was able to prevent the anxious states related to diabetes when FO-treated DBT animals were evaluated in the EPM and LDT, being the result more evident when the highest dose (3 g/kg) was applied. Moreover, in the current study showed a significant impairment in the locomotor activity which was prevented only after the FO treatment in the highest dose. Thus, in all subsequent experiments only the highest dose was applied. It is important to mention that both employed anxiety tests evoke ethological responses to different forms of external threats (open arms raised off the floor and bright light), which generate an inherent conflict between their exploratory drive and their avoidance of threats (Pellow et al. 1985). The anxiolytic-like effect of FO has already been demonstrated previously in non-DBT animals (Ferraz et al. 2011; Pudell et al. 2014; Mizunoya et al. 2013).

Concerning the activity locomotor performance of DBT animals, different results have been shown by our and different groups (de Moraes et al. 2014; da Silva Dias et al. 2016; Gambeta et al. 2016; Redivo et al. 2016; Comin et al. 2010; Bagatini et al. 2014; Gupta et al. 2014). While in some studies no significant difference has been observed (de Moraes et al. 2014; Gupta et al. 2014; da Silva Dias et al. 2016; Gambeta et al. 2016), in others (Comin et al. 2010; Bagatini et al. 2014; Redivo et al. 2016) as in the current study it was observed. Thereby, the present results showed that DBT animals treated with VEH, when compared to normoglycemic ones, presented a reduction in the number of enclosed arms entries and in the number of transitions between light/dark compartments when evaluated in the EPM and LDT, respectively. These apparently discrepant results may be the result of differences among experimental procedure, species used, type of treatments, if it is acute or

chronic, and even the drug administration route chosen. However, it is important to highlight that the highest dose of FO (3 g/kg) was able to prevent the locomotion impairment of these animals and to induce a significant decrease in the high levels of glycemia from these animals, in spite of not changing the reduced weight gain.

Previous data conducted by our group have shown that a severe glycemic control with insulin may be important to improve comorbid anxiety and DBT condition *per se*, but it is not essential to improve anxiety responses induced by diabetes since ineffective doses of insulin for glycemic control was also able to improve anxiety-related responses in DBT animals (Gambeta et al. 2016). Morais et al. (2014) also showed that prolonged treatment with the antioxidant vitamin E in DBT animals as well as the antidepressant imipramine improved depression-related behavior and some evaluated parameters of oxidative stress, but these treatments were not able to induce a reduction in the hyperglycemia. Thus, a severe control of hyperglycemia or even an improvement in its high levels seems not to be essential for reversing or preventing anxious states comorbid with diabetes, which lead us to explore other possible mechanisms involved, such as the involvement of nitrenergic pathway.

In that sense, in the next set of experiment we were interested in investigating if nitrenergic system would be changed in brain areas related to anxiety - AMY, HIP and dlPAG; moreover if the preventive FO treatment would be able to interact with the NO pathway. These brain areas were selected because they express NO-producing neurons and are primarily involved in the hormonal, cognitive and emotional functions which are affected by diabetes (Vincent et al. 1992; Yu et al. 1999; Jang et al. 2003; Comin et al. 2010; Rebolledo-Solleiro et al. 2016). Thus, we demonstrated a higher immunoreactivity of cells containing nNOS in VEH-treated DBT animals in the lateral AMY, hippocampal CA3 region and in the dlPAG rostral. It is known that AMY is a brain area presenting a central role in the neuroanatomical circuits that coordinate different defensive responses (Graeff et al. 1993; Guimarães et al. 2005) and that plays a central role in the acquisition of learned-fear behaviors (LeDoux 1990; Fanselow and LeDoux 1999; Bauer et al. 2000; Blair et al. 2001) and also in the expression of innate anxiety-like behaviors (McHugh, et al. 2004; McCool, et al. 2014). Besides AMY, the HIP has also been associated with anxiety (McNaughton and Gray 2000), including CA3 portion (Zhu et al. 2011; Zarrabian et al. 2016; Weeden et al. 2015), along with the dlPAG, a mesencephalic structure that modulates different anxiety responses which are related with different stimulus -

unconditioned and conditioned (Chiavegatto et al. 1998; Carvalho-Netto et al. 2009; Zanoveli et al., 2003; Bejjamini and Guimarães 2006). Regarding to dIPAG, it has been suggested that the rostral and caudal portions of dIPAG mediate differently behavioral responses, *i.e.* while rostral dIPAG seems to mediate preferentially unconditioned defensive behaviors which are more active and explosive behaviors; the caudal dIPAG seems to mediate conditioned defensive behaviors, that involves a more elaborated and cautious behaviors (Souza and Carobrez 2016). Thus, since our data showed an increased nNOS expression in the dIPAG rostral portion, but not in the medial portion, we should observe in these DBT animals a more explosive behavioral response, such as flight and/or fight responses. However, our data did not show that kind of responses, maybe because the mixed nature of the anxiety tests used in the current study. Both the anxiety tests mix two types of aversive stimuli, *i.e.*, one is the unconditioned stimulus by exposure the rodent to open, high and/or light spaces; and the other is the conditioned stimulus because the animal learns to avoidance of this unconditioned stimulus.

Studies conducted in non-DBT animals showed an increase in the density of neurons expressing nNOS in the AMY and in the hippocampal CA3 region in animals submitted to an acute restraint stress (Echeverry et al. 2004), and an increase in the NO production in the dIPAG during active defensive responses and stressful conditions, like predator exposure (Chiavegatto et al. 1998; Carvalho-Netto et al. 2009). Interestingly, anxiolytic-like effects have been observed after inhibition of NO formation in the dIPAG (Oliveira and Guimarães 1999; Echeverry et al. 2004; Bejjamini and Guimarães 2006). Regarding to DBT animals, there are few studies investigating mechanisms related to NO pathway. Among these and according to our data (Jang et al. 2003), it has been reported in the same animal model of diabetes an enhanced nNOS expression in the dIPAG and cerebral cortex as well (Jang et al. 2003), paraventricular and supraoptic nuclei (Serino et al., 1998), while it was reduced in the cerebellum (Yu et al. 2000). Although nNOS is a constitutive enzyme, its expression can be increased by several stimuli. For example, it was observed that an unilateral injury of the cerebral cortex or HIP induced a bilateral appearance of NADPH-d in some pyramidal neuronal and in glial cells of both structures (Regidor et al. 1993). Wu (1993) showed an increased expression of NOS in injured spinal cord neurons. Ishida et al. (2001) found an increased number of NOS neurons in the brain of hypoxic–ischemic neonatal rats. It seems that a non-physiological increase in the

NO production is related to the pathological conditions as observed in the present study with DBT animals.

In that sense, evidence has shown that a NO overproduction contributes to inflammation and neural damage (Heneka et al. 2013; Campos et al. 2013; Vila-Verde et al. 2016). It is known that the increase of neuroinflammation releases proinflammatory cytokines, which activate the indoleamine 2,3-dioxygenase, an enzyme that participates of the tryptophan metabolism leading to a decrease of serotonin levels and an increase of the neurotoxic kynurenine metabolites formation including quinolinic acid, an agonist of NMDA receptors (Dantzer et al. 2008; Maes et al. 2011; Dobos et al. 2012). The activation of NMDA receptor, that opens the  $CA^{+2}$  channels, leads to the production of NO. Consequently, higher NO concentrations are produced further aggravating the neural damage (Heneka et al. 2013; Campos et al. 2013; Vila-Verde et al. 2016). Indeed, previous data from our laboratory showed the involvement of oxidative stress on behavioral responses, *i.e.* DBT animals presented elevated lipid peroxidation product and reduced glutathione levels together with elevated catalase and superoxide dismutase activities in the prefrontal cortex and HIP, two brain areas involved in the mediation of the emotions (de Moraes et al. 2014). Furthermore, it was shown that DBT rats exhibited a significant increase of proinflammatory cytokines levels, indoleamine 2,3-dioxygenase expression and a decrease of serotonin levels in HIP from these DBT animals, indirectly suggesting that there was an increase in the formation of neurotoxic kynurenine metabolites including quinolinic acid (da Silva Dias et al. 2016). All these data along with the present data showing an increased nNOS expression in AMY, HIP and dIPAG lead us to suggest that an increased NO production is taking place in these brain regions and that all of these mechanisms appear to be related. However, the functional consequences of such increase needs to be better clarified. Importantly, the FO treatment (3g/kg) was effective in preventing the elevated density of neurons expressing nNOS in the AMY, HIP and dIPAG from DBT rats. That protective effect on NO levels in the HIP of animals treated with  $\omega$ 3-PUFAs had already been noticed using another disease model, cerebral ischemia model (Bas et al. 2007).

Given that DBT animals presented an increase in the nNOS expression in brain areas involved in the pathophysiology of anxiety, in the next set of experiments we evaluated the effect of the NO precursor L-Arg and nNOS inhibitor 7-NI injections in DBT animals treated with VEH to study the involvement of nitrenergic pathway on the

anxiogenic-like response observed in these DBT animals. As expected, our data showed that L-Arg (200 mg/kg, ip) was capable of worsen the anxiety-like state of these animals, while 7-NI blocked the anxiogenic-like effect induced by the DBT condition. Our next concern was to determine whether there would be some kind of synergism on the anxiolytic-like effect by association of treatments, FO with the inhibitor of nNOS. Further, if the NO precursor would reverse the anxiolytic-like effect induced by preventive treatment at FO. As expected, our data showed that L-Arg (200 mg/kg, ip) was capable of abolishing the anxiolytic-like effect of FO. On the other hand, 7-NI did not potentiate the anxiolytic-like effect of FO, as expected, but also abolished the anxiolytic-like effect of FO treatment. Here, it is important to remember that FO treatment was able to prevent the increased nNOS expression in the brain. Thus, we hypothesized that 7-NI (10 mg/kg) induced an under physiological inhibition of nNOS in FO-treated DBT animals once these animals already had nNOS expression in its basal levels. In addition, a large number of other studies conducted in non-DBT animals have already documented anxiolytic-like effects induced by NOS inhibitors such as L-NAME (Oliveira, et al. 2000; Morato, et al. 2004; Del Bel, et al. 2005) and anxiogenic-like effects after NO precursor injection by systemic or central route (Kurt et al. 2004; Roohbakhsh et al. 2007).

However, some *in vivo* studies on the role of NO in the pathophysiology of epilepsy have revealed contradictory results. The effects of nNOS inhibition varies from anticonvulsive to proconvulsive (Del-Bel et al. 1997, Itoh and Watanabe 2009) or from neuroprotective to toxic (Silverman 2009, Calabrese et al. 2007). The opposite actions of nNOS inhibition might not only be related to the model, dosage, specificity and application protocol but also to other systemic effects of the nNOS inhibitor *in vivo*. Furthermore, NO has been proposed to significantly modulate motor and emotional behavior (Araki et al. 2001, West et al. 2002, Del Bel et al. 2005, Volke et al. 2003, Miguel and Nunes-de-Souza 2008). However, molecular mechanisms of these actions are not well understood.

Traditional behavioral tests, such as the OF test measure an animal's responsiveness to a novel environment. The behavior in the OF is complex and may include components of arousal, novelty seeking, fear response and stereotypy (Kas et al. 2008). Administration of 7-NI at the dose of 25 mg/kg *i.p.* suppressed locomotion, exploratory rearing and grooming behavior 30 min after drug administration. In the test performed at 240 min the drug failed to reveal a similar



effect, suggesting that 7-NI suppressed transiently the OF behavior. Our data are in agreement with a previous study showing that 7-NI (10 mg/kg) induced decrease in locomotion in adult rats when tested 40 min after the administration (Volke et al. 1997). Similarly, in mice 7-NI at the dose of 120 mg/kg reduced motor activity 1 h following administration, but faded away 3 h later (Dzoljic et al. 1997a). Finally, 7-NI suppressed time spent in the center part of the arena as well as rearing and grooming behavior at both intervals indicating an increase in anxiety/fear emotionality. It is conceivable that the suppression of behavioral profile actually indicate a rather an anxiogenic-like effect. In this respect our results are in contradiction with studies indicating that 7-NI possesses an anxiolytic-like effect in both rats and mice (Dunn et al. 1998, Volke et al. 2003, Yildiz et al. 2000). Decrease in all behavioral parameters, except grooming was observed in control animals, but not in 7-NI treated animals, which might indicate inability of the 7-NI treated animals to adapt to novel environment with repeated exposure to OF.

Taken together, our data support the hypothesis that a dysregulation in the NO production in brain areas such as AMY, HIP and dIPAG may contribute with the mechanisms that link anxiety and diabetes, and the prevention induced by a prolonged treatment with FO in changing nNOS expression in the brain may be an important mechanism related to its anxiolytic-like effect.

### **Conflict of interest**

The authors declare they have no conflicts of interest to disclose.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank the Laboratório Herbarium Laboratório Botânico S/A for kindly donation of fish oil. Also, we thank Jessica Bittar Camargo for technical assistance. Isadora Pozzetti Siba is a recipient of CAPES scholarship.

## 5. References

- Abdel-Wahab, B.A., Shaikh, I.A., Khateeb, M.M., Habeeb, S.M., 2015. Omega 3 polyunsaturated fatty acids enhance the protective effect of levetiracetam against seizures, cognitive impairment and hippocampal oxidative DNA damage in young kindled rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 135:105-13. doi:10.1016/j.pbb.2015.05.020.
- Akbarzadeh, A., Norouzian, A., Mehrabi, D., Jamshidi, M., Farhangi, S., Verdi, A., Mofidian, A.A., Rad, S., 2007. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J. Clin. Biochem.* 22, 60–64.
- Aksu, I., Ates, M., Baykara, B., Kiray, M., Sisman, A.R., Buyuk, E., Cetinkaya, C., Gumus, H., Uysal, N., 2012. Anxiety correlates to decreased blood and prefrontal cortex IGF-1 levels in streptozotocin induced diabetes. *Neurosci Lett.* 531(2), 176-81. doi: 10.1016/j.neulet.2012.10.045.
- Arancio, O., Kiebler, M., Lee, C.J., Lev-Ram, V., Tsien, R.Y., Kandel, E.R., Hawkins, R.D., 1996. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell.* 87(6), 1025-35.
- Ates, M., Dayi, A., Kiray, M., Sisman, A.R., Agilkaya, S., Aksu, I., Baykara, B., Buyuk, E., Cetinkaya, C., Cingoz, S., Uysal, N., 2014. Anxiety- and depression-like behavior are correlated with leptin and leptin receptor expression in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biotech Histochem.* (3), 161-71. doi: 10.3109/10520295.2013.825319.
- Bagatini, P.B., Xavier, L.L., Neves, L.T., Saur, L., Barbosa, S., Baptista, P.P.A., Augustin, O.A., Nunes de Senna, P., Mestriner, R.G., Souto, A.A., Achaval, M., 2014. Resveratrol prevents akinesia and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats. *Brain Res.* 1592, 101–112.
- Barik, J., Marti, F., Morel, C., Fernandez, S.P., Lanteri, C., Godeheu, G., Tassin, J.P., Mombereau, C., Faure, P., Tronche, F., 2013. Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons. *Science.* 339(6117), 332-335. doi: 10.1126/science.
- Bas, O., Songur, A., Sahin, O., Mollaoglu, H., Ozen, O.A., Yaman, M., Eser, O., Fidan, H., Yagmurca, M., 2007. The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurochem Int.* 50(3), 548-554.
- Bauer, E.P., Schafe, G.E., LeDoux, J.E., 2000. Different induction protocols recruit NMDA and L-type calcium channel-dependent LTP in the lateral amygdala: Correlation with fear memory. *Soc. Neurosci. Abs.* 26, 1253.
- Beijamini, V., Guimarães, F., 2006. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. *Brain Research Bulletin* 69, 347–355.
- Bellush, L.L., Rowland, N.E., 1989. Stress and behavior in streptozotocin diabetic rats: biochemical correlates of passive avoidance learning. *Behav Neurosci.* 103(1), 144-150.
- Bellush, L.L., Reid, S.G., North, D., 1991. The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. *Physiol Behav.* 50(5), 973-981.
- Blair, H.T., Schafe, G.E., Bauer, E.P., Rodrigues, S.M., LeDoux, J.E., 2001. Synaptic Plasticity in the Lateral Amygdala: A Cellular Hypothesis of Fear Conditioning. *Learn Mem.* 8(5), 229-242.
- Bortolanza, M., Cavalcanti-Kiwiatkoski, R., Padovan-Neto, F.E., da-Silva, C.A., Mitkovski, M., Raisman-Vozari, R., Del-Bel, E., 2015. Glial activation is associated with L-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 73, 377-387.
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D.A., Stella, A.M., 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 8(10), 766-775.

- Campos, A.C., Piorino, E.M., Ferreira, F.R., Guimaraes, F.S., 2013. Increased nitric oxide-mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortex is associated with the long lasting anxiogenic-like effect of predator exposure. *Behav Brain Res.* 256, 391–397.
- Can, O.D., Oztürk, Y., Ozkay, U.D., 2011. Effects of insulin and St. John's wort treatments on anxiety, locomotory activity, depression, and active learning parameters of streptozotocin-diabetic rats. *Planta Med.* 77, 1970–1976.
- Carvalho-Netto, E.F., Gomes, K.S., Amaral, V.C., Nunes-de-Souza, R.L., 2009. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. *Psychopharmacology (Berl)*. 204(4), 617-625.
- Chen, H.C., Chien, W.C., Chang, M.Y., Hsieh, M.Y., Lai, M.D., Maa, M.C., Leu, T.H., 2015. The iNOS/Src/FAK axis contributes to lithium chloride-mediated macrophage migration. *Nitric Oxide.* 1(47), 58-64.
- Chiavegatto, S., Scavone, C., Canteras, N.S., 1998. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. *Neuroreport.* 9, 571–576.
- Choi, Y.B., Tenneti, L., Le, D.A., Ortiz, J., Bai, G. Chen, H.S., Lipton, S.A., 2000. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci* 3(1), 15-21.
- Comin, D., Gazarini, L., Zanoni, J.N., Milani, H., de Oliveira, R.M., 2010. Vitamin E improves learning performance and changes the expression of nitric oxide-producing neurons in the brains of diabetic rats. *Behav Brain Res.* 210(1), 38-45. doi: 10.1016/j.bbr.2010.02.001.
- Crawley, J., Goodwin, F.K., 1980. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 13, 167-70.
- Cunha, I.C., José, R.F., Orlandi, L.P., Pimenta, J., de Souza, I.O., Reiser, R., Moreno, H., Marino, J.N., Paschoalini, M., Faria, M.S., 2005. The role of nitric oxide in the emotional learning of rats in the plus-maze. *Physiol. Behav* 84, 351–358.
- Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 9(1), 46-56.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., 1998. Nitric oxide in neurodegeneration. *Prog Brain Res.* 118, 215–29.
- Del Bel, E.A., Guimarães, F.S., Echeverry, M.B., Gomes, M.Z., Souza, A.S., Padovan-Neto, F.E., Tumas, V., Barion-Cavalcanti, A.P., Lazzarini, M., Nucci-Da-Silva, L.P., Paula-Souza, D., 2005. Role of nitric oxide on motor behavior. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 371–392.
- Dhir, A., Kulkarni, S.K., 2011. Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide Rev.* 24, 125-131.
- Dias, I.C.S., Carabelli, B., Ishii, D.K., de Moraes, H., de Carvalho, M.C., Rizzo de Souza, L.E., Zanata, S.M., Brandão, M.L., Cunha, T.M., Ferraz, A.C., Cunha, J.M., Zanoveli, J.M., 2015. Indoleamine 2,3-dioxygenase/kynurenine pathway as a potential pharmacological target to treat depression associated with diabetes. *Mol Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-015-9617-0.
- Ding, Y., Vaziri, N.D., Coulson, R., Kamanna, V.S., Roh, D.D., 2000. Effects of simulated hyperglycemia, insulin, and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 279(1), 11-17.
- Dobos, N., de Vries, E.F., Kema, I.P., Patas, K., Prins, M., Nijholt, I.M., Dierckx, R.A., Korf, J., den Boer, J.A., Luiten, P.G, Eisel, U.L., 2012. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of neuroinflammation-induced depression. *J Alzheimers Dis.* 28(4), 905-915.
- Echeverry, M. B., Guimarães, F.S., Del Bel, E. A., 2004. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience.* 125(4), 981-993.

- Esplugues, J. V., 2002. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol.* 135, 1079-1095.
- Ezzeldin, E., Souror, W.A., El-Nahas, T., Soudi, A.N., Shahat, A.A., 2014. Biochemical and neurotransmitters changes associated with tramadol in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biomed Res Int.* 2014, 238780-9. doi: 10.1155/2014/238780.
- Fanselow, M.S., LeDoux, J.E., 1999. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron.* 23, 229–232.
- Ferraz, A.C., Delattre, A.M., Almendra, R.G., Sonagli, M., Borges, C., Araujo, P., Andersen, M.L., Tufik, S., Lima, M.M.S., 2011. Chronic  $\omega$ -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behav. Brain Res.* 219, 116–122. doi:10.1016/j.bbr.2010.12.02
- Gambeta, E., de Souza, C.P., de Moraes, H., Zanoveli, J.M., 2016. Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin. *Metab Brain Dis.* (3),563-571. doi: 10.1007/s11011-015-9770-1.
- Gonzalez-Hernandez, T., Garcia-Marin, V., Perez-Delgado, M.M., Gonzalez-Gonzalez, M.L., Rancel-Torres, N., Gonzalez-Feria, L., 2000. Nitric oxide synthase expression in the cerebral cortex of patients with epilepsy. *Epilepsia.* 41, 1259–68.
- Goyal, S.N., Reddy, N.M., Patil, K.P., Ojha, S., Patil, C.R., Agrawal, Y.O., 2016. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes – A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact.* 244, 49-63. doi:10.1016/j.cbi.2015.11.032.
- Graeff, F.G., Silveira, M.C.L., Nogueira, R.L., Audi, E.A., Oliveira, R.M.W., 1993. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behavioural Brain Research.* 58, 123-131.
- Grigsby, A.B., Anderson, R.J., Freedland, K.E., Clouse, R.E., Lustman, P.J., 2002. Prevalence of anxiety in adults with diabetes: a systematic review. *J Psychosom Res.* 53, 1053–1060.
- Guimarães, F.S., Bejjamini, V., Moreira, F.A., Aguiar, D.C., De Lucca, A.C.B., 2005. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* (29), 1313–1322.
- Gupta, D., Radhakrishnan, M., Kurhe, Y., 2014. Insulin reverses anxiety-like behavior evoked by streptozotocin-induced diabetes in mice. *Metab Brain Dis.* (29), 737–746.
- Heneka, M.T., Wiesinger, H., Dumitrescu-Ozimek, L., Riederer, P., Feinstein, D.L., Klockgether, T., 2011. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* (60), 906–916.
- Huang, E.S., Liu, J.Y., Moffet, H.H., John, P.M., Karter, A.J., 2011. Glycemic control, complications, and death in older diabetic patients: the diabetes and aging study. *Diabetes Care.* (6), 1329-36. doi: 10.2337/dc10-2377.
- International Diabetes Federation, 2014. Diabetes: Facts and Figures <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>. Accessed 29 July 2016.
- Ishida, A., Trescher, W.H., Lange, M.S., Johnston, M.V., 2001. Prolonged suppression of brain nitric oxide synthase activity by 7-nitroindazole protects against cerebral hypoxic-ischemic injury in neonatal rat. *Brain Dev.* (5), 349-54.
- Jang, M.H., Shin, M.C., Koo, G.S., Lee, C.Y., Kim, E.H., Kim, C.J., 2003. Acupuncture decreases nitric oxide synthase expression in periaqueductal gray area of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Neurosci Lett.* 337, 155–8.
- Joung, H.Y., Jung, E.Y., Kim, K., Lee, M.S., Her, S., Shim, I., 2012. The differential role of NOS inhibitors on stress-induced anxiety and neuroendocrine alterations in the rat. *Behavioural Brain Research.* 235, 176– 181.
- Kelley, T.A., Yantis, S., 2010. Neural correlates of learning to attend. *Front Hum Neurosci.* 4, 216. doi: 10.3389/fnhum.2010.00216.

- Ko, G.Y., Kelly, P.T., 1999. Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons, *J. Neurosci.* 19, 6784–6794.
- Koo, J.R., Vaziri, N.D., 2003. Effects of diabetes, insulin and antioxidants on NO synthase abundance and NO interaction with reactive oxygen species. *Kidney Int.* 63, 195-201.
- Krass, M., Rünkorg, K., Wegener, G., Volke, V., 2010. Nitric oxide is involved in the regulation of marble-burying behavior. *Neurosci Lett.* 480(1), 55-8. doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.002.
- Kurt, M., Bilge, S.S., Aksoz, E., Kukula, O., Celik, S., Kesim, Y., 2004. Effect of sildenafil on anxiety in the plus-maze test in mice, *Pol. J. Pharmacol.* 56, 353–357.
- LeDoux, J.E., Cicchetti, P., Xagoraris, A., and Romanski, L.M., 1990. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J. Neurosci.* 10: 1062–1069.
- Lee, J.H., Yang, S.H., Oh, J.M., Lee, M.G., 2010. Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus *J. Pharm. Pharmacol* 62, 1–23.
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 51(2), 216-26.
- Maes, M., Leonard, B.E., Myint, A.M., Kubera, M., Verkerk, R., 2011. The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 35(3), 702-21.
- Maia, A.C., Braga, A.A., Paes, F., Machado, S., Nardi, A.E., Silva, A.C., 2014. Psychiatric comorbidity in diabetes type 1: a cross-sectional observational study. *Rev Assoc Med Bras.* 60, 59–62.
- Manjarrez, G., Herrera, R., Leon, M., Hernandez, R.J., 2006. A low brain serotonergic neurotransmission in children with type 1 diabetes detected through the intensity dependence of auditory-evoked potentials. *Diabetes Care.* 29(1), 73-77.
- Messamore, E., McNamara, R.K., 2016. Detection and treatment of omega-3 fatty acid deficiency in psychiatric practice: Rationale and implementation. *Lipids Health Dis.* 15:25. doi: 10.1186/s12944-016-0196-5.
- Miyata, S., Hirano, S., Kamei, J., 2004. Diabetes attenuates the antidepressant-like effect mediated by the activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the mouse tail suspension test. *Neuropsychopharmacology.* 29, 461–469.
- McCool, B.A., Christian, D.T., Fetzer, J.A., Chappell, A.M., 2014. Lateral/basolateral amygdala serotonin type-2 receptors modulate operant self-administration of a sweetened ethanol solution via inhibition of principal neuron activity. *Front Integr Neurosci.* 30, 8-5.
- McHugh, S.B., Deacon, R.M., Rawlins, J.N., Bannerman, D.M., 2004. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav. Neurosci.* 118, 63–78.
- McNaughton, N., Gray, J.A., 2000. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord.* 61(3), 161-176.
- Mizunoya, W., Ohnuki, K., Baba, K., Miyahara, H., Shimizu, N., Tabata, K., Kino, T., Sato, Y., Tatsumi, R., Ikeuchi Y., 2013. Effect of dietary fat type on anxiety-like and depression-like behavior in mice. *Springerplus.* 2, 165.
- Möhler, H., 2012. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology.* 62(1), 42-53.
- Moncada S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329(27), 2002-12.
- de Moraes, H., de Souza, C.P., da Silva, L.M., Ferreira, D.M., Werner, M.F., Andreatini, R., da Cunha, J.M., Zanoveli, J.M., 2014. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behav Brain Res.* 258, 52-64. doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.011.

- Morato, G.S., Ortiga, R.M., Ferreira, V.M.M., 2004. Involvement of nitric oxide- dependent pathways of dorsolateral periaqueductal gray in the effects of ethanol in rats submitted to the elevated plus-maze test. *Behav. Brain Res.* 153, 341–349.
- Oliveira, R.W., Guimarães, F.S., 1999. Anxiolytic effect of methylene blue microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 1529–1532.
- Oliveira, R.M., Del Bel, E.A., Mamede-Rosa, M.L., Padovan, C.M., Deakin, J.F., Guimarães, F.S., 2000. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neurosci. Lett.* 289, 123–126.
- Paxinos, G., Watson, C., 2009. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. compact 6th ed. Amsterdam: Elsevier.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 14(3), 149-167.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 97, 55-74.
- Pudell, C., Vicente, B.A., Delattre, A.M., Carabelli, B., Mori, M.A., Suchecki, D., Machado, R.B., Zanata, S.M., Visentainer, J.V., de Oliveira Santos Junior, O., Lima, M.M., Ferraz, A.C., 2014. Fish oil improves anxiety-like, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomised rats. *Eur J Neurosci.* 39(2), 266-74. doi:10.1111/ejn.12406.
- Reagan, L.P., McEwen, B.S., 2002. Diabetes, but not stress, reduces neuronal nitric oxide synthase expression in rat hippocampus: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Neuroreport.* 13, 1801–4.
- Rebolledo-Solleiro, D., Araiza, L.F., Broccoli, L., Hansson, A.C., Rocha-Arrieta, L.L., Aguilar-Roblero, R., Crespo-Ramírez, M., Fuxe, K., Pérez de la Mora, M., 2016. Dopamine D1 receptor activity is involved in the increased anxiety levels observed in STZ-induced diabetes in rats. *Behav Brain Res.* 313, 293-301.
- Redivo, D.D.B., Schreiber, A.K., Adami, E.R., Ribeiro, D.E., Joca, S.R.L., Zanoveli, J.M., Cunha, J.M., 2016. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive like-behavior associated with experimental diabetes. *Behavioural Brain Research.* 298, 57-64. doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.058.
- Regidor, J., Montesdeoca, J., Ramirez-Gonzalez, J.A., Hernandez-Urquia, C.M., Divac, I., 1993. Bilateral induction of NADPH-diaphorase activity in neocortical and hippocampal neurons by unilateral injury. *Brain Res.* 631(1), 171-174.
- Roohbakhsh, A., Moghaddam, A.H., Massoudi, R., Zarrindast, M.R., 2007. Role of dorsal hippocampal cannabinoid receptors and nitric oxide in anxiety like behaviours in rats using the elevated plus-maze test, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 223–229.
- Serino, R., Ueta, Y., Tokunaga, M., Hara, Y., Nomura, M., Kabashima, N., Shibuya, I., Hattori, Y., Yamashita, H., 1998. Upregulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia.* 41, 640–648.
- Sestakova, N., Puzserova, A., Kluknavsky, M., Bernatova, I., 2013. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide, *Interdiscip. Toxicol* 6, 126–135.
- Schweighofer, N., Ferriol, G., 2000. Diffusion of nitric oxide can facilitate cerebellar learning: A simulation study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(19), 10661-5.
- Schuman, E.M., Madison, D.V., 1991. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science.* 254(5037), 1503-1506.
- Shankar, R., Zhu, J.S., Ladd, B., Henry, D., Shen, H.Q., Baron, A.D., 1998. Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. *J Clin Invest.* 102, 1403–1412.
- Souza, R.R., Carobrez, A.P., 2016. Acquisition and expression of fear memories are distinctly modulated along the dorsolateral periaqueductal gray axis of rats exposed to predator odor. *Behav Brain Res.* S0166-4328(16)30520-4. doi: 10.1016/j.bbr.2016.08.021.

- Spiacci, A. Jr., Kanamaru, F., Guimarães, F.S., Oliveira, R.M., 2008. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 88(3), 247-255.
- Vicente, M.A., Zangrossi, H. Jr., 2014. Involvement of 5-HT<sub>2C</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. *Neuropharmacology.* 79, 127-135.
- Vila-Verde, C., Marinho, A. L., Lisboa, S. F., Guimarães, F. S., 2016. Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. *Neuroscience.* 320, 30-42.
- Vincent, S. R., Kimura, H., 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46, 755–784.
- Volke, V., Soosaar, A., Koks, S., Vasar, E., Mannisto, P.T., 1998. L-Arginine abolishes the anxiolytic-like effect of diazepam in the elevated plus-maze test in rats. *European Journal of Pharmacology.* 351, 287–290.
- Wang, H., Morris, J.F., 1996. Constitutive nitric oxide synthase in hypothalami of normal and hereditary diabetes insipidus rats and mice: role of nitric oxide in osmotic regulation and its mechanism. *Endocrinology.* 137, 1745–1751.
- Wang, J.Q., Chu, X.P., Guo, M.L., Jin, D.Z., Xue, B., Berry, T.J., Fibuch, E.E., Mao, L.M., 2012. Modulation of ionotropic glutamate receptors and Acid-sensing ion channels by nitric oxide. *Front Physiol.* 3, 164.
- Weeden, C.S., Roberts, J.M., Kamm, A.M., Kesner, R.P., 2015. The role of the ventral dentate gyrus in anxiety-based behaviors. *Neurobiol Learn Mem.* 118, 143-9. doi: 10.1016/j.nlm.2014.12.002.
- Wegener, C., Volke, V., Rosenberg, R., 2000. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. *Br J Pharmacol.* 130, 575-580.
- Wu, W., 1993. Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH diaphorase histochemistry. *Exp Neurol.* 120(2), 153-159.
- Wu, J., Yan, L.-J., 2015. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther* 8, 181-188.
- Wu, Y.Q., Dang, R.L., Tang, M.M., Cai, H.L., Li, H.D., Liao, D.H., He, X., Cao, L.J., Xue, Y., Jiang, P., 2016. Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Alleviates Doxorubicin-Induced Depressive-Like Behaviors and Neurotoxicity in Rats: Involvement of Oxidative Stress and Neuroinflammation. *Nutrients.* 8(4), 243. doi: 10.3390/nu8040243.
- Yagihashi, N., Nishida, N., Seo, H.G., 1996. Expression of nitric oxide synthase in macula densa in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia.* 39, 793–799.
- Yu, W. J., Juang, S.W., Chin, W.T., Chi, T.C., Wu, T.J., Cheng, J.T., 1999. Decrease of nitric oxide synthase in the cerebrocortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett.* 272(2), 99-102.
- Zanoveli, J.M., Nogueira, R.L., Zangrossi, H. Jr., 2003. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *Eur J Pharmacol.* 473(2-3), 153-61.
- Zarrabian, S., Farahizadeh, M., Nasehi, M., Zarrindast, M.R., 2016. The role of CA3 GABA<sub>A</sub> receptors on anxiolytic-like behaviors and avoidance memory deficit induced by NMDA receptor antagonists. *J Psychopharmacol.* 30(2), 215-23. doi:10.1177/0269881115622239.
- Zhu, X., Peng, M., Cheng, M., Xiao, X., Yi, J., Yao, S., Zhang, X., 2011. Hyperthermia protects mice against chronic unpredictable stress-induced anxiety-like behaviour and hippocampal CA3 cell apoptosis. *Int J Hyperthermia.* 27(6), 573-81. doi:10.3109/02656736.2011.587493.
- Zinn, C.G., Bevilaqua, L.R., Rossato, J.I., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M., 2009. On the requirement of nitric oxide signaling in the amygdala for consolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 91, 266-272.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em conjunto, nossos dados demonstram que o tratamento prolongado com OP na dose mais alta (3 g/kg) induziu um efeito tipo ansiolítico nos animais diabéticos. Tal efeito pode ser decorrente da capacidade que o OP apresentou em normalizar os parâmetros basais de nNOS no encéfalo, uma vez que a expressão desta enzima estava consideravelmente aumentada na AMI, HIP e dIPAG rostral no encéfalo de ratos diabéticos tratados com veículo, áreas relacionadas com a neurobiologia da ansiedade associada ao diabetes. É importante ressaltar que o bloqueio da ação ansiolítica do OP pelo tratamento prévio com L-arginina confirmou a interação do OP com a nNOS. No entanto, a expressão de NO influencia a expressão de diversos neurotransmissores, indicando que o aumento de NO parece não ser o único fator envolvido na fisiopatologia da ansiedade associada ao diabetes. Assim, mais estudos são necessários para compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos que relacionam a ansiedade ao diabetes, tal como para elucidar o mecanismo de ação do efeito ansiolítico do óleo de peixe.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS:

AEBERLI, I.; SPINAS, G.A.; LEHMANN, R.; L'ALLEMAND, D.; MOLINARI, L.; ZIMMERMANN, M.B. Diet determines features of the metabolic syndrome in 6- to 14-year-old children. **Int J Vitam Nutr Res.** v. 79, n. 1, p. 14-23. 2009.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J.** n. 357, p. 593-615. 2001.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders** (3rd edn). American Psychiatric Association, Washington, DC, p. 230–232. 1980

AMITAI, Y., Physiologic role for "inducible" nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. **Glia.** v. 58, n. 15, p. 1775-81. 2010.

ANDERSON, R.J.; GRIGSBY, A.B.; FREEDLAND, K.E.; DE GROOT, M.; MCGILL, J.B.; CLOUSE, R.E.; LUSTMAN, P.J. Anxiety and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature. Review. **Int J Psychiatry Med.** v. 32, n. 3, p. 235-47. 2002.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr.** v. 23, n. 4, p. 233-242. 2001.

ASMUNDSON, G.J.; TAYLOR, S.; Smits, J.A. Panic disorder and agoraphobia: an overview and commentary on DSM-5 changes. **Depress Anxiety.** v. 31, n. 6, p. 480-486. 2014.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet.** n. 358, p. 221–9. 2001.

BALDWIN, D. S.; ANDERSON, I. M.; NUTT, D. J. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. **J Psychopharmacol.** v. 19, p. 567–96, 2005.

BEARDSALL, K.; YUEN, K.; WILLIAMS, R.; DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. **Current Paediatrics.** v. 56, n.8, p.127-156. 2006.

BETTIO, L. E. B.; CUNHA, M.P.; BUDNI, J.; PAZINI, F.L.; OLIVEIRA, Á.; COLLA, A.R.; RODRIGUES, A.L. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide–cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behav Brain Res.** v. 234, p. 137-148. 2012.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Glucose and reactive oxygen species, **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** v. 5 , p. 561-568. 2002.

BOSCHEN, M.J. A meta-analysis of the efficacy of pregabalin in the treatment of generalized anxiety disorder. **Can J Psychiatry,** v. 56, n. 9, p. 558-566, 2011.

- BOULTON, A.J.; VILEIKYTE, L.; RAGNARSON-TENNVALL, G.; APELQVIST, J. The global burden of diabetic foot disease. **Lancet**. n. 36, p. 1719-1724. 2005.
- BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**. v. 347, p. 768–770. 1990.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. n. 414, p. 813-20. 2001.
- BUENO, C.H.; ZANGROSSI, H. JR.; VIANA, M.B. The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. **Braz J Med Biol Res**. v. 38, n. 11, p. 1697-701. 2005a.
- BUENO, C.H.; ZANGROSSI, H. JR.; NOGUEIRA, R.L.; SOARES, V.P.; VIANA, M.B. Panicolytic-like effect induced by the stimulation of GABAA and GABAB receptors in the dorsal periaqueductal grey of rats. **Eur J Pharmacol**. v. 516, n. 3, p. 239-46. 2005b.
- BUTALIA, S.; KAPLAN, G.G.; KHOKHAR, B.; RABI, D.M. Environmental Risk Factors and Type 1 Diabetes: Past, Present, and Future. **Can J Diabetes**. n. 15, p. 30052-6. 2016.
- CAMPBELL, A.W. The diabetes pandemic. **Alternative Therapies in Health and Medicine**. v. 17, n. 6, p. 8-9. 2011.
- CERIELLO, A. Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation, **Diabet. Med**. v. 14, p. 45-49. 1997.
- CEYLAN, N. Ö. et al. Alterations in nitric oxide plasma level and arginase activity during the treatment of bipolar depressive episode. **Journal of Mood Disorders**. v.1, p. 1-6. 2011.
- CHAN, O.; INOUE, K.; RIDDELL, M.C.; VRANIC, M.; MATTHEWS, S.G. Diabetes and the hypothalamo-pituitary adrenal (HPA) axis. **Minerva Endocrinol**.v. 28, p. 87–102. 2003.
- CIEŚLAK M, WOJTCZAK A, CIEŚLAK M. Role of pro-inflammatory cytokines of pancreatic islets and prospects of elaboration of new methods for the diabetes treatment. **Acta Biochim Pol**. v. 62, n. 1, p. 15-21. 2015.
- CONTESTABILE, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. **Brain Res**. n. 32, p. 476-509. 2000.
- CRYAN, J.F.; SWEENEY, F.F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **Br J Pharmacol**. v. 164, p. 1129-1161, 2011.
- CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; ARAÚJO FILHO, J. P. Entendendo a Gordura. **Os Ácidos Graxos**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002.

De CATERINA, R.; MASSARO, M. Omega-3 fatty acids and the regulation of expression of endothelial pro-atherogenic and proinflammatory genes. **J. Membr. Biol.** n. 206, p. 103–116. 2005.

DARVILLE MI, EIZIRIK DL. Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter in insulin-producing cells. **Diabetologia.** v. 41, n. 9, p. 1101-8. 1998.

DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; LONDON, E.D.; BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 88, p. 6368–6371. 1991.

DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; SNYDER, S.H. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. **Ann Neurol.** v. 32, p. 297–311. 1992.

DE GROOT, M.; ANDERSON, R.; FREEDLAND, K. E.; CLOUSE, R. E.; LUSTMAN, P. J. Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. **Psychosomatic Medicine.** v. 63, n. 1, p. 619-630, 2001.

DELFINO, V.D.A.; FIGUEIREDO, J.F.; MATSUO, T.; FAVERO, M.E.; MATNI, A.M.; MOCELIN, A.J. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia,** v. 24, n. 1, p. 31-6, 2002.

DHAVALA, H. S.; PANIKKAR, V.; JADHAV, B.S.; GHULGHULE, M.; AGARI, A.D. Depression and diabetes: impact of antidepressant medications on glycaemic control. **J Assoc Physicians India.** v. 61, n. 12, p. 896-899. 2013.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog. Neurobiol.** n. 62, p. 649-671. 2000.

DUNCAN, A.J.; HEALES, S.J.R. Nitric oxide and neurological disorders. **Molecular Aspects of Medicine.** 26, 67-96. 2005.

DU, X.L.; EDELSTEIN, D.; DIMMELER, S.; JU, Q.; SUI, C.; BROWNLEE, M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. **J Clin Invest.** n. 108, p. 1341-8. 2001.

EBADI, M.; SHARMA, S.K. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Antioxid. Redox Signal.** v. 5, p. 319–335. 2003.

ELEAZU, C.O.; ELEAZU, K.C.; CHUKWUMA, S.; ESSIEN, U.N. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **J. Diabetes Metab. Disord.** v. 12, p. 60-67. 2013.

ENGUM, A. The role of depression and anxiety in onset of diabetes in a large population-based study. **J Psychosom Res.** n. 62, p. 31-38. 2007.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. **Chem Phys Lipids**, v.106, n.1, Jun, p.1-29. 2000.

FERREIRA, F.R.; OLIVEIRA, A.M.; DINARTE, A.R.; PINHEIRO, D.G.; GREENE, L.J.; SILVA, W.A. JR.; JOCA, S.R.; GUIMARÃES, F.S. Changes in hippocampal gene expression by 7-nitroindazole in rats submitted to forced swimming stress. **Genes, Brain and Behavior**. v. 11, n. 3, p. 303-13. 2012.

FINNEN, M.J.; LOVELL, C.R. Purification and characterisation of phospholipase A2 from human epidermis. **Biochem Soc Trans**. n. 19, p. 91S. 1991.

FOSSIER, P.; BLANCHARD, B.; DUCROCQ, C.; LEPRINCE, C.; TAUC, L.; BAUX, G. Nitric oxide transforms serotonin an inactive form and this affects neuromodulation. **Neuroscience**. v. 93, n. 2, p. 597-603. 1999.

GALLY, J. A.; MONTAGUE, P.R.; REEKE, G.N. JR.; EDELMAN, G.M. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 87, p. 3547-3551. 1990.

GANELLEN, R.J.; MATUZAS, W.; UHLENHUTH, E.H.; GLASS, R.; EASTON, C.R. Panic disorder, agoraphobia, and anxiety-relevant cognitive style. **J Affect Disord**. v. 11, n. 3, p. 219-225. 1986.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**. v. 336, p. 385–388. 1998.

GARTHWAITE, J., Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **Eur J Neurosci**. v. 27, n. 11, p. 2783-802. 2008.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ. Res**. n. 107, p. 1058-1070. 2010.

GONZÁLEZ, E.; ROSELLÓ-CATAFAU, J.; JAWERBAUM, A.; SINNER, D.; PUSTOVRH, C.; VELA, J.; WHITE, V.; XAUS, C.; PERALTA, C.; GIMENO, M. Pancreatic nitric oxide and oxygen free radicals in the early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. **Braz J Med Biol Res**. v. 33, n. 11, p. 1335-42. 2000.

GOUD, B.J.; DWARAKANATH, V.; CHIKKA, B.K. Streptozotocin – A diabetogenic agent in animal models. **Int. J. Pharm. Res**. n. 3, p. 253-269. 2015.

GOYARY, D.; SHARMA, R. Dietary restriction prevents diabetogenic effect of streptozotocin in mice. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 47, p. 254-6, 2010.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 163, p. 467-476, 2002.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. Jr. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, v. 10, p. 207-217, 2010.

GUIMARÃES, F.S.; DE AGUIAR, J.C.; DEL BEL, E.A.; BALLEJO, G. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitor microinjected into the dorsal central grey. **NeuroReport**. n. 5, p. 1929–1932. 1994.

GUIX, F. X.; et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol**. v. 76, n. 2, p. 126-52. 2005.

GUPTA, S.; CHOUGH, E.; DALEY, J.; OATES, P.; TORNHEIM, K.; RUDERMAN, N.B.; KEANEY, J.F. JR. Hyperglycemia increases endothelial superoxide that impairs smooth muscle cell Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. **Am J Physiol Cell Physiol**. n. 282, p. 560-6. 2002.

GUPTA, M. A. Review of somatic symptoms in post-traumatic stress disorder. **Int Rev of Psychiatry**. v. 25, n. 1, p. 86-99. 2013.

HARATI, Y. Diabetes and the nervous system. **Endocrinol Metab Clin North Am**. n. 25, p. 325–59. 1996.

HARKIN, A.; CONNOR T.J.; WALSH, M.; ST JOHN, N.; KELLY, J.P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**. v. 44, p. 616-623. 2003.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochim Biophys Acta**. v. 1504, p. 196–219. 2001.

HATHOUT, E.H.; BEESON, W.L.; ISCHANDER, M.; RAO, R.; MACE, J.W. Air pollution and type 1 diabetes in children. **Pediatr Diabetes**. n. 7, p. 81–7. 2006.

HOEHN-SARIC, R.; MCLEOD, D.R.; FUNDERBURK, F.; KOWALSKI, P. Somatic symptoms and physiologic responses in generalized anxiety disorder and panic disorder: an ambulatory monitor study. **Arch Gen Psychiatry**. v. 61, n. 9, p. 913-21. 2004.

IADECOLA, C.; ZHANG, F.; XU, S.; CASEY, R.; ROSS, M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab**. v. 15, p. 378–384. 1995.

INZUCCHI, S.E. Diagnosis of Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 367, p. 54250. 2012.

JIA, Y. F.; SONG, N.N.; MAO, R.R.; LI, J.N.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; ZHANG, L.; HAN, H.L.; DING, Y.Q.; XU, L. Abnormal anxiety- and depression-like behaviors in mice lacking both central serotonergic neurons and pancreatic islet cells. **Frontiers in Behav Neurosc**. v. 8, p. 1-11. 2014.

KAMEI, J.; OHSAWA, M.; TSUJI, M.; TAKEDA, H.; MATSUMIYA, T. Modification of the effects of benzodiazepines on the exploratory behaviors of mice on a hole-board by diabetes. **Jpn J Pharmacol.** v. 86, p. 47–54. 2001.

KARAGIANNIS, T.; PASCHOS, P.; PALETAS, K.; MATTHEWS, D.R.; TSAPAS, A. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus in the clinical setting: systematic review and meta-analysis. **British Medical Journal.** v. 344, p. 1369. 2012.

KARUNANAYAKE, E.H.; BAKER, J.R.; CHRISTIAN, R.A.; HEARSE, D.J.; MELLOWS, G. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (14 C)-streptozotocin in the rat. **Diabetologia.** 12:123–128, 1976.

KASHIHARA, N.; WATANABE, Y.; MAKINO, H.; WALLNER, E.I.; KANWAR, Y.S. Selective decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans under the influence of reactive oxygen species. **Proc Natl Acad Sci USA.** n. 89, p. 6309-13. 1992.

KEMPEN, J.H.; O'COLMAIN, B.J.; LESKE, M.C.; HAFFNER, S.M.; KLEIN, R.; MOSS, S.E.; TAYLOR, H.R.; HAMMAN, R.F. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. **Arch Ophthalmol.** n. 122, p. 552–563. 2004.

KESSLER, R.C.; BERGLUND, P.; et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 62, n. 6, p. 593-602. 2005a.

KESSLER, R.C.; CHIU, W.T.; et al. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch. Gen. Psychiatry.** v. 62, n. 6, p. 617-627. 2005b.

KIECHELE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol.**; v. 100, p. 567-575. 1993.

KING, G.L.; LOEKEN, M.R. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. **Histochem. Cell Biol.** v. 122, p. 333-338. 2004.

KLEIN, D..F. Panic disorder. **Lancet.** v. 353, n. 9149, p. 326-327. 1999.

KOEN, N.; STEIN, D. J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. **Dialogues Clin Neurosci,** v. 13, n. 4, p. 423-437, 2011.

KOYA, D.; KING, G.L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes.** n. 47, p. 859-66. 1998.

KUHN, D. M.; ARTHUR, R. E. Inactivation of Brain Tryptophan Hydroxylase by Nitric Oxide. **J of Neuroch.** v. 67, n. 3, p. 1072-1077. 1996.

KUMAGAI, A.K. Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complication of diabetes. **Diabetes Metab. Res. Rev.** v. 15, p. 261–273. 1999.

LAWRENCE, J.M.; CONTRERAS, R.; CHEN, W.; SACKS, D.A. Trends in the prevalence of preexisting diabetes and gestational diabetes mellitus among a racially/ethnically diverse population of pregnant women, 1999-2005. **Diabetes Care**. v. 31, n. 5, p. 899-904. 2008.

LeDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.** n. 23, p. 155-184. 2000.

LEITER, L.A. From hyperglycemia to the risk of cardiovascular disease. **Rev Cardiovasc Med**. v. 7, n. 2, p. 3-9. 2006.

LIN, E. H.; VON KORFF, M.; ALONSO, J.; ANGERMEYER, M.C.; ANTHONY, J.; BROMET, E.; BRUFFAERTS, R.; GASQUET, I.; DE GIROLAMO, G.; GUREJE, O.; HARO, J.M.; KARAM, E.; LARA, C.; LEE, S.; LEVINSON, D.; ORMEL, J.H.; POSADA-VILLA, J.; SCOTT, K.; WATANABE, M.; WILLIAMS, D. Mental disorders among persons with diabetes--results from the World Mental Health Surveys. **J Psychosom Res**. v. 65, n. 6, p. 571-580. 2008.

LINN, T.; NOKE, M.; WOEHRLE, M.; KLOER, H.U.; HAMMES, H.P.; LITZLBAUER, D.; BRETZEL, R.G.; FEDERLIN, K. Fish oil-enriched diet and reduction of low-dose streptozocin-induced hyperglycemia. Inhibition of macrophage activation. **Diabetes**. v. 38, n. 11, p. 1402-1411. 1989.

LOTARSKI, S.M.; DONEVAN, S.; EL-KATTAN, A.; OSGOOD, S.; POE, J.; TAYLOR, C.P.; OFFORD, J. Anxiolytic-like activity of pregabalin in the Vogel conflict test in  $\alpha 2\delta$ -1 (R217A) and  $\alpha 2\delta$ -2 (R279A) mouse mutants. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 338, n. 2, p. 615-621, 2011.

MAGALHAES, A.C.; HOLMES, K.D.; DALE, L.B.; COMPS-AGRAR, L.; LEE, D.; YADAV, P.N.; DRYSDALE, L.; POULTER, M.O.; ROTH, B.L.; PIN, J.P.; ANISMAN, H.; FERGUSON, S.S. CRF receptor 1 regulates anxiety behavior via sensitization of 5-HT<sub>2</sub> receptor signaling. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 5, p. 622-629, 2010.

MANRIQUE, C.; LASTRA, G.; SOWERS, J.R. New insights into insulin action and resistance in the vasculature. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1311, n. 1, p. 138-50. 2014

MARTIN, E.I.; RESSLER, K.J.; BINDER, E.; NEMEROFF, C.B. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. **Clin Lab Med**, v. 30, p. 865-891, 2010.

MASHARANI, U.; GERMAN, M. Greenspan's basic & clinical endocrinology. 8th edn. **New York: McGraw-Hill Medical**. 2007.

MASON, R.P.; JACOB, R.F. Eicosapentaenoic acid inhibits glucose-induced membrane cholesterol crystalline domain formation through a potent antioxidant mechanism. **Biochim Biophys Acta**. v. 1848, n. 2, p. 502-9. 2015.

MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. Beta-Cell death during progression to diabetes. Review. **Nature**. v. 414, n. 6865, p. 792-8. 2001.

McGAUGH, J.L.; INTROINI-COLLISON, I.B.; CAHILL, L.F.; CASTELLANO, C.; DALMAZ, C.; PARENT, M.B.; WILLIAMS, C.L. Neuromodulatory systems and memory storage: role of the amygdala. Review. **Behav Brain Res.** v. 58, n. 1-2, p. 81-90. 1993.

MCLELLAN, K.C.P.; BARBALHO, S.M.; CATTALINI, M.; LERARIO, A.C. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Rev Nutr.** v. 20, n. 5, p. 515-24. 2007.

MIYATA, S.; YAMADA, N.; HIRANO, S.; TANAKA, S.; KAMEI, J. Diabetes attenuates psychological stress-elicited 5-HT secretion in the prefrontal cortex but not in the amygdala of mice. **Brain Res.** v. 1147, p. 233-239. 2007.

MOLENDI-COSTE, O.; LEGRY, V.; LECLERCQ, I. A. Why and How Meet n-3 PUFA Dietary recommendations? **Gastroenterol Res and Practice.** v. 2011, p. 1-11. 2011.  
MOLINA, M.N.; FERDER, L.; MANUCHA, W. Emerging Role of Nitric Oxide and Heat Shock Proteins in Insulin Resistance. **Curr Hypertens Rep.** v. 18, n. 1, p. 1. 2016.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Review.** v. 43, n.2, p. 109-142. 1991.

MONTGOMERY, K.C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol.** n. 48, p. 254-260. 1955a.

MONTGOMERY, K.C.; MONKMAN, J.A. The relation between fear and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psycho.** n. 148, p. 132-136. 1955b.

MORRIS, M.C.; EVANS, D.A.; BIENIAS, J.L.; TANGNEY, C.C.; BENNETT, D.A.; WILSON, R.S.; AGGARWAL, N.; SCHNEIDER, J. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. **Arch Neurol.** n. 60, p. 940-6. 2003.

MOSIENKO, V.; BERT, B.; BEIS, D.; MATTHES, S.; FINK, H.; BADER, M.; ALENINA, N. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. **Transl Psychiatry,** v. 2, e122, 2012.

MUNGRUE, I.N.; BREDET, D.S.; STEWART, D.J.; HUSAIN, M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? **Acta Physiol. Scand.** v. 179, p. 123-135. 2003.

MUNIYAPPA, R.; YAVUZ, S. Metabolic actions of angiotensin II and insulin: a microvascular endothelial balancing act. **Mol Cell Endocrinol.** v. 378, n. 1-2, p. 59-69. 2012.

NASH, J.; NUTT, D. Psychopharmacology of anxiety. **Psychiatry.** n. 6, v. 4, p. 143-148. 2007.

NORRIS, J.M.; YIN, X.; LAMB, M.M.; BARRIGA, K.; SEIFERT, J.; HOFFMAN, M.; ORTON, H.D.; BARÓN, A.E.; CLARE-SALZLER, M.; CHASE, H.P.; SZABO, N.J.;



ERLICH, H.; EISENBARTH, G.S.; REWERS, M. Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. **JAMA**. n. 298, p. 1420-1428. 2007.

NOYES, R. JR.; WOODMAN, C.; GARVEY, M.J.; COOK, B.L.; SUELZER, M.; CLANCY, J.; ANDERSON, D.J. Generalized anxiety disorder vs. panic disorder. Distinguishing characteristics and patterns of comorbidity. **J Nerv Ment Dis**. v. 180, n. 6, p. 369-79. 1992.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Review. **Physiol Rev**. v. 87, n. 1, p. 315-424. 2007.

PARKER, G. B.; HERUC, G.A.; HILTON, T.M.; OLLEY, A.; BROTCHE, H.; HADZI-PAVLOVIC, D.; FRIEND, C.; WALSH, W.F.; STOCKER, R. Low levels of docosahexaenoic acid identified in acute coronary syndrome patients with depression. **Psychiatry Res**. v. 141, n. 3, p. 279-286. 2006.

PEPLIES, J.; BÖRNHORST, C.; GÜNTHER, K.; FRATERMAN, A.; RUSSO, P.; VEIDEBAUM, T.; TORNARITIS, M.; DE HENAUW, S.; MARILD, S.; MOLNAR, D.; MORENO, L.A.; AHRENS, W. IDEFICS consortium. Longitudinal associations of lifestyle factors and weight status with insulin resistance (HOMA-IR) in preadolescent children: the large prospective cohort study IDEFICS. **Int J Behav Nutr Phys Act**. v. 13, n. 1, p. 97. 2016.

PEREIRA, M.; SIBA, I.P.; CHIOCA, L.R.; CORREIA, D.; VITAL, M.A.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.; ANDREATINI R. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. **Progress in Neuro-Psychopharmacol & Biol Psych**. v. 7, n. 35, p. 1636-1644. 2011.

PFEILSCHIFTER, J.; EBERHARDT, W.; HUWILER, A. Nitric oxide and mechanisms of redox signaling. **J Am Soc Nephrol**. v. 14, n. 8 Suppl 3, p. 237-40. 2003.

POKK, P.; VÄLI, M. Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitors 7-NI, L-NAME and L-NOARG in Staircase Test. **Archives of Medical Research**. v. 33, n. 3, p. 265-268. 2002.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. Progress in Neurobiology. v. 64, n. 1, p. 51-68. 2001.

RAMANADHAM, S.; MONGOLD, J. J.; BROWNSEY, R. W.; CROS, G. H.; MCNEILL, J. H. Oral vanadyl sulfate treatment of diabetes mellitus in rats. **Amer J Physiol**. v. 257, p. 904-910. 1989.

RAMANATHAN, M.; JAISWAL, A.K.; BHATTACHAYRA, S.K. Differential effects of diazepam on anxiety in streptozotocin induced diabetic and nondiabetic rats. **Psychopharmacology**. v. 135, p. 361-367. 1998.

RAMKUMAR, S.; TANDON, N. Type 2 diabetes mellitus in children and youth. **Indian Journal of Pediatrics**. n. 80, Supl 1, p. 87-94. 2013.

RATNAYAKE, W.M.; GALLI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Ann Nutr Metab.** v. 55, n. 1-3, p. 8-43. 2009.

RAVINDRAN, L.N.; STEIN, M.B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **J Clin Psychiatry,** v. 71, n. 7, p. 839-854, 2010.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. **Nat Rev Drug Discov,** v. 10, p. 685-697, 2011.

REUSSER, F. Mode of action of streptozotocin, **J. Bacteriol.** v. 105, n. 1971, p. 580-588.

RORIZ-FILHO, J.S.; SÁ-RORIZ, T.M.; ROSSET, I.; CAMOZZATO, A.L.; SANTOS, A.C.; CHAVES, M.L.; MORIGUTI, J.C.; RORIZ-CRUZ, M. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition. **Biochim Biophys Acta.** v. 1792, n. 5, p. 432-43. 2009.

ROTHER, K.I. Diabetes treatment--bridging the divide. **N Engl J Med.** v. 356, n. 15, p. 1499-501. 2007.

ROY-BYRNE, P.P.; CRASKE, M.G.; STEIN, M.B.. Panic disorder. **Lancet.** v. 368, n. 9540, p. 1023-1032. 2006.

ROYLAND, J.E.; DELFANI, K.; LANGSTON, J.W.; JANSON, A.M.; MONTE, D.A.D. 7-Nitroindazole prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced ATP loss in the mouse striatum. **Brain Research.** v. 839, n. 1, p. 41-48. 1999.

SAGIN, F.G.; SOZMEN, E.Y.; ERSOZ, B.; MENTES, G. Link Between Monoamine Oxidase and Nitric Oxide. **NeuroToxicology.** 25, 1-2, 91-99. 2004.

SCHAEFER-GRAF, U.M.; BUCHANAN, T.A.; XIANG, A.H.; PETERS, R.K.; KJOS, S.L. Clinical predictors for a high risk for the development of diabetes mellitus in the early puerperium in women with recent gestational diabetes mellitus. **Am J Obstet Gynecol.** v. 186, n. 4, p. 751-6. 2002.

SCHMIDT, M.I.; DUCAN, B.B.; HOFFMANN, F.J.; MOURA, L.; MALTA, D.C.; CARVALHO, R.M.S.V. Prevalência de diabetes e hipertensão no Brasil baseada em inquérito de morbidade auto-referida, Brasil, 2006. **Revista de Saúde Pública.** v. 43, supl. 2, p. 74- 82. 2009.

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

SHIBUKI, K.; OKADA D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. **Nature.** v. 349, p. 326–328. 1998.

SIMON, G.; ORMEL, J.; VONKORFF, M.; BARLOW, W. Health care costs associated with depressive and anxiety disorders in primary care. **The American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 3, p. 352-357. 1995.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**, v.56, n.8, Oct, p.365-79. 2002.

SINGH, P.K.; NATH, R.; AHMAD, M.K.; RAWAT, A.; BABU, S.; DIXIT, R.K. Attenuation of lead neurotoxicity by supplementation of polyunsaturated fatty acid in Wistar rats. **Nutr Neurosci**. 2015

SKYLER, J.S.; BERGENSTAL, R.; BONOW, R.O.; BUSE, J.; DEEDWANIA, P.; GALE E.A.; HOWARD, B.V.; KIRKMAN, M.S.; KOSIBOROD, M.; REAVEN, P.; SHERWIN, R.S. Position Statement. Intensive glycemic control and the prevention of cardiovascular events: implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA Diabetes Trials: a position statement of the American Diabetes Association and a Scientific statement of the American College of Cardiology; Foundation and the American Heart Association. **Diabetes Care**. n. 32, p. 187-92. 2009.

SMITH, K.J.; BELAND, M.; CLYDE, M.; GARIEPY, G.; PAGE, V.; BADAWI, G.; RABASA-LHORET, R.; SCHMITZ, N. Association of diabetes with anxiety: a systematic review and meta-analysis. **J Psychosom Res**. n. 74, p. 89-99. 2013.

SOKOLOWSKI, K.; CORBIN, J. G. Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. **Front Mol Neurosci**. v.5, 2012.

SONG, C.; LI, X.; LEONARD, B.E.; HORROBIN, D.F. Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1beta-induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats. **J Lipid Res**. v. 44, n. 10, p. 1984-91. 2003.

STANTON, R.C. Frontiers in diabetic kidney disease: Introduction. **Am J Kidney Dis**. v. 63, n. 2, Suppl 2, p 1-2. 2014.

STARCEVIC, V.; SAMMUT, P.; BERLE, D.; HANNAN, A.; MILICEVIC, D.; MOSES, K.; LAMPLUGH, C.; ESLICK, G.D. Can levels of a general anxiety-prone cognitive style distinguish between various anxiety disorders? **Compr Psychiatry**. v. 53, n. 5, p. 427–433. 2012.

STEINERT, J. R.; CHERNOVA, T.; FORSYTHE, I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. **Neuroscientist**. v. 14, n. 4, p. 435-452. 2010.

STENE, L.C.; JONER, G.; Norwegian Childhood Diabetes Study Group. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. **Am J Clin Nutr**. n. 78, p. 1128–1134. 2003.

STORLIEN, L. H.; KRAEGEN, E.W.; CHISHOLM, D.J.; FORD, G.L.; BRUCE, D.G.; PASCOE, W.S. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. **Science**. v. 237, p. 885-888. 1987.

SURAMPUDI, P.N.; JOHN-KALARICKAL, J.; FONSECA, V.A. Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. Review. **Mt Sinai J Med.** v. 76, n. 3 p. 216-26. 2009.

SUZUKI, L.A.; POOT, M.; GERRITY, R.G.; BORNFELDT, K.E. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. **Diabetes.** v. 50, n. 4, p. 851-60. 2001.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research.** v.50, n. 6, p. 537 – 546, 2001.

UHLENHUTH, E.H.; STARCEVIC, V.; WARNER, T.D.; MATUZAS, W.; MCCARTY, T.; ROBERTS, B.; JENKUSKY S. A general anxiety-prone cognitive style in anxiety disorders. **J Affect Disord.** v. 70, n. 3, p. 241-249. 2002.

VINES, A.; DELATTRE, A.M.; LIMA, M.M.; RODRIGUES, L.S.; SUCHECKI, D.; MACHADO, R.B.; TUFIK, S.; PEREIRA, S.I.; ZANATA, S.M.; FERRAZ, A.C. The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: A possible antidepressant mechanism. **Neuropharmacol.** v. 62, 184-191. 2012.

VOLKE, V.; KOKS, S.; VASAR, E.; BOURIN, M.; BRADWEJN, J.; MANNISTO, P.T. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behaviour in an elevated plusmaze. **Neuroreport,** v. 6, p. 1413-1416, 1995.

VOLKE, V.; SOOSAAR, A.; KÖKS, S.; BOURIN, M.; MÄNNISTÖ, P.T.; VASAR, E. 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. **Psychopharmacology (Berl).** v. 131, n. 4, p. 399-405. 1997.

VOLTARELLI, J.C.; COURI, C.E.; OLIVEIRA, M.C.; MORAES, D.A.; STRACIERI, A.B.; PIERONI, F.; BARROS, G.M.; MALMEGRIM, K.C.; SIMÕES, B.P.; LEAL, A.M.; FOSS, M.C. Stem cell therapy for diabetes mellitus. Review. **Kidney Int Suppl.** v. 1, n. 3, p. 94-98. 2011.

WEI, T.; ZHAO, X.; HOU, J.; OGATA, K.; SAKAUE, T.; MORI, A.; XIN, W. The antioxidant ESeroS-GS inhibits NO production and prevents oxidative stress in astrocytes. **Biochemical Pharmacology.** v. 66, n. 1, p. 83-91. 2003.

WEI, D.; LI, J.; SHEN, M.; JIA, W.; CHEN, N.; CHEN, T.; SU, D.; TIAN, H.; ZHENG, S.; DAI, Y.; ZHAO, A. Cellular production of n-3 PUFAs and reduction of n-6-to-n-3 ratios in the pancreatic beta-cells and islets enhance insulin secretion and confer protection against cytokine-induced cell death. **Diabetes.** n. 2, p. 471-8. 2010.

WILLUMSEN, N.; VAAGENES, H.; LIE, O.; RUSTAN, A.C.; BERGE, R.K. Eicosapentaenoic acid, but not docosahexaenoic acid, increases mitochondrial fatty acid oxidation and upregulates 2,4-dienoyl-CoA reductase gene expression in rats. **Lipids.** n. 31, p. 579–92. 1996.

WILSON, V. Type 2 diabetes: an epidemic in children. **Nursing Children and Young People.** v. 25, n. 2, p. 14-7. 2013.

XIANG, F.L.; LU, X.; STRUTT, B.; HILL, D.J.; FENG, Q. NOX2 Deficiency protects against streptozotocin-Induced  $\beta$ -cell destruction and development of diabetes in mice. **Diabetes**. v.50, p.2603-2611. 2010.

YEHUDA, S.; RABINOVITZ, S.; MOSTOFISKY, D. I. Mixture of essential fatty acids lowers test anxiety. **Nutr Neurosc**. v. 8, n. 4, p. 265-267. 2005.

YUN, H.Y.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. **Mol. Psychiatry**. v. 2, p. 300-310. 1997.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. **Neurosci BioBehav Rev**. v. 46, n. 3, p. 397-406. 2014.

ZHANG, L., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., 2006. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**. 109, 33-41.

ZHANG, J.; HUANG, X.Y.; YE, M.L.; LUO, C.X.; WU, H.Y.; HU, Y.; ZHOU, Q.G.; WU, D.L.; ZHU, L.J.; ZHU, D.Y. Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in modulating anxiety-related behaviors. **J Neurosci**, v. 30, p. 2433-2441, 2010.

ZIMMERMANN, M.B.; AEBERLI, I. Dietary determinants of subclinical inflammation, dyslipidemia and components of the metabolic syndrome in overweight children: a review. **Int J Obes**. n. 32(Suppl 6), p. 11-18. 2008.