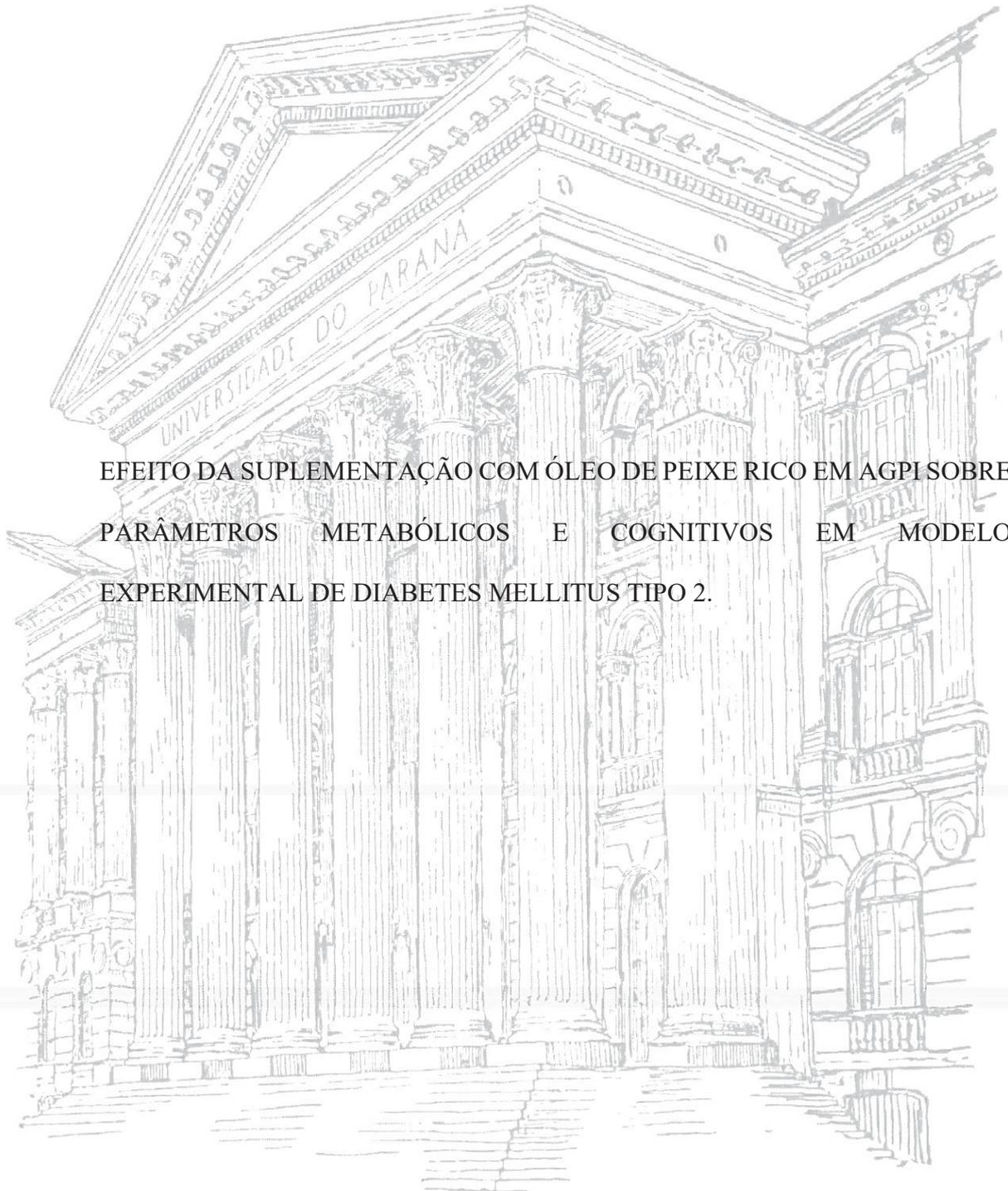


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STEPHANIE RUBIANNE SILVA CARVALHAL



EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE RICO EM AGPI SOBRE  
PARÂMETROS METABÓLICOS E COGNITIVOS EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2.

CURITIBA

2022

STEPHANIE RUBIANNE SILVA CARVALHAL

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE RICO EM AGPI SOBRE  
PARÂMETROS METABÓLICOS E COGNITIVOS EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2.

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação  
em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas,  
da Universidade Federal do Paraná, como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
Doutora em Fisiologia.

Orientação: Prof. Dr. Luiz Claudio  
Fernandes.

Coorientação: Prof. Dr<sup>a</sup>. Katya Naliwaiko

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Carvalho, Stephanie Rubianne Silva

Efeito da suplementação com óleo de peixe rico em AGPI sobre parâmetros metabólicos e cognitivos em modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2 / Stephanie Rubianne Silva Carvalho. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Fernandes.

Coorientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Katya Naliwaiko

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Ácidos graxos insaturados. 3. Óleos de peixe. 4. Metabolismo. 5. Cognição. I. Fernandes, Luiz Cláudio, 1960-. II. Naliwaiko, Katya. 1976-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FISILOGIA -  
40001016072P4

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FISILOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **STEPHANIE RUBIANNE SILVA CARVALHAL** intitulada: **EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE RICO EM AGPI SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS E COGNITIVOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2**", sob orientação do Prof. Dr. **LUIZ CLAUDIO FERNANDES**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica  
05/12/2022 09:58:15.0  
**LUIZ CLAUDIO FERNANDES**  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica  
06/12/2022 13:37:14.0  
**ROBERTO BARBOSA BAZOTTE**  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica  
05/12/2022 08:30:58.0  
**JOICE MARIA DA CUNHA**  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica  
02/12/2022 15:01:52.0  
**ANITA NISHIYAMA**  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

Setor de Ciências Biológicas - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1588 - E-mail: [ppgfsio@ufpr.br](mailto:ppgfsio@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 239677

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 239677

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, criador dos céus e da terra. Ele que era antes que qualquer coisa ser ou existir, desenhou meu destino e ajustou meus passos junto a pessoas tão extraordinárias. A Ele, *Yahweh*, seja dada toda a honra e adoração.

Ao Thomas, meu marido e melhor amigo. A sua fé em mim me fez acreditar que eu poderia seguir esse caminho. Obrigada pelo seu colo, sua paciência, sua perseverança e por me honrar todos os dias. Ah, que sorte a minha por ter você! Amo nossa história e a família que estamos construindo juntos. *I love you three thousand, baby!*

A Theodora, minha amada filhinha. Seu amor inocente e incondicional me tornaram a pessoa que eu sempre quis ser. Nada nesse mundo se compara a sensação de ter você nos meus braços. Ver você crescer vale mais que qualquer coisa, minha ovelhinha! Nada nessa vida é maior que o meu amor por você, filha!

Aos meus pais, Wesley e Célia, por dedicarem suas vidas a nossa família e nos ensinarem a nunca desistir dos nossos sonhos. Obrigada por me derem força nos momentos insuportáveis e me ajudarem a ter esperança quando nem isso eu tinha. Amo vocês para sempre!

Ao meu querido orientador, professor Luiz Claudio, por sempre dividir seus conhecimentos, encarar os desafios do doutorado comigo e me ajudar a conduzir com tanta leveza a dinâmica entre experimentos e maternidade. Patrón, você é o melhor! Espero um dia, retribuir toda a confiança e apoio que você me deu.

A minha amiga e coorientadora, professora Katya Naliwaiko. Foram quase 8 anos juntas, profinha. Você esteve comigo nos momentos bons, ruins e no “fundo do poço”. Nunca me esquecerei disso. Você tem meu coração, florzinha! Amo você!

Ao nosso galego (que na verdade é ucraniano!), Matheus Zazula. Ah Mathias, como te agradecer?! Você foi um dos meus principais motivadores, irmão de bancada e um “divisor de águas” em nosso grupo. Obrigada por todo apoio, companhia, ensinamentos e experiências que passamos juntos (boas e ruins). Amo você, galego!

Aos queridos IC's Ariane Gabriel e Vitor Volomi, que me acompanharam no início dessa caminhada e foram maravilhosos como alunos e amigos.

Aos alunos Ana Carla, Elieltom (Tom), Diego (Francis), Hellen, Bia e Shersey. Todos vocês fizeram meus dias mais felizes. Obrigada pela ajuda em dias de experimentos, manutenção dos animais e lanchinhos noturnos. “Cêis tudim” moram no meu coração!

Á minhas meninas do laboratório de Metabolismo Celular (LabMetab). “Migamanda”, “Suriellen” e “Rafaelis”, vocês são sensacionais! Vocês me deram muita força sempre. Obrigada por me escutarem, me apoiarem e por não desistir da nossa amizade.

Á todos os pesquisadores e professores com que tive o prazer de trabalhar durante o doutorado, dentro e fora da UFPR.

Ao CNPq pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

Á UFPR pelo ensino através de seus grandes professores.

Ao Programa de pós-graduação em Fisiologia, pelo conhecimento adquirido e pelos amigos que pude fazer.

“Pois todas as coisas foram criadas por Ele, e tudo existe por meio dele e para ele. Glória a Deus para sempre! Amém!”

Romanos 11:36

## RESUMO

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma disfunção endócrina crônica, de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia, resistência insulínica periférica e dislipidemia. Dentre as comorbidades associadas à síndrome, danos progressivos ao sistema nervoso central culminam em deficiências cognitivas e neurocomportamentais moderadas, referenciadas como encefalopatia diabética (ED). Apesar da correlação existente entre o alto consumo lipídico e favorecimento da progressão diabética, ácidos graxos poli-insaturados n-3 (AGPI), presentes no óleo de peixe OP, são conhecidos por seus benefícios frente a disfunções lipídicas e anti-inflamatórias. Nesse sentido, o presente estudo visou investigar os efeitos da suplementação com OP sobre parâmetros metabólicos e cognitivos decorrentes da cronificação do DM2. Aos 90 dias de idade, os animais diabetizados em período neonatal apresentaram aspectos sintomatológicos similares aos observados na patologia humana, através da confirmação de intolerância glicêmica. Este quadro patológico foi mantido até 150 dias de idade, período em que investigamos a instauração da ED e os potenciais efeitos nutracêuticos da suplementação com OP frente ao declínio metabólico e cognitivo esporádico. Neste período, demonstramos que os animais diabetizados suplementados diariamente com OP (1 mg/Kg), durante 60 dias, exibiram melhora do perfil lipídico plasmático, redução da hiperinsulinemia e maior flexibilidade cognitiva no teste reverso, em comparação aos animais diabetizados e não suplementados com OP. Contudo, a suplementação com OP não foi capaz de modificar parâmetros relacionados a hiperglicemia, danos oxidativos na região do telencéfalo e déficit de aprendizagem, decorrentes da diabetização. Até o presente momento, concluímos que o modelo de diabetização em período neonatal é uma ferramenta vantajosa em mimetizar sistemicamente o perfil tempo-dependente do DM2. Em adição, apesar dos inúmeros benefícios relacionados ao consumo de AGPI n—3, a suplementação com OP teve ações limitadas diante dos efeitos metabólicos e cognitivas vinculadas ao diabetes.

Palavras – chave: diabetes mellitus tipo 2; hiperinsulinemia; ácidos graxos poli-insaturados; óleo de peixe; metabolismo; cognição.

## ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is a chronic endocrine dysfunction of multiple etiologies, characterised by hyperglycaemia, peripheral insulin resistance and dyslipidaemia. Among the comorbidities associated with the syndrome, progressive damage to the central nervous system culminates in moderate cognitive and neurobehavioural impairments, referred to as diabetic encephalopathy (DE). Despite the existing correlation between high lipid intake and favourable diabetic progression, n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), present in OP fish oil, are known for their benefits against lipid and anti-inflammatory dysfunctions. With this in mind, this study aimed to investigate the effects of OP supplementation on metabolic and cognitive parameters resulting from the chronification of DM2. At 90 days of age, the animals diabetised during the neonatal period showed symptoms similar to those observed in humans, by confirming glycaemic intolerance. This pathological condition was maintained until 150 days of age, when we investigated the onset of ED and the potential nutraceutical effects of OP supplementation against sporadic metabolic and cognitive decline. During this period, we showed that diabetic animals supplemented daily with OP (1 mg/Kg) for 60 days had an improved plasma lipid profile, reduced hyperinsulinemia and greater cognitive flexibility in the reverse test, compared to diabetic animals not supplemented with OP. However, OP supplementation was unable to modify parameters related to hyperglycaemia, oxidative damage in the telencephalic region and learning deficits resulting from diabetisation. So far, we have concluded that the neonatal diabetisation model is an advantageous tool for systemically mimicking the time-dependent profile of DM2. In addition, despite the numerous benefits related to the consumption of n-3 PUFA, supplementation with OP had limited actions in the face of the metabolic and cognitive effects linked to diabetes.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; hyperinsulinemia; polyunsaturated fats; fish oil; metabolism; cognition.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Semelhanças estruturais entre as moléculas de glicose e estreptozotocina.....	27
FIGURA 2: Mecanismo de ação de estreptozotocina em animais neonatos.....	29
FIGURA 3: Ação trifásica da estreptozotocina em roedores.....	31
FIGURA 4: Cadeia carbônica dos Ácidos graxos essenciais.....	33
FIGURA 5: Esquema da síntese de ácidos graxos poli-insaturados.....	34
FIGURA 6: Perfil do consumo de ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos.....	37
FIGURA 7: Esquema do delineamento experimental.....	42
FIGURA 8: Ilustração da arena do aparato HBm.....	46
FIGURA 9: Mapa de montagem das recompensas nos três estágios do teste cognitivo.....	49
FIGURA 10: Massa corpórea e índice de Lee dos grupos controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (S), diabetizados (D) e diabetizados suplementados com óleo de peixe (DS).....	56
FIGURA 11: Teste de reconhecimento de objeto novo e familiar dos grupos (C), diabetizados (D) e controle positivo (L).....	59
FIGURA 12: Teste de reconhecimento de objeto novo e familiar dos grupos (C), suplementado com óleo de peixe (S), diabetizados (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS).....	60
FIGURA 13: Atividade locomotora dos grupos experimentais ao longo de 5 dias de avaliação.....	63
FIGURA 14: Atividade exploratória dos grupos ao longo de 5 dias de avaliação.....	66
FIGURA 15: Frequência de rearings dos grupos ao longo de 5 dias de avaliação.....	69
FIGURA 16: Frequência de edge-sniff dos grupos experimentais ao longo de 5 dias de avaliação.....	71
FIGURA 17: Tempo de permanência no centro da prancha dos grupos experimentais longo de 5 dias de avaliação.....	73
FIGURA 18: Número de cilindros errados escolhidos pelos grupos experimental ao longo de 5 dias de avaliação.....	76
FIGURA 19: Número de cilindros revisitados pelos experimentais longo de 5 dias de avaliação.....	78
FIGURA 20: Número de cilindros omitidos pelos grupos experimentais ao longo de 5 dias de avaliação.....	80
FIGURA 21: Tempo de performance dos grupos experimentais ao longo de 5 dias de avaliação.....	82
FIGURA 22: Integração das variáveis neurocomportamentais ao longo de 5 dias de avaliação dos grupos (C), diabetizados (D) e controle positivo (L).....	87
FIGURA 23: Integração das variáveis neurocomportamentais ao longo de 5 dias de avaliação dos grupos controle (C) e suplementado com óleo de peixe (S).....	88
FIGURA 24: Integração das variáveis neurocomportamentais ao longo de 5 dias de avaliação dos grupos diabetizado (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS).....	89
FIGURA 25: Teste de tolerância intravenoso à glicose d grupos controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (S), diabetizados (D) e diabetizados suplementados com óleo de peixe (DS).....	91
FIGURA 26: Consumo alimentar e hídrico e volume urinário e fecal dos animais controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (S), diabetizado (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS) aos 140 dias de idade.....	92
FIGURA 27: Concentração de Proteínas Totais, Diencefalo e Telencefalo dos Animais Controle (C), Controle Suplementado com Óleo de Peixe (S), Diabetizado (D) e Diabetizado Suplementado com Óleo de Peixe (DS).....	97
FIGURA 28: Concentração de NP-SH, Índice de Lipoperoxidação e Atividade da Colinesterase Total em Regiões do Diencefalo e Telencefalo dos Animais Controle (C), Controle Suplementado com Óleo de Peixe (S), Diabetizado (D) e Diabetizado Suplementado com Óleo de Peixe (DS).....	99

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Parâmetros cognitivos avaliados por tentativa .....	50
TABELA 2: Avaliação diária de parâmetros comportamentais e cognitivos dos grupos controle (C), diabetizado (D) e controle positivo (L).....	83
TABELA 3: Avaliação diária de parâmetros comportamentais e cognitivos dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (S), diabetizado (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS).....	84
TABELA 4: Parâmetros metabólicos dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (S), diabetizado (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS).....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AGE's</b>	Produtos finais de glicação avançada
<b>AGL</b>	Ácidos graxos livres
<b>AGPI</b>	Ácidos graxos poli-insaturados
<b>AL</b>	Ácido graxo essencial linoléico
<b>ALA</b>	Ácido graxo essencial $\alpha$ -linolênico
<b>ALX</b>	Aloxana
<b>AUC</b>	Área sobre a curva
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no uso de Animais
<b>ChE</b>	Colinesterase total
<b>CNA</b>	Comprimento naso-anal
<b>COX</b>	Cicloxigenases
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DCNT</b>	Doenças crônicas não – transmissíveis
<b>DCV</b>	Doenças cardiovasculares
<b>DHA</b>	Docosahexaenóico
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DM1</b>	Diabetes tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes tipo 2
<b>DNA</b>	Ácidos desoxirribonucleico
<b>DPN</b>	Dia pós-natal
<b>ED</b>	Encefalopatia diabética
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>EPA</b>	Eicosapentaenóico
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<b>GLUT 2</b>	Transportador de glicose 2

<b>GLUT 4</b>	Transportador de glucose 4
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicada
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidade
<b>HDLc</b>	Colesterol HDL
<b>HFD</b>	High Fat Diet
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metil coenzima
<b>HOMA-IR</b>	Index homeostasis model assessment
<b>i.c.v</b>	Intracerebroventricular
<b>i.p</b>	Via intraperitoneal
<b>IC1</b>	Índice de Castelli I
<b>IC2</b>	Índice de Castelli II
<b>IGF-1</b>	Fator de crescimento tipo 1 semelhante a insulina
<b>IL-10</b>	Interleucina 1 $\alpha$
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IRS-1</b>	Receptores de insulina tipo 1
<b>LDLc</b>	Colesterol LDL
<b>LHS</b>	Lipase hormônio sensível
<b>LLP</b>	Enzima lipase lipoproteica
<b>LOX</b>	Lipoxigenases
<b>LPO</b>	Peroxidação lipídica
<b>LTD</b>	Depressão de longa duração
<b>LTP</b>	Potenciação de longa duração
<b>mHB</b>	Modified Hole Board
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NID</b>	Não - insulino dependente
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NP-SH</b>	Tióis não proteicos
<b>OP</b>	Óleo de peixe
<b>PARP-1</b>	Poli (ADP-ribose) polimerase

<b>PI3K</b>	Fosfatidil inositol 3 cinase
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>QUICK</b>	Quantitative insulin sensitivity check index
<b>RAGE's</b>	Receptores para AGE's
<b>RI</b>	Resistência insulínica
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>STZ-n</b>	Diabetização induzido por STZ em período neonatal
<b>TG</b>	Triacilgliceróis
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator alfa de necrose tumoral
<b>TTG</b>	Teste de tolerância à glicose
<b>UDP</b>	Uridina difosfato
<b>VLDLc</b>	Colesterol VLDL

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
JUSTIFICATIVA .....	18
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1. DIABETES MELLITUS.....	19
2.2. FISIOPATOLOGIA DIABÉTICA E COMORBIDADES ASSOCIADAS.....	20
2.3. ENCEFALOPATIA DIABÉTICA .....	21
2.4. MODELOS EXPERIMENTAIS ANIMAIS EM PESQUISAS DE DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	23
2.4.1. Modelos Quimicamente Induzidos.....	24
2.4.2. Estreptozotocina .....	25
2.4.3. Mecanismo Diabetogênico da Estreptozotocina.....	26
2.4.4. Resposta Glicêmica Trifásica da Estreptozotocina em Animais Adultos e as Eventuais Modificações na Dibeitização em Neonatos.....	30
2.5. LIPÍDEOS E ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.....	32
2.5.1. FUNÇÕES DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	35
2.6. ESTILO DE VIDA OCIDENTAL E DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	36
2.6.1. MODIFICAÇÃO DA DIETA.....	36
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	39
3.1. OBJETIVO GERAL.....	39
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
4.1. ANIMAIS.....	40
4.2. DESENHO EXPERIMENTAL.....	40
4.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	43
4.4. MODELO DE DIABETES MELLITUS NEONATAL.....	43
4.5. INDUÇÃO AO MODELO DE PREJUÍZO COGNITIVO.....	43
4.6. SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE.....	44
4.7. EVOLUÇÃO DO ACRÉSCIMO DE MASSA CORPORAL.....	44
4.8. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	45
4.9. TESTE <i>HOLE BOARD</i> MODIFICADO.....	45
4.9.1. Aparato.....	45
4.9.2. Habituação dos animais .....	46
4.9.3. Reconhecimento de Objeto Novo e Familiar.....	47
4.9.4. Atividade Exploratória.....	47
4.9.5. Teste Cognitivo.....	47
4.10. AVALIAÇÃO EM GAIOLA METABÓLICA.....	50
4.11. ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	50
4.11.1. Perfil Bioquímico Plasmático.....	50
4.11.2. Proporções Aterogênicas.....	51
4.12. MENSURAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR .....	51
4.13. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA, INTERLEUCINA-6 E INTERLEUCINA-10.....	52
4.14. ÍNDICES DE <i>HOMEOSTASIS MODEL ASSESSMENT</i> (HOMA-IR) E <i>QUANTITATIVE INSULIN SENSITIVITY CHECK INDEX</i> (QUICK).....	52
4.15. PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E NEUROTOXICIDADE EM REGIÕES ENCEFÁLICAS .....	52
4.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	54

<b>5. RESULTADOS</b> .....	55
5.1.1. AVALIAÇÃO DO ACRÉSCIMO DE MASSA CORPORAL ANIMAIS DA 13ª A 20ª SEMANA DE IDADE .....	55
5.2. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE COMPORTAMENTO E COGNIÇÃO AOS 120 DIAS DE IDADE.....	57
5.2.1. Teste de reconhecimento de objetos Novo e Familiar.....	57
5.2.2. Atividade Exploratória – Locomoção.....	61
5.2.3. Atividade Exploratória – Exploração direta (número de cilindros visitados).....	64
5.2.4. Atividade Exploratória – Exploração indireta (frequência de <i>rearing</i> e <i>edge-sniff</i> ).....	67
5.2.5. Atividade Exploratória - Evasão (tempo de exposição ao centro da prancha).....	72
5.2.6. Cognição – Memória de longo prazo (escolhas de cilindros errados–sem recompensa).....	74
5.2.7. Cognição – Memória de curto prazo (escolhas de cilindros com recompensa já visitados anteriormente) .....	77
5.2.8. Cognição – Erros por omissão (não visitar cilindros com recompensa) .....	79
5.2.9. Tempo de performance .....	81
5.2.10. Integração das variáveis neurocomportamentais ao longo de 5 dias de avaliação .....	85
5.3. TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAVENOSO À GLICOSE .....	90
5.4. AVALIAÇÃO EM GAIOLA METABÓLICA .....	92
5.5. CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E LIPÍDEOS PLASMÁTICOS .....	93
5.6. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA E IL-6 E IL-10 .....	93
5.7. ÍNDICE DE HOMA-IR E QUICKI .....	93
5.8. ÍNDICE DE CASTELLI I E II .....	94
5.9. VARIÁVEIS CORPORAIS.....	94
5.10. CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR.....	94
5.11. SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	96
1.11.1. Quantificação de Proteínas Totais em Regiões Encefálicas.....	96
1.11.2. Índices de Estresse Oxidativo e Neurotoxicidade em Regiões Encefálicas.....	97
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	100
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	115
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	116
<b>9. ANEXOS</b> .....	132

## INTRODUÇÃO

### CONTEXTUALIZAÇÃO

Doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) são as principais causas de mortes no mundo, com prevalência crescente em todas as faixas etárias, gêneros e etnias. Por definição, DCNT é uma disfunção não contagiosa, de longa duração e lenta progressão, sendo decorrente de modificações genéticas, fatores ambientais ou sedentarismo (ANDERSON; DURSTINE, 2019; EZZATI, 2018). Dentre as DCNT, a diabetes mellitus (DM) é considerada um dos mais importantes desafios de saúde pública do século XXI (AHMED et al., 2019a; SUN et al., 2020).

Embora possua etiologia múltipla, o DM é caracterizado por concentrações elevadas de glicose plasmática, decorrente da deficiente produção insulínica (diabetes tipo 1, DM1) ou por baixa responsividade do organismo à ação da insulina endógena (diabetes tipo 2, DM2), sendo que o último representa cerca de 80% dos casos (BIESSELS; GISPEN, 2005; MIJNHOUT et al., 2006; SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010; WANG et al., 2020a; ZHOU et al., 2022). Normalmente, os tratamentos para casos crônicos de diabetes limitam-se apenas a estratégias de controle glicêmico, fármacos hipoglicemiantes e cuidados paliativos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2021).

A coexistência de distúrbios relacionados ao metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas atrelados ao decurso do DM, culmina em danos progressivos em sistemas importantes, dos quais destacam-se os sistemas cardíaco, renal, hepático e nervoso (BIESSELS; GISPEN, 2005). Doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas a maior causa de óbito prematuro entre diabéticos (TELLE-HANSEN; GAUNDAL; MYHRSTAD, 2019) e disfunções cognitivas associadas à hiperglicemia

uma das comorbidades mais incapacitantes (BIESELS; GISPEN, 2005; DÍAZ-GEREVINI et al., 2019; CHEN et al., 2020)

Embora a associação entre DM2 e danos cognitivos esporádicos seja complexa, dados demonstram que cerca de 50% dos pacientes diabéticos desenvolvem declínio neurocomportamental no decurso de 25 anos (MINAZ et al., 2018). Essa condição referenciada como encefalopatia diabética (ED), é primariamente exteriorizada por deficiências na aprendizagem e memória (ZHOU et al., 2022). Algumas hipóteses sugerem a correlação entre o comprometimento da via de sinalização insulínica, alteração do metabolismo de glicose, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e liberação de citocinas inflamatórias em áreas de córtex pré-frontal e hipocampo de diabéticos (BAGLIETTO-VARGAS et al., 2016; CHOLERTON, BAKER, & CRAFT, 2013; KANDIMALLA et al., 2017; MITTAL & KATARE, 2016; MUSHTAQ, KHAN, KUMOSANI, & KAMAL, 2015).

Sabe-se que um dos fatores determinísticos para o agravamento de doenças metabólicas é o alto consumo de lipídeos que acompanha o desenvolvimento da população humana (ROCCISANO et al., 2019; SILVA; MORAES; GONÇALVES-DE ALBUQUERQUE, 2020; SIMOPOULOS, 2016; URIHO et al., 2019). Contudo, é notório os benefícios estabelecidos pelo consumo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) da família ômega 3 (n-3) frente à DCNT (THOMAS, THOMAS, RADCLIFFE, & ITSIOPOULOS, 2015; SIMOPOULOS, 2020; SIMOPOULOS; DINICOLANTONIO, 2016; URIHO et al., 2019).

Pesquisas envolvendo suplementação com óleo de peixe (OP), rico em n-3, demonstraram resultados promissores em relação à sintomatologia, progressão e redução do declínio funcional em quadros de demência e lesões neurológicas agudas (THOMAS, THOMAS, RADCLIFFE, & ITSIOPOULOS, 2015), bem como sob parâmetros lipídicos

relacionados à dislipidemia diabética. Visto que um dos aspectos comuns de doenças neurodegenerativas é o desequilíbrio lipídico envolvendo ácidos graxos essenciais (CURI, POMPEIA, MIYAZAKA, PROCOPIO, 2002), os AGPI n-3 podem exercer efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios pela redução de moléculas pró-inflamatórias (CHE et al., 2017), assim como bloquear a apoptose celular resultante de neurodegenerações (WAKX et al., 2016).

## JUSTIFICATIVA

A relação sinérgica tempo-dependente estabelecida entre o diabetes, o envelhecimento e o desequilíbrio nutricional da típica dieta ocidental, constituem forte fator de risco para o desenvolvimento de prejuízos cognitivos. Apesar do contínuo aperfeiçoamento dos métodos intervencionistas tradicionais, fatores extrínsecos ao diabetes podem, vagarosamente, direcionar para o desenvolvimento de danos sistêmicos permanentes. Assim sendo, o emprego de estratégias aditivas pode representar grande potencial terapêutico quanto à contenção da evolução fisiopatológica. Neste aspecto, os efeitos nutracêuticos do óleo de peixe (OP), foram associados a prognóstico favorável em patologias neurodegenerativas, além de agregar benefícios fisiológicos frente às DCNT. Entretanto, pouco se sabe a respeito das consequências da suplementação com OP durante o declínio cognitivo esporádico relacionado a hiperglicemia e resistência insulínica.

Assim sendo, o presente estudo investigou o efeito da suplementação com OP sob parâmetros metabólicos e neurocomportamentais relacionados ao DM crônico em ratos da linhagem *Wistar*.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus é uma disfunção endócrina, complexa, que impacta tanto a economia do sistema de saúde pública, quanto o crescimento global (SCHLEICHER et al., 2022). É considerada uma das patologias mais comuns e de rápido crescimento mundial, com estimativa de acometer 693 milhões de adultos até 2045 (DUPAK; CAPCAROVA, 2021). Portanto, o DM é caracterizado como um conjunto de doenças metabólicas em que o indivíduo apresenta concentrações glicêmicas anormalmente elevadas (COSTA et al., 2017). Cerca de 90% dos casos de DM se enquadram em duas categorias principais: DM tipo 1 (DMT1) e DM tipo 2 (DMT2) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; SCHLEICHER et al., 2022).

Dados epidemiológicos brasileiros, demonstraram que em 2019 o número de pessoas acometidas com a doença foi de 16,8 milhões, sendo classificado como o quinto país com maior número de pessoas com DM2 (SAEEDI et al., 2019). Na América do Sul e Central, 9,43% da população adulta têm diabetes, com 41,9% dos pacientes não – diagnosticados, com idade entre 20 - 79 anos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), a classificação patológica do diabetes é relacionada ao mecanismo patológico a ele atrelado, que inclui DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional e DM de outros tipos como neonatal ou DM que ocorrem como manifestação secundária a infecções ou medicamentos (RODACKI; TELES; GABBAY, 2022). Contudo, em 2018, Ahlqvist e colaboradores propuseram uma nova subdivisão em 5 categorias: DM auto - imune grave, DM insulino - deficiente grave, DM insulino - resistente grave, DM leve relacionado à obesidade, DM leve relacionado à idade. A partir deste novo agrupamento, os possíveis

fatores sintomatológicos podem ser observados já no início da doença, permitindo a personalização de um tratamento (AHLQVIST et al., 2018).

A DM1 é responsável por 5 a 10% dos casos de DM, sendo ocasionada principalmente, como resultado da destruição autoimune das células  $\beta$ -pancreáticas. A destruição celular culmina na deficiência total de insulina, tornando os pacientes dependentes de insulinoterapia (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019; RODACKI; TELES; GABBAY, 2022). Diferentemente, a DM2 é caracterizada pela hipo-responsividade à insulina endógena, gerando resistência nos tecidos-alvo (resistência insulínica – RI). Cerca de 90 a 95% dos casos de DM são do tipo 2 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

Na DM2 ocorre secreção residual de insulina, a hiperglicemia se desenvolve lenta e progressivamente. Assim, muitos indivíduos com DM2 são assintomáticos, e consequentemente, diagnosticados tardiamente (SUN et al., 2022). Outro aspecto a ser considerado é a pré-disposição genética vinculada a fatores como a idade e a obesidade (responsável por cerca de 80% dos casos de DM2), principalmente, em pacientes com obesidade abdominal central (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; KARELIS et al., 2004; NOLAN; FÆRCH, 2012).

## 2.2 FISIOPATOLOGIA DIABÉTICA E COMORBIDADES ASSOCIADAS

As complicações associadas ao DM são um problema de saúde mundial. O termo “comorbidade” foi introduzido por Feinstein (1970), um epidemiologista que pesquisou sobre a co-ocorrência de doenças entre diabéticos. Ele pressupôs que comorbidade era “qualquer entidade clínica distinta que tenha existido ou que possa ocorrer durante o curso de um paciente que tenha a doença principal (doença índice) (FEINSTEIN, 1970).

Atualmente, a terminologia é empregada para descrever a ocorrência paralela de doenças distintas separadas em um momento cronológico específico (BERGE; RIISE, 2015).

As comorbidades atreladas ao diabetes representam enorme carga em termos de custos. Devido ao caráter multifatorial da doença, que englobam tanto custos médicos específicos, como também os inespecíficos, dificultam a determinação do impacto econômico total (SCHNEIDER, 2020). Contudo, o custo médico específico mundial com pacientes diabéticos (20 – 79 anos) foi de 129 milhões de dólares no ano de 2003 (NARAYAN et al., 2006).

A prevalência mundial do diabetes projetada até 2045 é de 693 milhões de adultos acometidos pela síndrome (DUPAK; CAPCAROVA, 2021). O DM2, caracterizado por hiperglicemia e resistência insulínica (RI) é responsável pela maioria desses casos (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010; WANG et al., 2020; ZHOU et al., 2022). Além da hiperglicemia e RI, a dislipidemia observada frequentemente em diabéticos, elevam ainda mais o comprometimento sistêmico dos acometidos (CHACRA, 2016; PIENKOWSKA et al., 2020). Estes fatores, quando não controlados, e persiste por longos períodos, o indivíduo com DM2 pode desenvolver várias complicações, incluindo disfunções microvasculares (nefropatias, retinopatias e neuropatias periféricas) (BITTEL et al., 2015; SIMA, 2010a), bem como disfunções macrovasculares (como por exemplo, doenças cardiovasculares – DCV e doenças vasculares cerebrais) (BERGE; RIISE, 2015; NG et al., 2020; SADOWSKA; BRUSZKOWSKA, 2017; SHAH et al., 2015).

### 2.3 ENCEFALOPATIA DIABÉTICA

As modificações metabólicas e vasculares inerentes aos DM podem gerar danos progressivos ao sistema nervoso central (SNC), resultando em deficiências cognitivas e comportamentais moderadas. Tais modificações são referidas como encefalopatia

diabética (ED), e aproximadamente 50% dos pacientes diabéticos desenvolvem esta comorbidade no decurso de 25 anos (ALLEN; FRIER; STRACHAN, 2004). Ainda assim, essas modificações são relativamente menos abordadas dentre as comorbidades diabetogênicas (BIESSELS; GISPEN, 2005; DÍAZ-GEREVINI et al., 2019a).

A ED é caracterizada por prejuízo na aprendizagem e memória (SOARES et al., 2013), alterações na psicomotricidade, atenção, funções executoras, velocidade e flexibilidade de pensamento (CHEN et al., 2020; DÍAZ-GEREVINI et al., 2019a). Os sinais como atrofia cerebral, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e doenças vasculares cerebrais tendem a ocorrer com a progressão da patologia (ZHOU et al., 2022), aumentando assim o risco para desenvolvimento de demências, especialmente a doença de Alzheimer (DA) (BAGLIETTO-VARGAS et al., 2016; BIESSELS; DESPA, 2018; YANG et al., 2017). Evidências crescentes demonstraram que durante etapas iniciais da DA, identifica-se prejuízo na sinalização insulínica e déficit no metabolismo da glicose cerebral (DE LA MONTE et al., 2006; RIVERA et al., 2005b).

Receptores de insulina são expressos no SNC em graus variados (POMYTKIN et al., 2018). A ligação da insulina ao seu receptor e também a receptores do fator-1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), promove a ativação de vias sinalizadoras de neurogênese e síntese de proteínas relacionadas a plasticidade sináptica (BARONE et al., 2019). Estes receptores são distribuídos em regiões encefálicas distintas, e estão envolvidos no estabelecimento da potenciação de longa duração (LTP) e da depressão de longa duração (LTD) (BARONE et al., 2019; GRILLO et al., 2009a; SPINELLI; FUSCO; GRASSI, 2020). Assim sendo, inevitavelmente, disfunções relacionadas a insulina durante o decurso da DM, podem inibir as vias de sinalização supracitas, e aumentando a

vulnerabilidade neuronal e progressão do declínio cognitivo (CHOLERTON; BAKER; CRAFT, 2013; DURING et al., 2003).

Alterações hiperglicêmicas são conhecidas por causar disfunções cognitivas, logo os efeitos adversos sobre a funcionalidade do SNC podem ser desencadeados tanto pelo DM1 quanto pelo DM2 (KIM, 2019; SCHNEIDER, 2020; SIMA, 2010). Estudos em humanos demonstraram a existência de relação antagônica entre as concentrações séricas de hemoglobina glicada (HbA1c) e memória de trabalho (MUNSHI, 2017), função executora, aprendizado e performance psicomotora complexa (RYAN et al., 2006).

## 2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS ANIMAIS EM PESQUISAS DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Durante anos, modelos animais têm sido desenvolvidos acompanhando o aprimoramento experimental e investigações científicas, afim de obter respostas frente a patogênese diabética e comorbidades a ela associadas (REES; ALCOLADO, 2005). Segundo Wessler S. (1976), um modelo animal é definido como: “um organismo vivo com um processo patológico herdado, seja naturalmente adquirido ou induzido, que em um ou mais aspectos se assemelhe com o mesmo fenômeno que ocorre no homem” (apud SIEBER; TRAYSTMAN, 1993).

Modelos animais são ferramentas relevantes na pesquisa visto que fornecem percepções adicionais acerca de processos fisiológicos diante de uma enfermidade (SIEBER; TRAYSTMAN, 1993). Sob a luz dessas informações, novas metodologias terapêuticas, bem como estratégias preventivas, são validadas (REES; ALCOLADO, 2005; WANG et al., 2013). Existem diferentes espécies utilizadas como modelos animais de DM2, desde modelos não-mamíferos até primatas não-humanos, sendo que cada um

apresenta vantagens e limitações distintas. A figura 2 resume as principais informações acerca dos principais espécies empregadas como modelo animal em DM2 atualmente disponíveis, considerando critérios como utilidade, vantagens e limitações, via alterada, condições ambientais e antecedentes genéticos (FANG et al., 2019).

Contudo, em virtude do fácil manuseio, docilidade, intervenções de curta geração, fácil disponibilidade, e custos relativamente baixos, a maioria dos modelos disponíveis visam o uso de roedores (SRINIVASAN, 2007). Apesar de cada modelo apresentar vantagens e desvantagens, vale ressaltar que nenhum modelo animal de DM2 é idêntico à síndrome humana (DUPAK; CAPCAROVA, 2021; MACHADO, 2008).

#### 2.4.1 Modelos Quimicamente Induzidos

A maior parte das pesquisas realizadas entre os anos de 1996 e 2006 utilizou o modelo de diabetização animal quimicamente induzido. A estreptozotocina (STZ) e a aloxana (ALX) são drogas de preferência para estudos acerca dos aspectos do diabetes. Em virtude da baixa estabilidade, curta meia-vida e natureza ácida da solução (que impede o uso em via i.p), a ALX passou a ser a segunda droga de escolha, quando se trata de indução diabética (RODRIGUES, 2018). A ação diabetogênica de ambas as drogas, ocorre quando administradas via intravenosa, subcutânea e intraperitoneal (ETUK, 2010; GOYAL et al., 2016). A escolha da dose e da via de administração das drogas, dependem de fatores como: espécie, faixa etária, gênero, estado nutricional do animal (GHEIBI; KASHFI; GHASEMI, 2017; GOYAL et al., 2016; KLEINERT et al., 2018a; LUTZ, 2018).

#### 2.4.2 Estreptozotocina

A STZ foi isolada pela primeira vez em 1959 (GOYAL et al., 2016), a partir de um microrganismo do solo, a *Streptomyces achromogenes*, e apresentou amplo espectro antibiótico (SZKUDELSKI, 2001). As alterações estruturais, funcionais e bioquímicas observadas no processo de diabetização induzido por STZ assemelham-se aquelas observadas na patologia humana, sendo, portanto, um modelo clinicamente relevante para estudos acerca das comorbidades associadas a patogênese diabética (REES; ALCOLADO, 2005; WANG et al., 2013).

Quimicamente, a STZ é um composto de glucosamina nitrosourea nomeado segundo sistema IUPAC (2-desoxi-D-glicose derivado de N-metil-N-nitrosilureia - MNU) (GOUD; DWARAKANATH; CHIKKA SWAMY, 2015). Estruturalmente, é muito similar a 2-desoxi-D-glicose, porém com substituição na posição C2 por um grupo N-metil-N, com grupamento metila ligado a extremidade e uma molécula de glicose na outra (Figura 1) (GOYAL et al., 2016). Normalmente, apresentando-se como pó cristalino amarelo pálido ou cristalino, a STZ é um composto hidrofílico com meia-vida biológica entre 5 e 15 minutos, aproximadamente (GHEIBI; KASHFI; GHASEMI, 2017).

Por ser molécula análoga à glicose, o acesso da STZ às células  $\beta$  – pancreáticas ocorre via transportador de glicose 2 (GLUT2) (GOUD; DWARAKANATH; CHIKKA SWAMY, 2015). Uma vez no citoplasma, a STZ se acumula no interior celular e gera metilação de DNA, ocasionando ações diabetogênicas (WSZOLA et al., 2021). Apesar disso, a validade dos protocolos de diabetização pelo emprego da STZ é questionável, visto a variabilidade dos efeitos orgânicos apresentados pelos modelos experimentais (GOYAL et al., 2016).

Dentre a problemática envolvida na diabetização por STZ destacam-se: dose – resposta *versus* mortalidade, toxicidade seletiva de células  $\beta$  – pancreáticas e gênero.

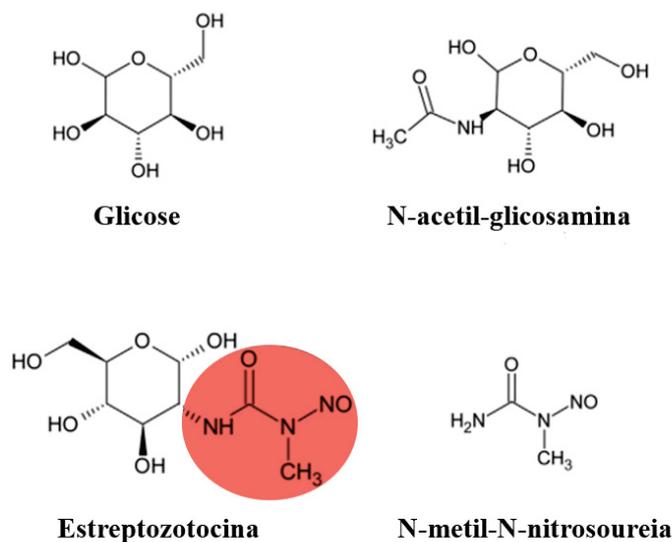
Normalmente em ratos adultos, doses de STZ abaixo de 60 mg/kg induzem a hiperglicemia, enquanto que doses superiores a 75 mg/kg estão vinculadas a mortalidade dose – dependente (GAJDOŠÍK et al., 1999; ISLAM; WILSON, 2012).

#### 2.4.3 Mecanismo Diabetogênico da Estreptozotocina

A atividade diabetogênica da STZ ocorre pelos seguintes mecanismos: alquilação de DNA, liberação de óxido nítrico (NO) a partir do grupo nitrosourea (porção MNU) e, formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), culminando em necrose das células  $\beta$  – pancreáticas (GHEIBI; KASHFI; GHASEMI, 2017; GOYAL et al., 2016). Ademais, a glicosilação e alquilação de proteínas são fatores que amplificam a ação tóxica da STZ (RODRIGUES, 2018).

A atividade alquilante da STZ é o mecanismo mais importante para a necrose das células beta pancreáticas, uma vez que os efeitos tóxicos dessa droga podem prejudicar os processos vitais que ocorrem no DNA (BORDIN et al., 2013; PUYO et al., 2014; KR et al., 2014). A alquilação da MNU da guanina, especialmente na posição 06 é a principal causa da morte das células  $\beta$  - pancreáticas (ELSNER et al., 2000) (Figura 2).

FIGURA 1: Semelhanças estruturais entre as moléculas de glicose e estreptozotocina



**Legendas:** Estruturas químicas da glicose, N-acetil-D-glicosamina, estreptozotocina e N metil-N-nitrosoureia. Fonte: Adaptado de GOYAL et al., 2016.

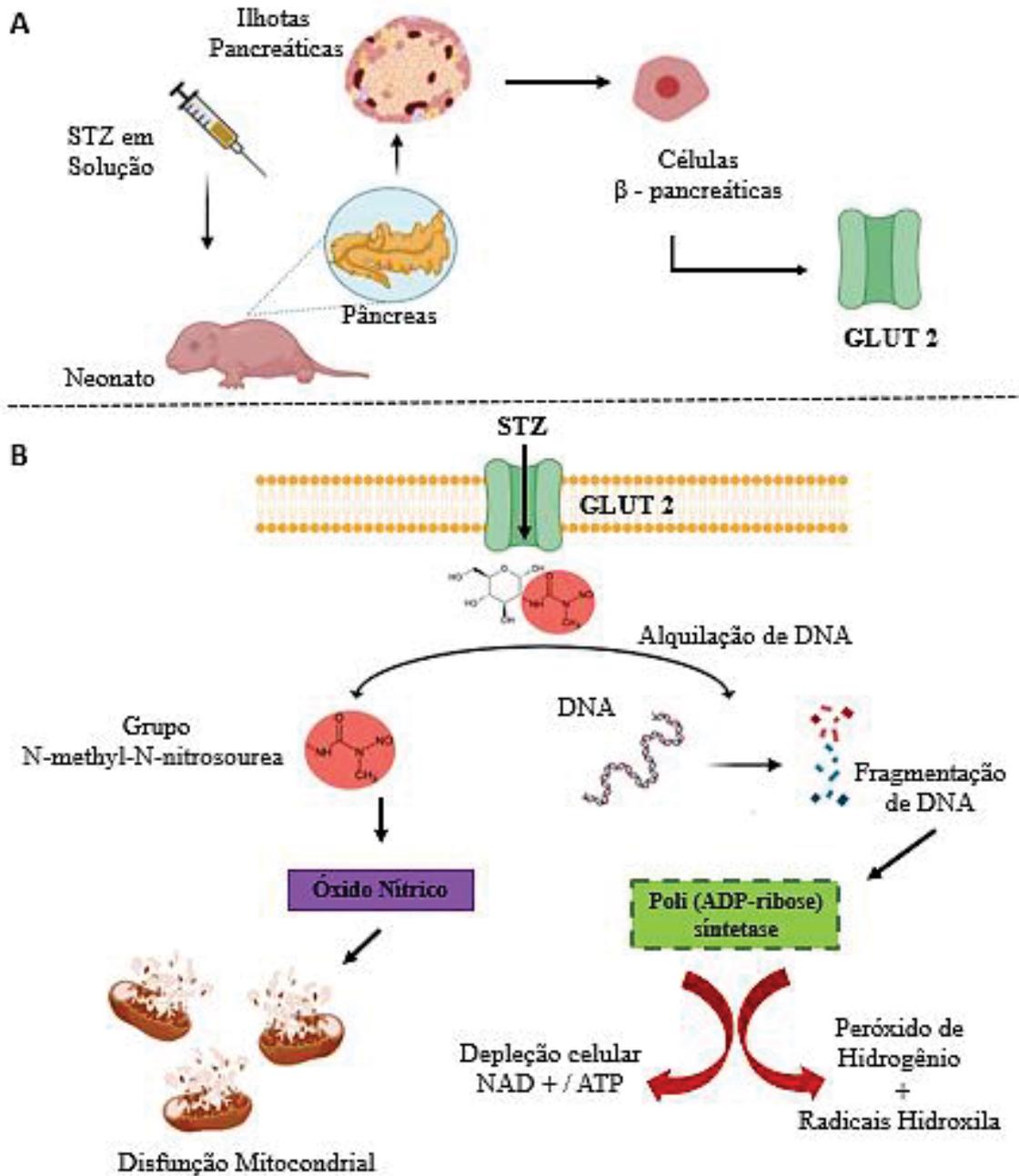
Inicialmente, um grupo metila da STZ é transferido para a molécula de DNA da célula beta, desencadeando uma série de eventos, que por fim acarretará na fragmentação e destruição do DNA. Numa tentativa de reparação a lesão do DNA, a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP-1) é super estimulada, reduzindo a quantidade de  $\text{NAD}^+$  e ATP. Dessa forma, a depleção das reservas de energia celular e a redução de ATP resultam na necrose das células beta pancreáticas e na inibição da síntese e secreção de insulina (LENZEN, 2008).

Além disso, foi visto que a STZ é capaz de transferir grupo metila também a proteínas, sendo esse, provavelmente, um mecanismo que contribui para a destruição das células beta (SZKUDELSKI et al., 2001). Outros fatores prejudiciais adicionais é a glicosilação dessas proteínas, sendo estes eventos que amplificam o efeito citotóxico da STZ e a liberação do óxido nítrico (NO) dentro das células beta pancreáticas a partir da

metabolização da STZ. Esse evento também contribui danificando as bases que compõem o DNA (SZKUDELSKI et al., 2001).

A formação de EROS, principalmente de radicais superóxido e hidroxila, é resultado da ação da STZ sobre mitocôndrias e consequência do aumento da atividade da xantina oxidase, enzima cuja função é catalisar a oxidação de hipoxantina para xantina. Ainda, a STZ inibe o ciclo de Krebs (TURK et al., 1993), diminuindo drasticamente o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias. Esse processo limita a produção de ATP pelas mitocôndrias, causando a depleção desse nucleotídeo nas células beta, acelerando o processo de destruição dessas células e o desenvolvimento do DM (NUKATSUKA et al., 1990, SOFUE et al., 1991).

FIGURA 2: Mecanismo de ação de estreptozotocina em animais neonatos



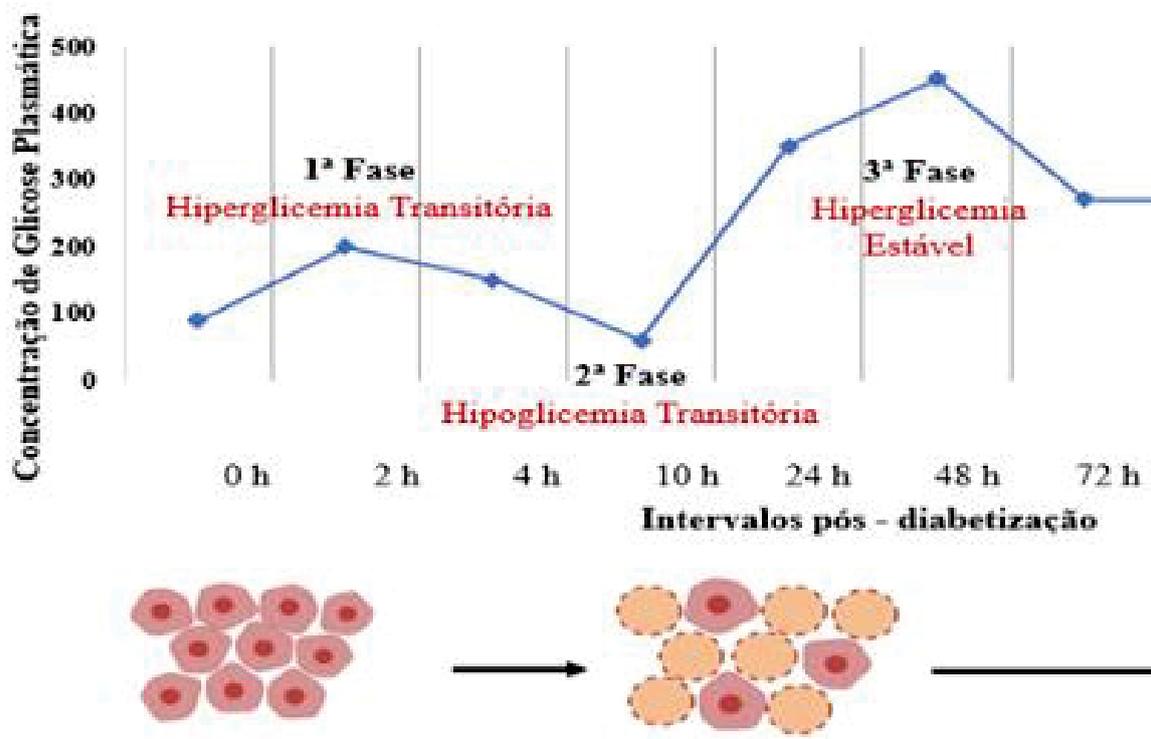
**Legendas:** (A) Mecanismo de dano em células  $\beta$  - pancreáticas com dose única de STZ em solução; (B) mecanismo de ação da STZ no núcleo das células  $\beta$  - pancreáticas. Fonte: A autora.

#### 2.4.4 Resposta Glicêmica Trifásica da Estreptozotocina em Animais Adultos e as Eventuais Modificações na Dibetização em Neonatos

Após a destruição das células beta pancreáticas, pela ação da STZ, ocorre uma resposta cronológica trifásica (Figura 3), descrita com base em diabetização em animais adultos (GOYAL et al., 2016). A fase inicial (Fase 1) é caracterizada por pico glicêmico transitório (hiperglicemia) com redução das concentrações de insulina (hipoinsulinemia), ocasionando na depleção dos estoques de glicogênio hepático (LENZEN, 2008). Após, em função do rompimento das células beta, ocorre a liberação maciça de insulina (hiperinsulinemia) e consequente hipoglicemia. Essa fase pode ser letal para os animais, em função da hipoglicemia descontrolada. Em animais adultos, essa condição pode ser evitada pela administração de sacarose (10%), pelo período de 48 horas pós-diabetização (FURMAN, 2015). A terceira e última fase (fase 3), envolve o aumento das concentrações de glicose sanguínea na faixa de 350 e 400 mg/dL, em ratos adultos (GOYAL et al., 2016).

Diferentemente, em animais neonatos, a fase 3 sofre efeito compensatório a longo prazo (SATROM et al., 2018). A porção de células  $\beta$  – pancreáticas remanescentes tendem a aumentar a secreção insulínica, pois se hipertrofiam, gerando efeito compensatório e, mantendo a glicemia plasmática dentro da faixa de normalidade (KISS et al., 2013). Entretanto, estas células podem atingir a exaustão e, sequencialmente, diminuir sua funcionalidade, culminando em hiperglicemia no período adulto (TAKADA et al., 2007).

FIGURA 3. Ação trifásica da estreptozotocina em roedores



**Legendas:** Atividade trifásica da estreptozotocina sobre a concentração glicêmica transitória de 0 à 72 horas pós-diabetização, seguido pela estabilização de quadro hiperglicêmico leve à moderado 30 dias pós - indução. Fonte: A autora.

O modelo animal de diabetização induzido por STZ em período neonatal (n-STZ) caracteriza-se como modelo de diabetes mellitus não-insulino-dependente (NID) (SARTORETTO et al., 2005). Primeiramente descrito por Portha e colaboradores (1974), o modelo de STZ-n baseia-se na destruição das células  $\beta$  – pancreáticas, com posterior regeneração parcial destas células e, o retorno da concentração glicêmica à normalidade dentro de duas semanas. Porém, o distúrbio da resposta da insulina à glicose permanece, promovendo o modelo de diabetes tipo II surgimento de intolerância glicêmica (MACHADO, 2008; PORTHA et al., 1974).

## 2.5 LIPÍDEOS E ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Lipídeos são componentes essenciais da dieta e possuem funções diversas nos sistemas biológicos. Na alimentação, os lipídeos são usualmente encontrados na forma de triacilgliceróis, sendo estes caracterizados pela associação de três ácidos graxos a uma molécula de glicerol (CURI et al., 2002).

Os ácidos graxos são formados por uma cadeia de átomos de carbono ligados a átomos de hidrogênio. Os ácidos graxos ditos insaturados, são aqueles em que uma dupla ligação (insaturação) ocorre entre os átomos de carbono adjacentes. Assim, o número de insaturações encontradas na cadeia carbônica irá determinar a nomenclatura do ácido graxo como mono ou poli-insaturado (AGPI). As propriedades químicas nutricionais e funcionais dos ácidos graxos são determinadas pelas diferentes posições e quantidade de insaturações encontradas ao longo da cadeia (CURI et al., 2002; FAROOQUI, 2009; NALIWAIKO, 2009).

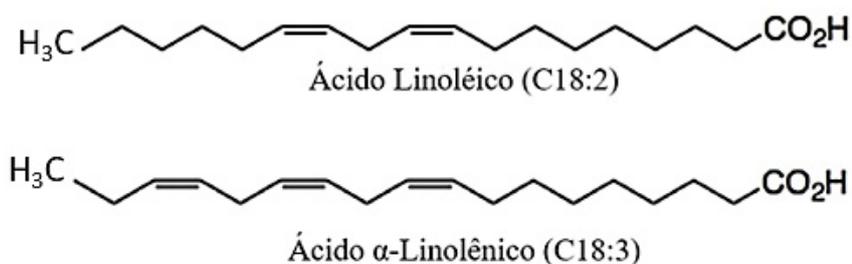
Existem duas grandes famílias de AGPI's, conhecidas como n-6 (ou ômega-6) e a n-3 (ou ômega-3). Os AGPI n-6 apresentam a primeira insaturação entre os carbonos C6 e C7 a contar do carbono ômega (localizado no radical metila), e seu precursor é o ácido graxo essencial linoléico (AL) (18:2). Já AGPI da família n-3 são derivados do ácido graxo essencial  $\alpha$ -linolênico (ALA) (18:3) (Figura 4), em que a primeira insaturação é localizada entre os carbonos C3 e C4, contando a partir do carbono ômega. As demais insaturações destes AGPIs essenciais ocorrem entre os carbonos C12 e C13, e entre C15 e C16 (INNIS, 2002; NELSON L; COX, 2014).

Mamíferos são incapazes de sintetizar AL e ALA, devido à ausência das enzimas  $\Delta$ -15 e  $\Delta$ -12 dessaturases, portanto os ácidos graxos essenciais devem ser obtidos da dieta. Uma vez ingeridos, eles são metabolizados por um conjunto enzimático, em que novos

átomos de carbonos e insaturações são adicionados à cadeia carbônica de origem, produzindo assim, AGPI de cadeia longa da mesma família (BURDGE; CALDER, 2015).

A via de dessaturação e alongamento de ácidos graxos em mamíferos ocorre predominantemente no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos. O ALA e AL são substratos competitivos da mesma via enzimática sendo o ALA o substrato de maior preferência da enzima  $\Delta 6$  dessaturase. Contudo, a prevalência de AL nas dietas, favorece maior taxa de metabolização de ômega-6 (BURDGE; CALDER, 2015).

FIGURA 4: Cadeia carbônica dos Ácidos graxos essenciais

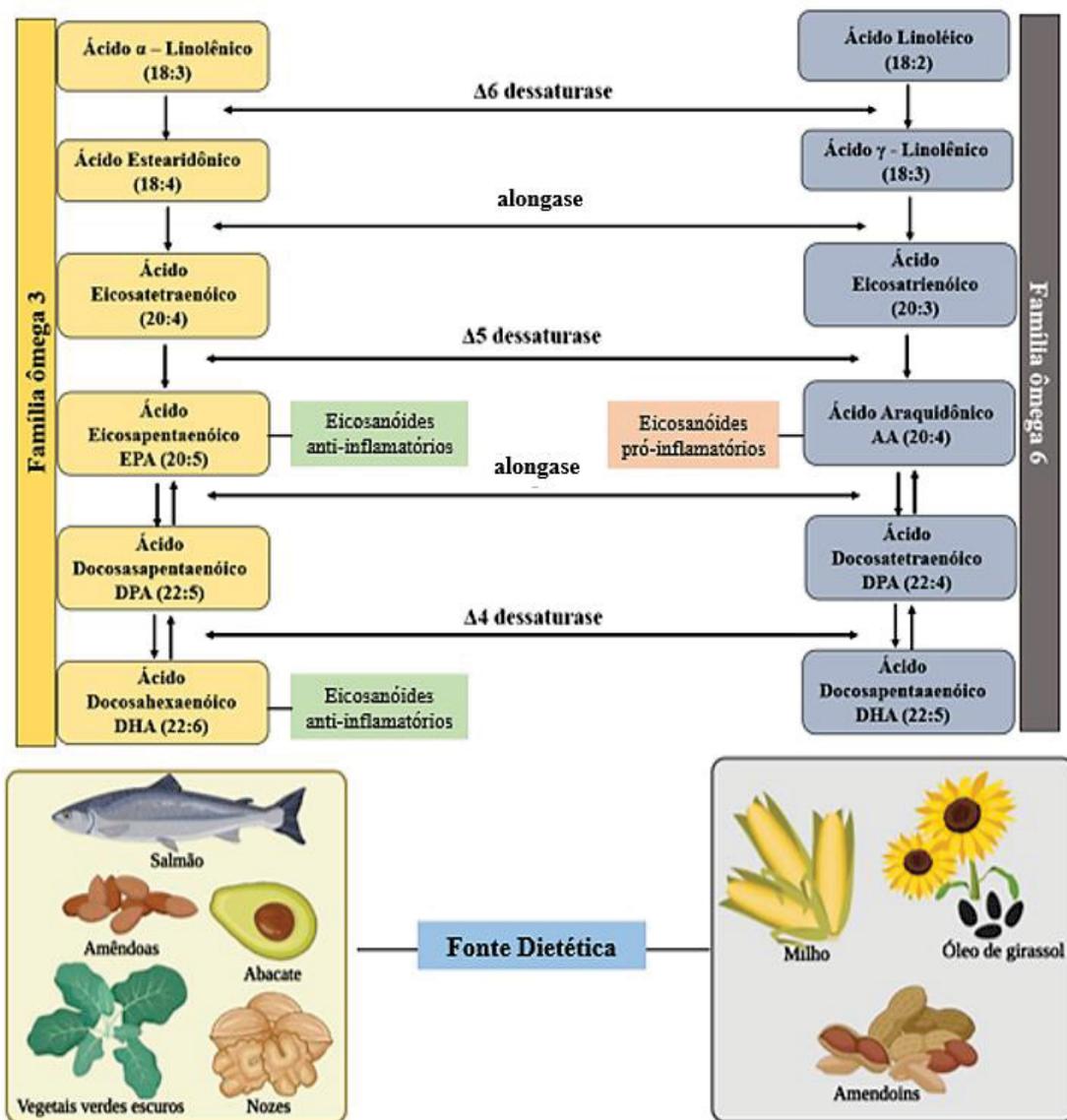


Fonte: Adaptado de SANDA; JISAK, 2011.

Um complexo citoplasmático composto por várias enzimas, chamado de ácido graxo-sintase, é o responsável por catalisar a síntese de ácidos graxos. A cada ciclo de passagem pela ácido graxo-sintase, dois átomos de carbono são adicionados à cadeia original. A partir de ALA e AL, a enzima  $\Delta 6$  dessaturase insere uma insaturação entre os carbonos C6 e C7 dos dois precursores. Em seguida, o alongamento da cadeia carbônica ocorre pela atividade da alongase 5, formando ácidos graxos de 20 átomos de carbono. Novas insaturações entre os carbonos C5 e C6, são formadas por intermédio da  $\Delta 5$  dessaturase, resultando nos ácidos araquidônico (20:4 n-6) e o eicosapentaenóico (20:5

n-3). Esse mecanismo pode prosseguir para a formação de ácidos graxos de cadeias carbônicas maiores, como os ácidos docosapentaenóico (22:5 n-6) e docosahexaenóico (22:6 n-3) (Figura 5) (BURDGE; CALDER, 2015; DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018; NELSON L; COX, 2014).

FIGURA 5: Esquema da síntese de ácidos graxos poli-insaturados



**Legenda:** Atividade das enzimas alongases e dessaturases ( $\Delta 4$ ,  $\Delta 5$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 9$  e  $\Delta 12$ ) e formação dos ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-6 e ômega-3. Vias de alongamento e dessaturação dependentes dos precursores ácido linoléico (18:2 n-6) e  $\alpha$ -linolênico (18:3 n-3). Principais fontes alimentares de obtenção representadas abaixo da via de síntese de cada família. Esquema baseado em trabalhos publicados anteriormente (BURDGE; CALDER, 2015).

### 2.5.1 FUNÇÕES DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos são encontrados no organismo armazenados na forma de triacilgliceróis (TG). Estes estão contidos principalmente nos panículos adiposos, e sua liberação é controlada positivamente pela ativação da LHS, e negativamente pela ação da insulina (NELSON L; COX, 2014). O aumento da concentração de TG plasmático fornece precursores para geração energética, via  $\beta$  – oxidação de ácidos graxos, processo realizado nas mitocôndrias e peroxissomos (LAI et al., 2020; ZAZULA, 2021).

O papel dos ácidos graxos não se restringe apenas a funções metabólicas. A estrutura e função das membranas celulares depende da composição dos fosfolípidos contidos na bicamada, que por sua vez, determinam fluidez da membrana, permeabilidade e ancoragem das proteínas, bem como a produção de segundos mensageiros em vias de transdução de sinal, considerando que a composição geral de ácidos graxos dos fosfolípidos de membrana depende de cada tipo celular, tecido e organismo (CALDER, 2015; MACHADO, 2008).

A metabolização dos ácidos graxos de fosfolípidos (via fosfolipases), dá origem a segundos mensageiros. Os mediadores bioativos chamados de eicosanóides, são derivados do metabolismo de AGPI de cadeia carbônica composta de 20 carbonos. Os representantes dessa classe são prostaglandinas (PG), tromboxanas (TX) e leucotrienos (LT), e são produzidos a partir dos ácidos graxos pela ação decicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) (CALDER, 2015; DU et al., 2006). O papel dos eicosanóides derivados da família ômega-6 desempenham funções importantes no processo inflamatório e imunitário, portanto são chamados de moléculas pró-inflamatórias. Já os eicosanóides derivados da família ômega-3 apresentam menor reatividade inflamatória, sendo denominados anti-inflamatórios (CHRISTI; HARWOO, 2020).

## 2.6 ESTILO DE VIDA OCIDENTAL E DIABETES MELLITUS TIPO 2

Doenças relacionadas ao estilo de vida são desenvolvidas, principalmente, pelos hábitos e relacionamento inadequado com o meio em que estão inseridos. Tais fatores, combinados com o aumento da idade populacional e DM elevam a prevalência de declínio cognitivo esporádico (SHARMA et al., 2020). Em virtude do controle glicêmico rigoroso e do aprimoramento do manejo das comorbidades associadas ao diabetes, ocorreu aumento significativo da taxa de sobrevivência do indivíduo diabético nas últimas décadas (COSTA et al., 2017; SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). Logo, uma grande parcela da população mundial vive durante longos períodos expostos às complicações associadas à doença. Embora as intervenções farmacológicas comumente adotadas, cooperem para amenização de tais comorbidades, fatores inespecíficos ao diabetes contribuem para o estabelecimento de vias neurodegenerativas tardias e silenciosas (PUGAZHENTHI; QIN; REDDY, 2017).

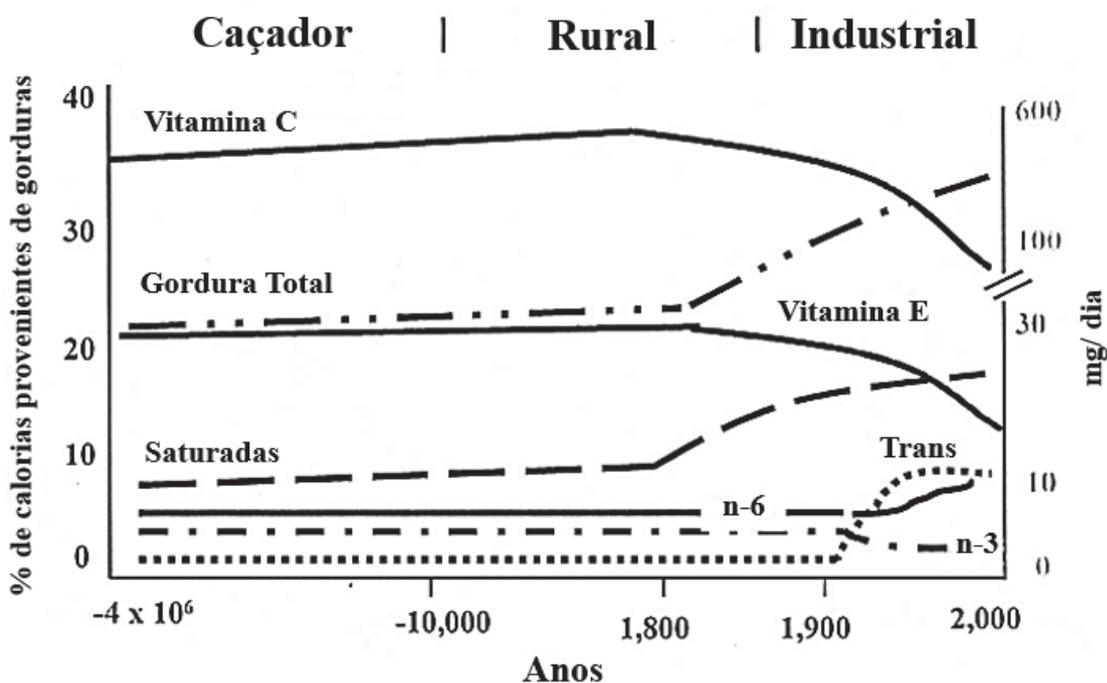
Em função da adoção de práticas associadas à cultura ocidental europeia (ocidentalização), um número crescente de pessoas mais jovens (40 – 55 anos; meia-idade) tem desenvolvido diabetes (MOHEET; MANGIA; SEAQUIST, 2015; VAN BUSSEL et al., 2017). Naturalmente, os fatores de risco para o desenvolvimento de danos cognitivos em diabéticos mais jovens podem variar em relação aos adultos mais velhos, em razão da cronificação e severidade da doença (CHAYTOR, 2016). Assim, o padrão do estilo de vida ocidental é um catalizador em potencial para o desenvolvimento de ED.

### 2.6.1 MODIFICAÇÃO DA DIETA

As modificações dietéticas sempre acompanharam a evolução de mamíferos e outras espécies, juntamente com a habilidade de armazenar energia, garantindo a sobrevivência em longos períodos de privação nutricional. Estudos sobre o aspectos

evolutivos da dieta indicam que grandes mudanças ocorreram em nossa dieta, particularmente no tipo e quantidade de lipídeos e no poder antioxidante contido nos alimentos (Figura 6) (SIMOPOULOS, 2002).

FIGURA 6: Perfil do consumo de ácidos graxos da espécie humana ao longo dos anos



Fonte: Adaptado de SIMOPOULOS, 2002.

A partir a revolução industrial no século XVIII, a implementação da indústria gerou modificação do estilo de vida rural, ocasionando alterações significativas na sociedade (ANDREWS; JOHNSON, 2020). O desenvolvimento de novas tecnologias, juntamente com a diminuição do trabalho manual, culminou na redução de custos económicos e aumento na produção de alimentos, facilitando o acesso e consumo populacional (BIOBAKU et al., 2019; ZAZULA, 2021). O aumento do consumo de grãos provocou a redução da ingestão de ácidos graxos essenciais. Consequentemente, houve elevação do aporte de gorduras saturadas, juntamente com maior consumo de alimentos

ricos em gordura e carboidratos, deslocando a base alimentar das dietas modernas para maiores concentrações lipídicas (SIMOPOULOS, 2016).

Associado ao aumento da ingestão de ácidos graxos saturados, as dietas ocidentais tem favorecido o desequilíbrio entre as proporções de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), aumentando a biodisponibilidade de AGPI n-6 e reduzindo a de AGPI n-3 (SIMOPOULOS, 2006). Os AGPI n-6, por sua vez, são fonte de geração de moléculas pró-inflamatórias e, portanto, tem sido associado à instauração de várias DCNT, como o DM2 (WEIR et al., 2020).

Ácidos graxos n-3 são de grande importância para o desenvolvimento fisiológico e ação preventiva de DCNT. Tais benefícios são comprovados por estudos epidemiológicos que reportam a baixa prevalência da intolerância à glicose, DM2, infarto do miocárdio, inflamação crônica, entre outras, em populações que consomem grandes quantidades de AGPI n-3. Por outro lado, as dietas ricas em gorduras saturadas e com baixo teor de AGPI n-3 estão associadas com o aumento da adiposidade, aumento do risco de DM2, redução da sensibilidade à insulina no músculo esquelético e distúrbios no metabolismo da glicose (KALIANNAN et al., 2019; LICHTENSTEIN; SCHWAB, 2000; NETTLETON; KATZ, 2005). No entanto, os mecanismos do efeito protetor dos ácidos graxos n-3 não estão totalmente esclarecidos.

Uma hipótese é que os efeitos do ômega-3 sobre o DM2 são decorrentes da incorporação nos fosfolípidios de membranas dos tecidos insulino-dependentes, somados a seu efeito hipolipidêmico. Borkman e colaboradores (1993) mostraram, pela primeira vez, a associação entre a composição de ácidos graxos dos fosfolípidios de membrana no músculo esquelético e a sensibilidade à insulina em humanos. Logo, criou-se uma correlação entre as proporções de ácidos graxos poliinsaturados que compõem os

fosfolipídios de membrana nas células musculares, com a sensibilidade à insulina daquele tecido (BORKMAN et al., 1993).

O perfil de ácidos graxos das membranas é capaz de influenciar a ação insulínica, modulando a afinidade do receptor e a translocação dos transportadores de glicose na membrana. Em estudos anteriores, pesquisadores demonstraram que alterações na composição da membrana de músculo de roedores, ocasionada pela ação de AGPI n-3, afetaram proteínas intracelulares como a IRS-1 e PI<sub>3</sub>K (LOMBARDO; CHICCO, 2006; TAOUIS et al., 2002). Já a suplementação com óleo de peixe (OP) ao longo de 18 semanas teve ação preventiva da instalação de RI em um modelo animal de diabetes espontânea. Possivelmente, a suplementação com OP ocasionou maior expressão do RNA mensageiro dos transportadores de GLUT-4, mediado pela alteração na composição da membrana (LOMBARDO; CHICCO, 2006).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da suplementação com OP frente aos transtornos metabólicos e cognitivos e comportamentais associados ao diabetes mellitus tipo 2.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Acompanhar a evolução da massa corporal dos animais adultos a partir da 13<sup>a</sup> – 20<sup>a</sup> semana de idade;
- Determinar o consumo alimentar e hídrico, bem como o volume urinário e fecal dos animais;
- Verificar comprometimento cognitivo pela avaliação de parâmetros relacionados à aprendizagem e memória;

- Caracterizar o perfil glicêmico, lipídico e murinométrico das populações amostrais;
- Mensurar a concentração plasmática de insulina, interleucinas IL-10 e IL-6;
- Determinar a resistência e sensibilidade insulínica dos grupos amostrais;
- Analisar as proporções aterogênicas dos animais;
- Avaliar o conteúdo de glicogênio muscular e hepático dos grupos,
- Quantificar danos oxidativos e neurotoxicidade em regiões encefálicas de telencéfalo e diencefalo.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os procedimentos utilizados foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) – UFPR, conforme o certificado 1271/2019 (ANEXO 1).

##### **4.1. ANIMAIS**

Ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*), foram obtidos do a partir de acasalamento prévio, e mantidos sob ciclo invertido claro/escuro (12:12 h), a 23 ± 1°C, com acesso livre a água e ração (Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba, PR). Cento e vinte animais foram utilizados para esta fase experimental, sendo 60 ratos diabetizados e 60 ratos controle.

##### **4.2. DESENHO EXPERIMENTAL**

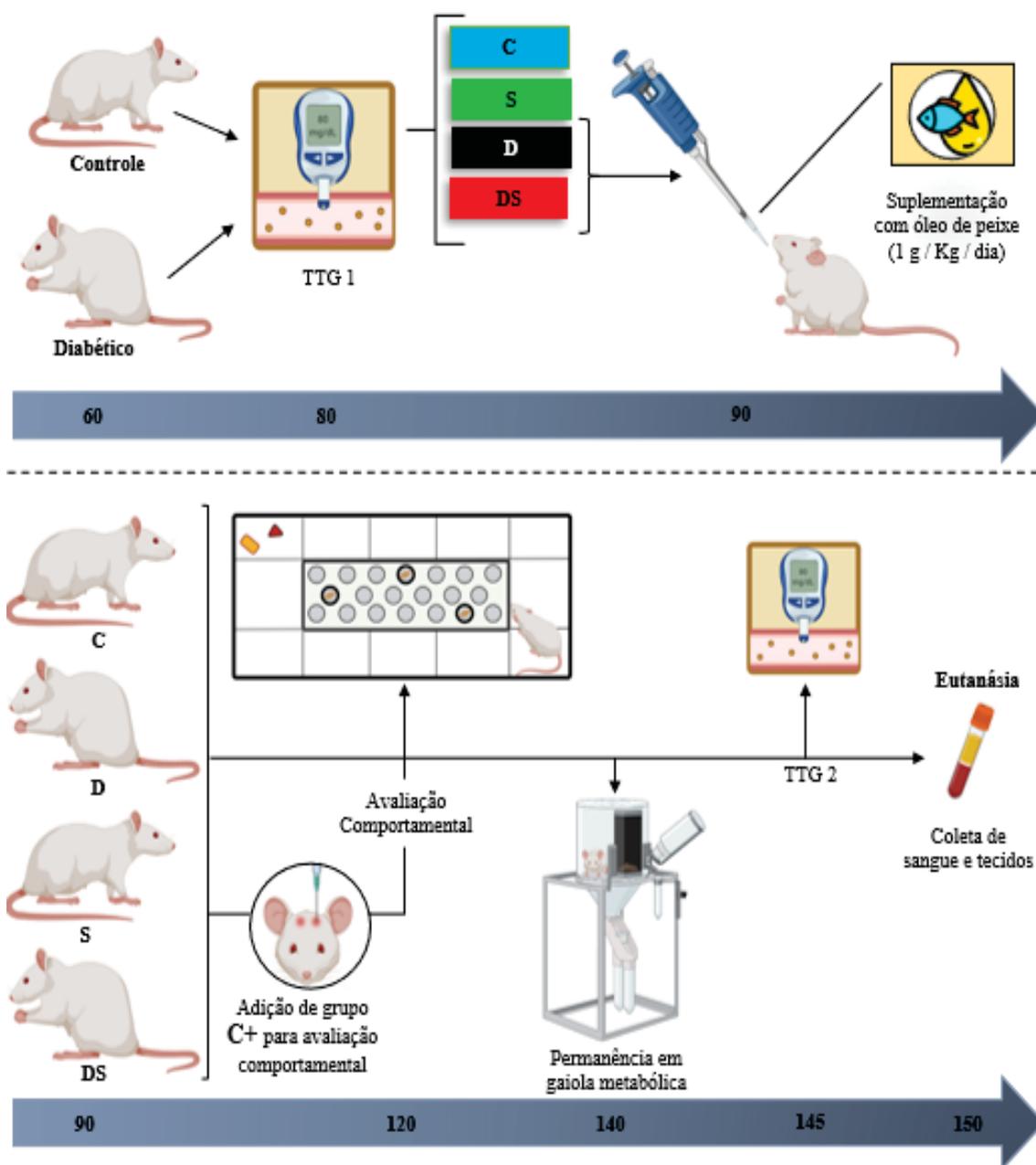
Ratos diabetizados no 2º DPN, por injeção intraperitoneal de STZ foram mantidos sob condições controladas até os 80 dias de vida. Neste período, os animais foram submetidos ao teste de tolerância a glicose, para confirmação do estabelecimento do

quadro diabético. Apenas animais com intolerância à glicose (glicemia igual ou superior à 150 mg/dL de glicose após 120 minutos da sobrecarga) foram considerados potencialmente diabéticos e aptos para a continuidade do experimento. Após esta confirmação, os grupos foram subdivididos em grupo controle, suplementado com óleo de peixe rico em AGPI n-3, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe rico em AGPI n-3 (Figura 7). Assim, aos 90 dias de vida, os animais que compuseram os grupos suplementados passaram a ser suplementados por um período de 60 dias.

Com 120 dias de idade, os animais tiveram parâmetros cognitivos avaliados pelo emprego do teste *Modified Hole Board (mHB)*. Para esta etapa um grupo de animais foi incluído no estudo representando o controle positivo de declínio cognitivo (L) devido a lesão hipocampal induzida. No DPN 140, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas onde permaneceram durante 24 horas. Foi mensurado consumo alimentar (g) e hídrico (mL), volume urinário (mL), fezes liberadas (g). Aos 145 dias, um novo TTG (TTG 2) foi realizado e, ao completarem 150 dias, todos os animais foram eutanasiados por decapitação após 12 horas de jejum.

O sangue foi coletado em tubos heparinizados os quais foram centrifugados por 7 minutos a 4528 g para a obtenção do plasma. Os encéfalos foram coletados sendo destinados para avaliação do sistema antioxidante. O fígado, os tecidos adiposos mesentérico, retroperitoneal e gonadal, e os músculos (sóleo e gastrocnêmio) foram coletados, pesados e o resultado expresso em g/ 100 gramas de massa corpórea. Amostras do tecido hepático e muscular foram congelados a -80°C até processamento para análise bioquímica.

FIGURA 7: Esquema do delineamento experimental



**Legenda:** DNP: dia pós-natal; TTG: teste de tolerância à glicose; C: grupo controle com 150 dias de idade; S: grupo suplementado com 150 dias de idade; D: grupo diabético com 150 dias de idade; DS: grupo diabético suplementado com 150 dias de idade; L: grupo controle positivo para declínio cognitivo. Fonte: do autor.

### 4.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos 5 grupos experimentais, conforme descrito abaixo:

- Grupo controle com 150 dias de idade (C) (n = 30 animais);
- Grupo diabetizado com 150 dias de idade (D) (n = 30 animais);
- Grupo controle suplementado com 150 dias de idade (S) (n = 30 animais);
- Grupo diabetizado suplementado com 150 dias de idade (DS) (n = 30 animais);
- Grupo controle positivo para dano cognitivo hipocampo - dependente (L) (n = 15 animais).

### 4.4. MODELO DE DIABETES MELLITUS NEONATAL

No segundo DPN, os filhotes machos destinados ao grupo diabético receberam uma única injeção via intraperitoneal (i.p.) STZ na dose de 100 mg/kg solubilizada em tampão citrato 10 mM (pH 4,5) (SATROM et al., 2018). Os filhotes pertencentes ao grupo controle receberam apenas o veículo. Após a administração, os filhotes foram devolvidos a suas respectivas progenitoras.

### 4.5. INDUÇÃO AO MODELO DE PREJUÍZO COGNITIVO

Para a indução de danos cognitivos hipocampo - dependente, empregou-se o protocolo cirúrgico descrito anteriormente por Moreira-Silva e colaboradores (2018). Em suma, ratos com 90 dias de idade (350 – 400 g) foram previamente anestesiados (i.p.) com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e posicionados no aparato estereotáxico. Após exposição cranial, e dois foram feitos dois orifícios bilateralmente, seguindo as coordenadas a partir do bregma (-0,8 mm no eixo anteroposterior,  $\pm$  1.4 mm no eixo

medial-lateral e -3.6 mm no eixo dorso-ventral, em concordância com Paxinos e colaboradores (2005). Uma vez estabelecidos os acessos ao encéfalo, adminisrou-se bilateral, via intracerebroventricular (i.c.v) 2 µL de STZ (2 mg/kg) (fluxo de 1µL/min), solubilizada em tampão citrato 10 mM (pH 4,5).

Após a cirurgia, os animais receberam analgesia intramuscular (meloxicam, 1 mg/kg), além de 2 mL de solução salina (via subcutânea) para reidratação. Adicionalmente, os animais foram mantidos em mantas térmicas com temperatura controlada até a recuperação e então devolvidos a suas caixas.

#### 4.6. SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE

A suplementação oral com óleo de peixe teve início aos 90 dias de vida e foi realizada diariamente na dosagem de 1g/kg de massa corporal, com o auxílio de uma pipeta de volume ajustável, até completarem 150 dias de idade. As cápsulas de óleo de peixe continham 180 mg de EPA e 120 mg de DHA (Capsule Works NBTY Inc.).

#### 4.7. EVOLUÇÃO DO ACRÉSCIMO DE MASSA CORPORAL

O ganho de massa corporal (g) dos animais foi avaliado da 13<sup>a</sup> até 20<sup>a</sup> semana de idade, pesando-se os animais individualmente, uma vez por semana, em balança digital (GEHAKA, 350).

O Índice de Lee foi determinado aos 120 e 150 dias de idade (Bernardis; Patterson (1968), a partir da relação entre massa corporal e comprimento naso-anal (CNA), pelo emprego da fórmula:

$$IL = \sqrt[3]{\text{massa corporal/CNA}}$$

#### 4.8. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Após 8-12 horas de jejum, os animais foram anestesiados via i.p. com pentobarbital sódico 3% (40 mg/kg). A sobrecarga de glicose (75 mg de glicose/ 100 g de massa corporal) foi administrada via veia peniana dorsal e a mensuração da glicemia efetuada pelo sangue coletado da veia caudal nos tempos de 0 (basal – antes da administração da sobrecarga de glicose), 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. A concentração de glicose no sangue foi determinada usando glicosímetro (One Touch Ultra ®) (TAKADA et al. 2007).

#### 4.9. TESTE *HOLE BOARD* MODIFICADO

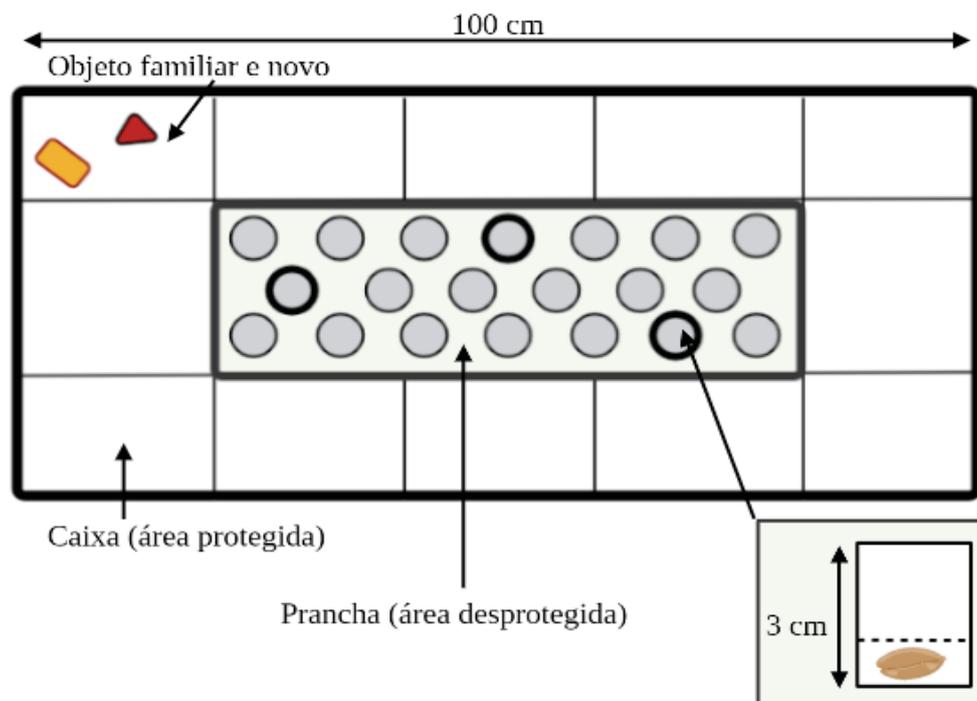
Aos 120 dias de vida, os animais foram submetidos ao teste *Hole Board*, modificado, (HBm) conforme descrito por (KOOIJ et al., 2010) e (LABOTS et al., 2015a).

##### 4.9.1. Aparato

O HBm era consistido de uma caixa retangular, opaca, de PVC (100 x 50 x 50 cm), na qual uma prancha (60 x 20 cm) foi posicionada no meio da caixa. A prancha possuía 20 cilindros opacos (3 cm Ø e 4 cm de altura) alinhados em 3 fileiras (Figura 8). A área ao redor da prancha, estava dividida em 10 retângulos (20 x15 cm) e 2 quadrados (20 x 20 cm). Uma luz de palco foi posicionada acima da prancha para criar contraste na intensidade luminosa entre a prancha (representando uma área desprotegida) e a caixa (área protegida) (LABOTS et al., 2015).

O monitoramento dos animais foi feito durante 5 dias consecutivos, com até 4 tentativas diárias e duração máxima de 5 minutos por tentativa. Ao término de cada tentativa o aparato era limpo com papel toalha e solução de álcool 5% para evitar interferências olfatórias. Para o desenvolvimento de análise cega e livre de interferências do experimentador, os dados foram adquiridos por um sistema de gravação de vídeo, que foi instalado acima da área de teste.

FIGURA 8: Ilustração da arena do aparato HBm



**Legenda:** Imagem representativa da arena de avaliação do teste *Modified Hole Board*.  
Fonte: do autor.

#### 4.9.2. Habituação dos animais

Considerando a fase de maior atividade dos animais, tanto a habituação quanto os testes foram realizados entre as 10:00 – 17:00 horas. A habituação foi feita nas duas semanas que antecederam os testes. Durante este período, o mesmo experimentador realizou a manutenção e manejo dos animais. Quatro vezes por semana, os animais que

seriam submetidos aos testes foram levados até a sala de teste, manuseados e mantidos no local por cerca de cinco horas. Após, os animais eram devolvidos ao biotério.

#### 4.9.3. Reconhecimento de Objeto Novo e Familiar

A familiarização com o objeto ocorreu dois dias antes do início dos testes. A avaliação do reconhecimento de objetos foi realizada no primeiro e no último dia de teste. O objeto familiar foi colocado no aparato cerca de 2 cm distante do objeto novo, no canto em frente ao ponto de partida. A frequência exploratória do animal para cada objeto foi contabilizada.

#### 4.9.4. Atividade Exploratória

Os animais foram colocados diretamente na área de teste, sempre no mesmo local, com face voltada para as paredes da caixa e deixados explorar o ambiente livremente. Os parâmetros avaliados foram atividade locomotora (número de linhas cruzadas), exploração direta (frequência de cilindros visitados), exploração indireta (número de rearing) e evasão (relação percentual de permanência na prancha em comparação a periferia da arena).

#### 4.9.5. Teste Cognitivo

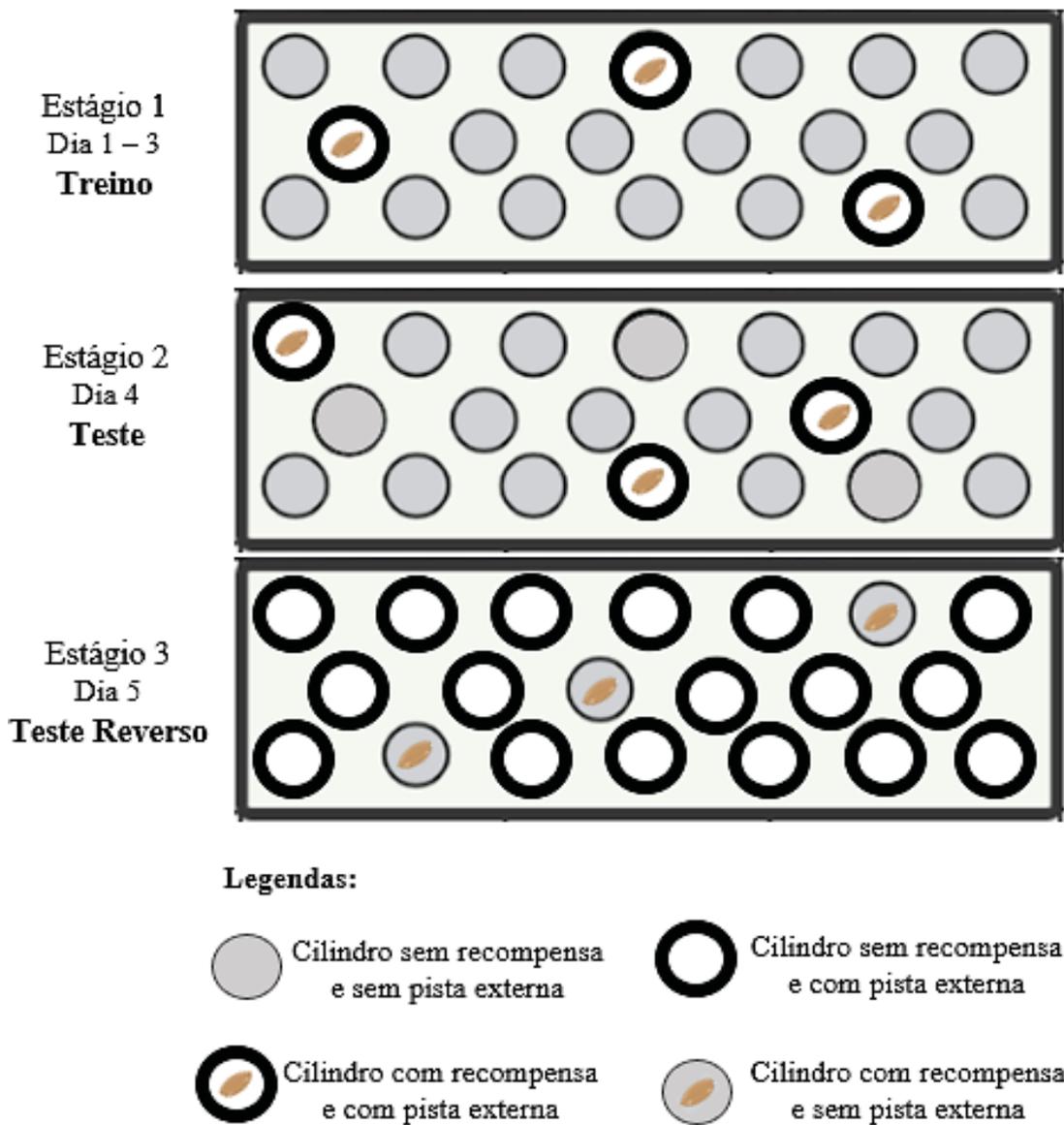
Para o teste cognitivo, um alimento altamente palatável foi oferecido aos animais como isca (0,05 g de amendoim). Dois dias antes do início do teste, os animais foram familiarizados diariamente com a isca. Neste curto período, o amendoim foi oferecido individualmente a cada animal, em caixa separada e com o auxílio de uma pinça cirúrgica.

Diariamente antes do início dos testes, todos os 20 cilindros da prancha foram aromatizados com essência de baunilha 1% e colocado uma isca não-removível por baixo da grade de metal. Três destes cilindros foram sinalizados externamente com um anel colorido (pista externa) e uma isca removível for adicionada acima da grade de metal destes cilindros (recompensa).

Nos três primeiros dias de teste (estágio 1), os cilindros com a recompensa foram sinalizados com a pista externa, enquanto que os cilindros que receberam apenas a isca não-removível não foram sinalizados. No quarto dia de teste, a localização dos cilindros com recompensa e pista externa foi modificada (estágio 2). Por fim, no quinto dia os animais foram inseridos no HBm de configuração reversa (estágio 3). Neste estágio, 17 cilindros receberam somente a pista externa e os outros 3 cilindros com recompensa não foram sinalizados. Durante o teste reverso a localização dos cilindros com recompensa também foi modificada (Figura 9).

Um cilindro foi contabilizado como visitado se animal fez o movimento de mergulho de cabeça (*head dip*) dentro do cilindro. Os parâmetros cognitivos avaliados em cada tentativas estão descritos a seguir (Tabela 1). Visitas a cilindros sem recompensa, foram contadas como escolhas erradas e consideradas equivalentes a um erro de memória declarativa de referência e memória de longo prazo, uma vez que a lembrança das informações previamente aprendidas (quais cilindros continham recompensa) era necessária para evitar escolhas erradas. Revisitas a cilindros que anteriormente continham recompensa, foram contabilizados como escolhas repetidas e considerados como um erro de memória de trabalho e de memória de curto prazo (OHL et al, 2002). Além do número de escolhas erradas e repetidas, foi quantificado o número de erros de omissão, ou seja, o número de cilindros sinalizados e que continham recompensa, que não foram visitados durante uma tentativa.

FIGURA 9: Mapa de montagem das recompensas nos três estágios do teste cognitivo



**Legenda:** Representação da configuração sequencial das recompensas no decorrer dos cinco dias de avaliação cognitiva. Fonte: do autor.

TABELA 1: Parâmetros cognitivos avaliados por tentativa

<b>Sistema de memória</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
<b>Memória de referência/ longo prazo</b>	Escolha de cilindro errado	Visita a cilindros sem recompensa
<b>Memória de trabalho/ curto prazo</b>	Escolha de cilindros repetidos	Revisita a cilindros anteriormente recompensados
<b>Erros por omissão</b>	Omissão de cilindros com recompensa	Não visitar cilindros com recompensa
<b>Performance em geral</b>	Tempo total das tentativas	Tempo total despendido até que todo os cilindros com recompensa sejam visitados

#### 4.10. AVALIAÇÃO EM GAIOLA METABÓLICA

Para a mensuração do consumo alimentar e hídrico, coleta de urina, fezes, os animais foram alocados em gaiolas metabólicas, onde permaneceram durante 24 horas. Após as primeiras 12 horas, o conteúdo de urina e fezes foi eliminado e a água e comida ajustados para volume e peso conhecidos. Ao final de 24 horas, os animais foram pesados individualmente e foi mensurado consumo alimentar (g) e hídrico (mL), volume urinário (mL) e fezes (g). Os resultados de consumo alimentar e hídrico foram expressos pelo cálculo de peso da ração (g) consumida em 12 horas x 100 / massa corporal (g) e volume de água (mL) consumido em 12 horas x 100 / massa corporal (g), respectivamente.

#### 4.11. ANÁLISE BIOQUÍMICA

##### 4.11.1. Perfil Bioquímico Plasmático

O plasma dos animais foi destinado para a dosagem de glicose, colesterol total e triacilgliceróis via kits comerciais de análise colorimétrica (Vida Biotecnologia®). Com os valores de colesterol total (CT), colesterol HDL (HDLc) e triacilgliceróis (TG) foram realizados os cálculos para se estimar colesterol LDL (LDLc) e VLDL (VLDLc) (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas (Infinite® 200 PRO SERIES TECAN) e os valores expressos em mg/dL.

#### 4.11.2. Proporções Aterogênicas

Com o intuito de verificar o risco de desenvolvimento de doenças ateroscleróticas, o índice de Castelli I (IC1) e o índice de Castelli II (IC2) foram determinados das seguintes equações:

$$\mathbf{IC1} = \frac{\mathbf{CT}}{\mathbf{HDLc}}$$

$$\mathbf{IC2} = \frac{\mathbf{LDLc}}{\mathbf{HDLc}}$$

#### 4.12. MENSURAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

O conteúdo de glicogênio foi mensurado segundo método descrito por Leighton e Cooper (1988). Em suma, amostras de fígado, músculo sóleo e gastrocnêmio de cada animal (100 mg) foram digeridas em 0,5 mL de KOH (1 M) por 20 minutos, a 70 °C. Após, 0,1 mL do tecido digerido foi adicionado a 0,5 mL de solução tampão de acetato de sódio (ácido acético 75 mM, 120 mM de acetato de sódio e 6,5 U/ml de amiloglicosidase, em pH 4,8) e incubado durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente, as

amostras foram centrifugadas (800 g por 5 min) e 0,2 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL de solução tampão de trietanolamina (TEA) (375 mM trietanolamina, MgSO<sub>4</sub> 3 mM, ATP 10 mM, 0,65 mM NADP, 4,5 U/mL de hexoquinase, 1,5 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase, a pH 7,5). O conteúdo de glicogênio foi determinado por absorvância a 340 nm.

#### 4.13. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA, INTERLEUCINA-6 (IL-6) E INTERLEUCINA-10 (IL-10)

A mensuração da concentração plasmática de insulina, IL-6 e IL-10 foi realizada seguindo as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Viena, Austria). Os ensaios de ELISA foram efetuados em leitor de microplacas a 450 nm e os resultados expressos como mUI/mL para insulina e pg/mL para IL-6 e IL-10.

#### 4.14. ÍNDICES DE *HOMEOSTASIS MODEL ASSESSMENT* (HOMA-IR) E *QUANTITATIVE INSULIN SENSITIVITY CHECK INDEX* (QUICK)

A partir dos valores de glicemia e insulinemia basal, foi realizado o cálculo de HOMA-IR (glicemia basal (mMol) x insulina basal (μU/mL) ÷ 22,5). O mesmo foi feito para o cálculo de QUICK (1 ÷ (Log insulina + Log glicemia)) (MATTHEWS et al., 1985; RIBEIRO CESARETTI; KOHLMANN, 2006; WALLACE; LEVY; MATTHEWS, 2004)

#### 4.15. PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E NEUROTOXICIDADE EM REGIÕES ENCEFÁLICAS

Para a mensuração da atividade das enzimas do sistema antioxidante, o hemisfério encefálico direito de cada animal foi dissecado nas frações subcortical e telencéfalo. As amostras foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 em banho de gelo e centrifugadas a 12.000 g a 4 °C durante 20 min. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

A concentração de GSH e de outros tióis não protéicos (NP-SH) foram determinadas pela interação dos tióis com o DTNB e formação de um cromóforo amarelado. Para a realização do ensaio foi necessária a precipitação das proteínas da amostra pela adição de TCA 30% (1:5 v/v) e posterior centrifugação a 7000 g a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação dos tióis com a adição de 250 µM de DTNB e a absorbância pela geração do cromóforo foi medida a 415 nm. Os valores foram expressos em nM de tióis.mg proteína-1 (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

A peroxidação lipídica (LPO) foi estimada pela formação de complexos entre Fe<sup>2+</sup> e xilenol laranja e formação de um cromóforo estabilizado por hidroxitolueno butilado. A absorbância pela geração do cromóforo foi medida a 535 nm e 560 nm, respectivamente. Os valores foram expressos em nM hidroperóxidos. mg de proteína-1 (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991).

A atividade enzimática da colinesterase total (ChE – EC 3.1.1.8) foi determinada pela geração do 2-nitrobenzoato-5-mercaptopicolina a partir da interação da tiocolina e do DTNB e o aumento da absorbância pela formação do cromóforo foi acompanhado a 405 nm (SR: 487 µM de DTNB; 2,25 mM de iodeto de acetiltiocolina). Os valores foram expressos em nM de acetiltiocolina hidrolizados.min-1 .mg proteína-1 (ELLMANN et al., 1961).

#### 4.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos por média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por meio da estatística descritiva no programa GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para a escolha dos testes estatísticos relativos a variáveis quantitativas, os dados foram avaliados quanto ao padrão de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk).

Os dados paramétricos foram submetidos ao teste de ANOVA de duas vias (two way ANOVA), utilizando as variáveis de condição diabética e suplementação com OP como fatores. Os valores referentes aos dados ao longo do tempo foram avaliados pelo teste de ANOVA para medidas repetidas. O pós-teste de Tukey foi realizado sequencialmente após a realização dos testes de ANOVA de duas vias e de medidas repetidas. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 5%.

Para análise dos dados referentes ao comportamento, foi realizado duas fases de análise. Primeiramente, foi feita a caracterização dos efeitos da diabetização entre os grupos controle, diabetizado e controle positivo para danos cognitivos. Após, foi verificado os efeitos da suplementação com OP, frente as variáveis comportamentais, entre os grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe. Os valores paramétricos referentes aos dados ao longo do tempo foram avaliados pelo teste de ANOVA para medidas repetidas, com pós-teste de Tukey, ou, quando não paramétricos, foram avaliados pelo teste de Friedman, com pós-teste de Dunn. Para a caracterização dos efeitos da diabetização e suplementação com OP utilizou-se o teste de ANOVA de uma via e ANOVA de duas vias, para dados paramétricos. Quando não paramétricos foi empregado o teste de Kruskal-Wallis. Também foi realizado a análise dos grupos em dias específicos, ao longo do período de

teste, respeitando as comparações acerca dos efeitos da diabetização e da suplementação com óleo de peixe.

Os resultados de comportamento e cognição também foram integrados, conforme proposto por Beliaeff (2002). Para isso, as médias foram logaritmizadas e normalizadas pela fórmula:  $(\text{LOG}_{10} (\text{média} / \text{média do grupo controle}) + 1)$ . Após, a média geral e desvio padrão foram calculados. Cada valor normalizado foi então adicionado ao valor mínimo obtido para cada variável (escore Z). A diferença dos escores entre o grupo controle e os demais grupos experimentais foi calculada e esses dados foram plotados em gráfico de radar, utilizando o grupo controle ou diabetizado como base.

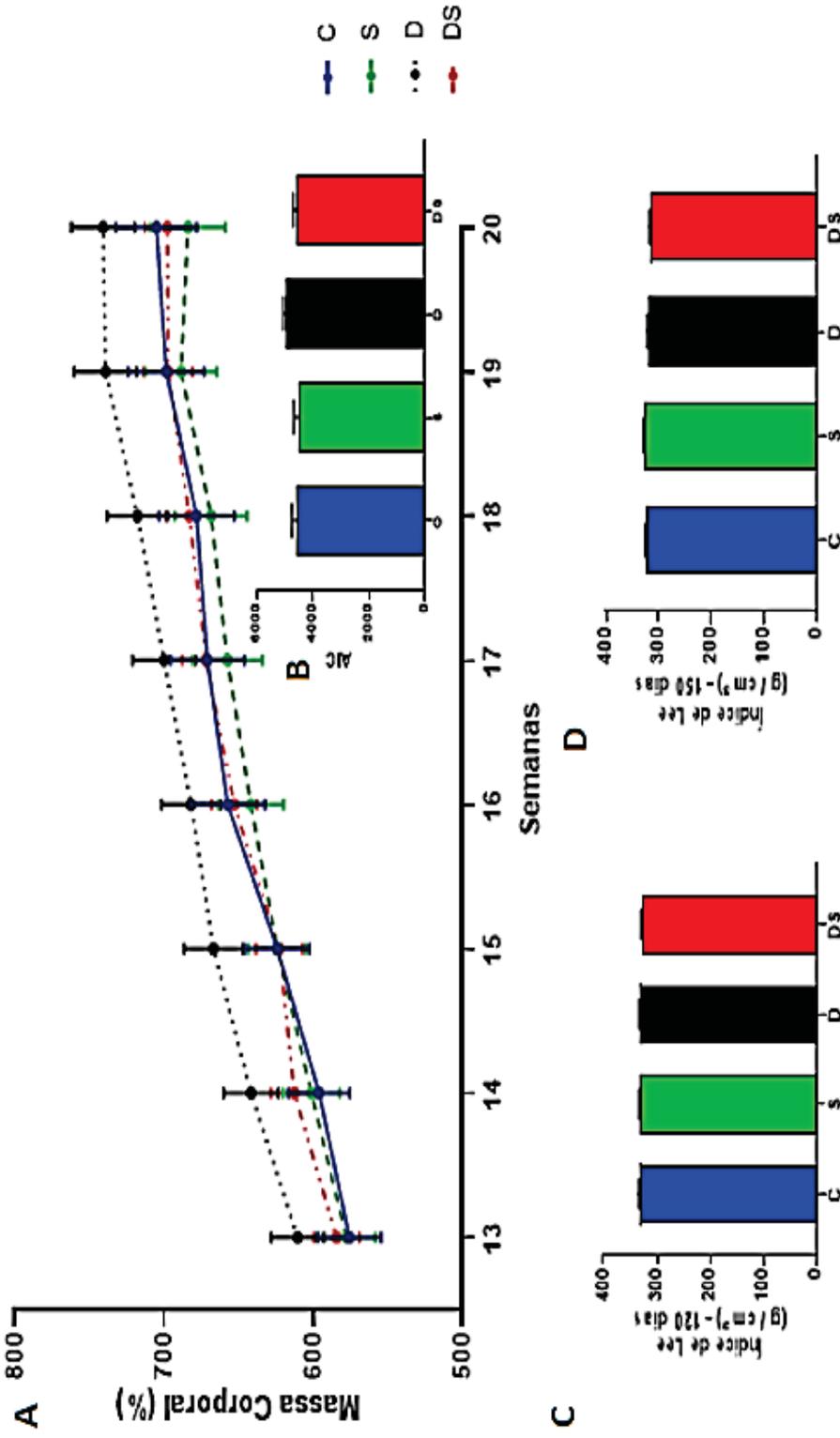
## 5. RESULTADOS

A apresentação dos resultados abaixo, segue a linha cronológica proposta no delineamento experimental do presente estudo (Figura 7).

### 5.1. AVALIAÇÃO DO ACRÉSCIMO DE MASSA CORPORAL ANIMAIS DA 13<sup>a</sup> A 20<sup>a</sup> SEMANA DE IDADE

Ao atingirem a idade de 90 dias, os animais foram separados em quatro grupos: controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (S), diabetizado (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS). O acréscimo da massa corpórea dos animais foi acompanhado semanalmente desde a 13<sup>a</sup> semana até a 20<sup>a</sup> semana de idade (Figura 10). Durante este intervalo, também foi mensurado o índice de LEE no 120<sup>o</sup> e 150<sup>o</sup> dia de idade. O ganho de massa corpórea não foi diferente entre os grupos ( $p = 0,220$ , Figura 17 A;  $p = 0,312$ , Figura 17 B), assim como o índice de Lee ( $p = 0,809$ , Figura 17 C;  $p = 0,1277$ , Figura 17 D).

FIGURA 10: Massa corpórea e índice de Lee dos grupos controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (S), diabetizados (D) e diabetizados suplementados com óleo de peixe (DS).



**Legenda:** Ganho de Massa Corporal (%) dos animais controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe da 13<sup>a</sup> a 20<sup>a</sup> semanas de idade (A) (ANOVA de medidas repetidas); Área sob a curva (AUC) do ganho de massa corporal dos animais ao longo do tempo (B) (ANOVA de duas vias); Índice de Lee dos animais controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe aos 120 dias de idade (C) (Anova de duas vias); Índice de Lee dos animais controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe aos 150 dias de idade (D) (Anova de duas vias). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (25 animais por grupo)

## 5.2.AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE COMPORTAMENTO E COGNIÇÃO AOS 120 DIAS DE IDADE.

Ao atingirem 120 dias de idade, os animais foram submetidos ao teste comportamental. Primeiramente foi investigado o efeito da diabetização (I) sobre os parâmetros comportamentais. Para tanto, os animais que compunham os grupos C e D foram, primeiramente, comparados com os animais pertencentes ao grupo controle positivo (L). Após, foi realizada a avaliação do efeito da suplementação com óleo de peixe (II) entre os grupos suplementados e não suplementados sob os mesmos parâmetros.

### 5.2.1. Teste de reconhecimento de objetos Novo e Familiar

#### I) Efeitos da Diabetização

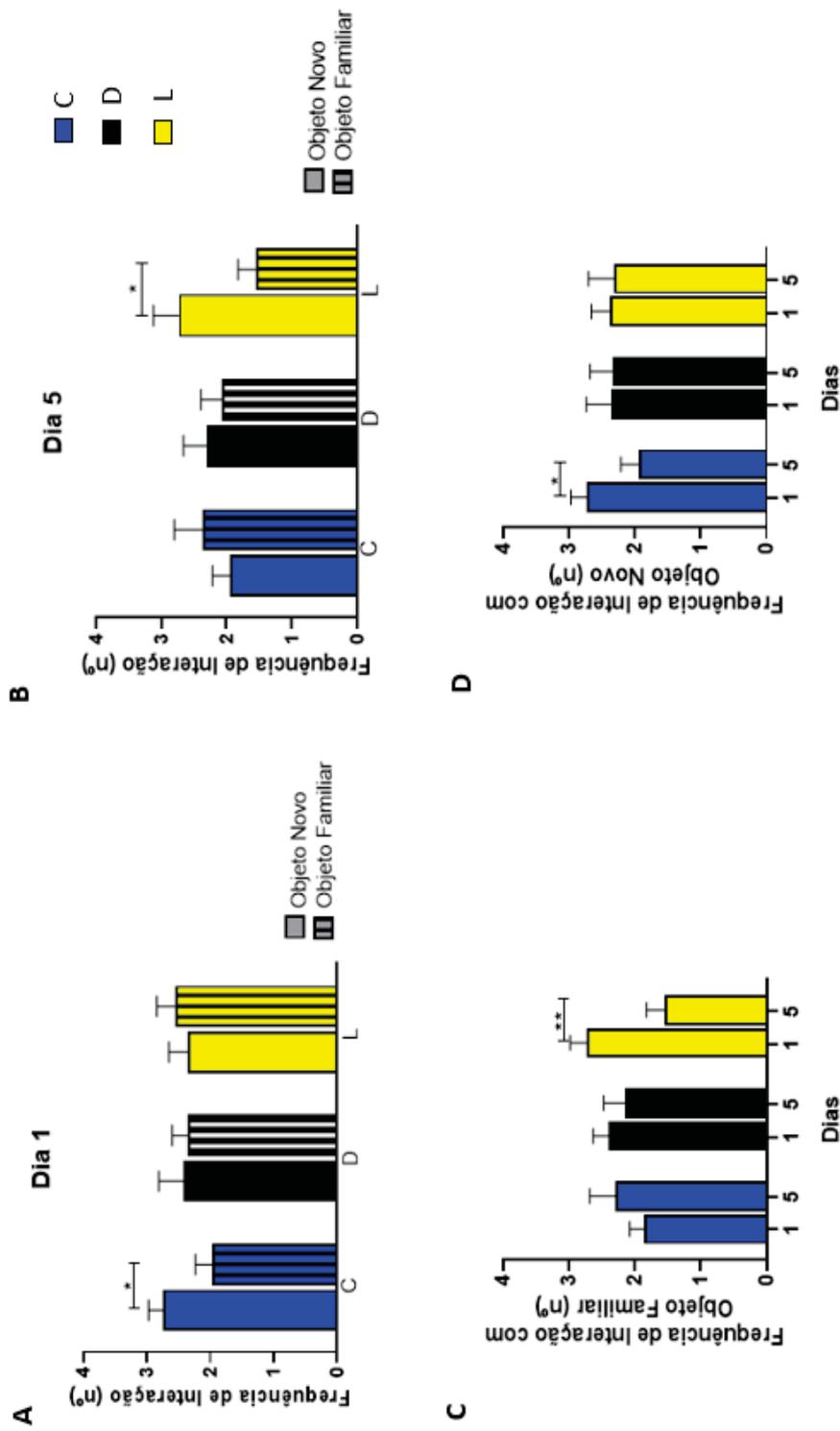
No teste (dia1), os animais do grupo C apresentaram maior frequência de interação com o objeto novo ( $p < 0,05$ ; objeto familiar vs. objeto novo; Figura 11A). Os grupos D e L exploraram ambos os objetos igualmente. No reteste (dia 5), o grupo L explorou mais vezes o objeto novo em comparação ao objeto familiar ( $p < 0,05$ ; Figura 11 B), sendo que não houve diferença nos demais grupos. Assim, nota-se que o grupo C interagiu mais vezes com o objeto novo no primeiro dia ( $p < 0,05$ ; dia 1 vs. dia 5, Figura 11 D), bem como e o grupo L teve maior frequência de interação com o objeto familiar ( $p < 0,005$ ; dia 1 vs. dia 5, Figura 11 C).

#### II) Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe Rico em AGPI n-3

No teste, os animais do grupo C apresentaram maior frequência de exploração com o objeto novo, assim como o grupo S ( $p < 0,05$ , Figura 12 A). Os demais grupos

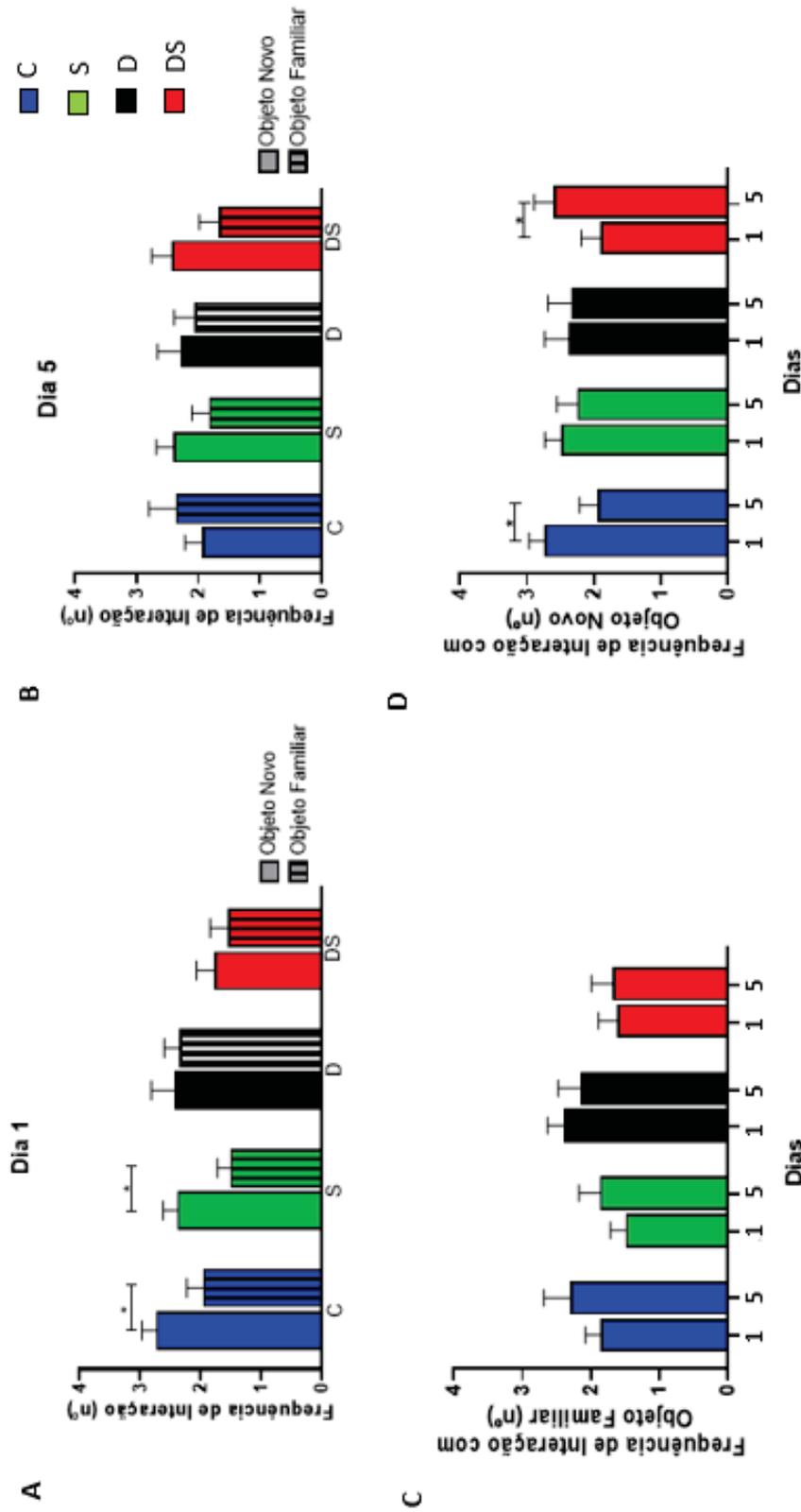
exploraram ambos os objetos igualmente. No reteste, não foi observada diferença entre os grupos (Figura 12 B). Observou-se, portanto, que todos os grupos exploraram igualmente o objeto familiar nos dias 1 e 5 (Figura 12 D). Por outro lado, o grupo C teve maior interação com o objeto novo no dia 1 ( $p < 0,05$ , Figura 12 C) e o grupo DS apresentou maior frequência de exploração com o objeto novo no dia 5.

FIGURA 11: Teste de reconhecimento de objeto novo e familiar dos grupos (C), diabetizados (D) e controle positivo (L).



**Legendas:** Frequência de interação entre objetos novo e familiar no dia 1 dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (A) (teste t não-pareado, \*  $p < 0,05$ ); Frequência de interação entre objetos novo e familiar no dia 5 dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (B) (teste t não-pareado, \*  $p < 0,05$ ); Frequência de interação com objeto familiar entre dia 1 e 5 dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (C) (teste t pareado, \*\*  $p < 0,005$ ); Frequência de interação com objeto novo entre dia 1 e 5 dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (D) (teste t pareado, \*  $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo)

FIGURA 12: Teste de reconhecimento de objeto novo e familiar dos grupos (C), suplementado com óleo de peixe (S), diabetizados (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS).



**Legendas:** Frequência de interação entre objetos novo e familiar no dia 1 dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (A) (teste t não-pareado, \*  $p < 0,05$ ); Frequência de interação entre objetos novo e familiar no dia 5 dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (B) (teste t não-pareado); Frequência de interação com objeto familiar entre dia 1 e 5 dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (C) (teste t pareado); Frequência de interação com objeto novo entre dia 1 e 5 dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (D) (teste t pareado, \*  $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo)

## 5.2.2. Atividade Exploratória – Locomoção

### I) Efeitos da Diabetização

Os animais apresentaram diferença quanto ao número de linhas cruzadas ao longo dos cinco dias de avaliação. A figura 13 A, demonstra a evolução da atividade locomotora dos grupos C, D e L. O grupo C demonstrou menor atividade locomotora no dia 2 em relação ao dia 1 (22 % menor,  $p < 0,05$ ) e 4 em comparação ao dia 1 (31 % menor,  $p < 0,05$ ). O grupo D, apresentou redução do número de linhas cruzadas no dia 4 em relação ao dia 1 (30 %,  $p < 0,05$ ). O grupo L, por sua vez, demonstrou redução de linhas cruzadas no dia 2 (24 %,  $p < 0,005$ ) e no dia 3 (24 %  $p < 0,05$ ). Contudo, não houve diferença entre os grupos, quanto a atividade locomotora, ao longo do teste (figura 13 B), e nem em dias específicos (Tabela 2).

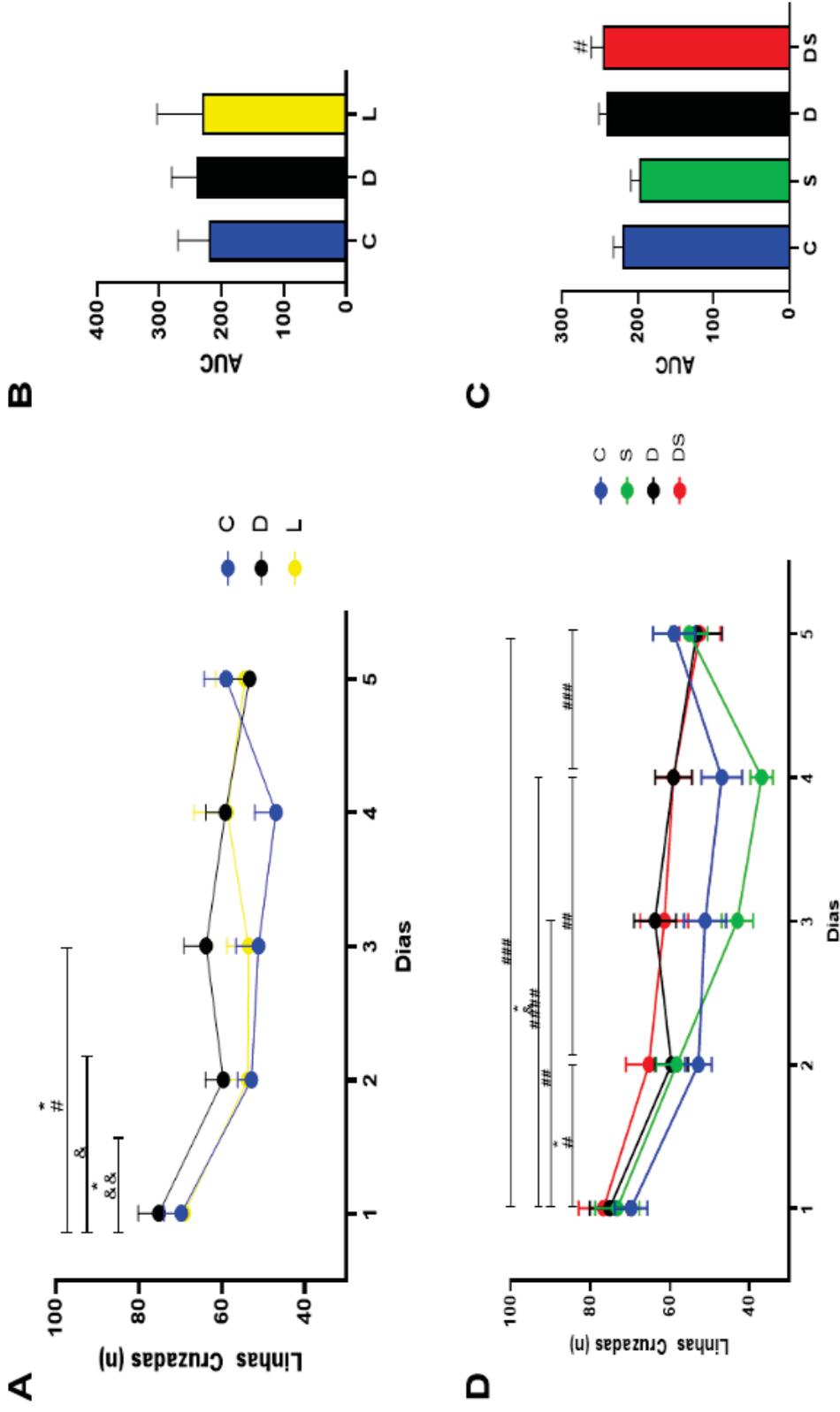
### II) Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe Rico em AGPI n-3

Os animais apresentaram diferença quanto ao número de linhas cruzadas ao longo dos cinco dias de avaliação. A figura 13 C, demonstra a evolução da atividade locomotora dos grupos C, S, D e DS. O grupo S apresentou redução do número de linhas cruzadas no dia 2 (21 %,  $p < 0,005$ ), 3 (41 %,  $p < 0,005$ ), 4 (51 %,  $p < 0,0001$ ) e 5 (48 %,  $p < 0,005$ ). A locomoção foi 30% menor no dia 4 em relação ao dia 2 ( $p < 0,005$ ), e 26 % maior no dia 5 vs. dia 4 ( $p < 0,005$ ). Não houve diferença quanto ao número de linhas cruzadas para o grupo DS, ao longo dos dias. A AUC do grupo DS foi 25 % maior em relação ao grupo S ( $p < 0,05$ ) (Figura 13 D). Para os demais grupos a AUC não apresentou diferença.

Quanto a diferença de locomoção em diária, os grupos não apresentaram diferença entre si nos dias 1, 2 e 5 (Tabela 3– Linhas cruzadas). Contudo, nos dias 3 e 4, o grupo

DS apresentou número de linhas cruzadas 42 e 68 % maior, em relação ao grupo S ( $p < 0,05$ ).

FIGURA 13: Atividade locomotora dos grupos experimentais ao longo de 5 dias de avaliação



**Legendas:** Número de linhas cruzadas ao longo do período de teste dos grupos controle, diabético e controle positivo (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$  para o grupo controle; #  $p < 0,05$  para o grupo diabético; &  $p < 0,05$ , &&  $p < 0,005$  para grupo controle positivo) (A); AUC dos grupos controle, diabético e controle positivo (ANOVA de uma via) (B); Número de linhas cruzadas ao longo do período de teste dos grupos controle, diabético e controle positivo (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$  para o grupo controle; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , ###  $p < 0,0005$ , ####  $p < 0,0001$  para grupo diabético; &  $p < 0,05$  para grupo diabético suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$  para o grupo controle; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , ###  $p < 0,0005$ , ####  $p < 0,0001$  para grupo suplementado; &  $p < 0,05$  para grupo diabético (C); AUC dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (ANOVA de duas vias; #  $p < 0,05$  vs. S) (D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo).

### 5.2.3. Atividade Exploratória – Exploração direta (número de cilindros visitados)

#### I) Efeitos da Diabetização

Os animais apresentaram variações na atividade exploratória direta ( $p < 0,0001$ ). A figura 14 A apresenta a evolução da atividade exploratória de cada grupo ao longo de 5 dias de teste. Naturalmente, maior atividade exploratória foi observada no dia 5 (teste reverso). Assim sendo, o grupo C teve maior número de cilindros explorado no dia 5 em relação ao dia 1 (129 % maior;  $p < 0,0001$ ), 2 (66 % maior;  $p < 0,005$ ), 3 (88 % maior;  $p < 0,0005$ ) e 4 (55 % maior;  $p < 0,05$ ). Similarmente, o grupo L visitou mais cilindros no dia 5 comparativamente aos dias 1 (média 167 % maior;  $p < 0,0001$ ), 2 (média 84 % maior,  $p < 0,0001$ ), 3 (média 78 % maior;  $p < 0,0001$ ) e 4 (92 % maior;  $p < 0,0001$ ). Por outro lado, o grupo D apresentou médias crescentes, em relação ao número de cilindros visitados, na fase de aprendizagem. Os animais do grupo D exploraram 73 % ( $p < 0,005$ ) e 96 % ( $p < 0,005$ ) a mais nos dias 2 e 3, respectivamente, em comparação ao dia 1. Já em relação ao dia 5, o grupo D teve aumento de 166 % ( $p < 0,0001$ ) em comparação ao dia 1, 53 % ( $p < 0,05$ ) ao dia 2 e 70 % ( $p < 0,0005$ ) ao dia 4. Assim, a AUC dos grupos D e L foram cerca de 32 % maiores ( $p < 0,005$ ) que a do grupo C (Figura 14 B)

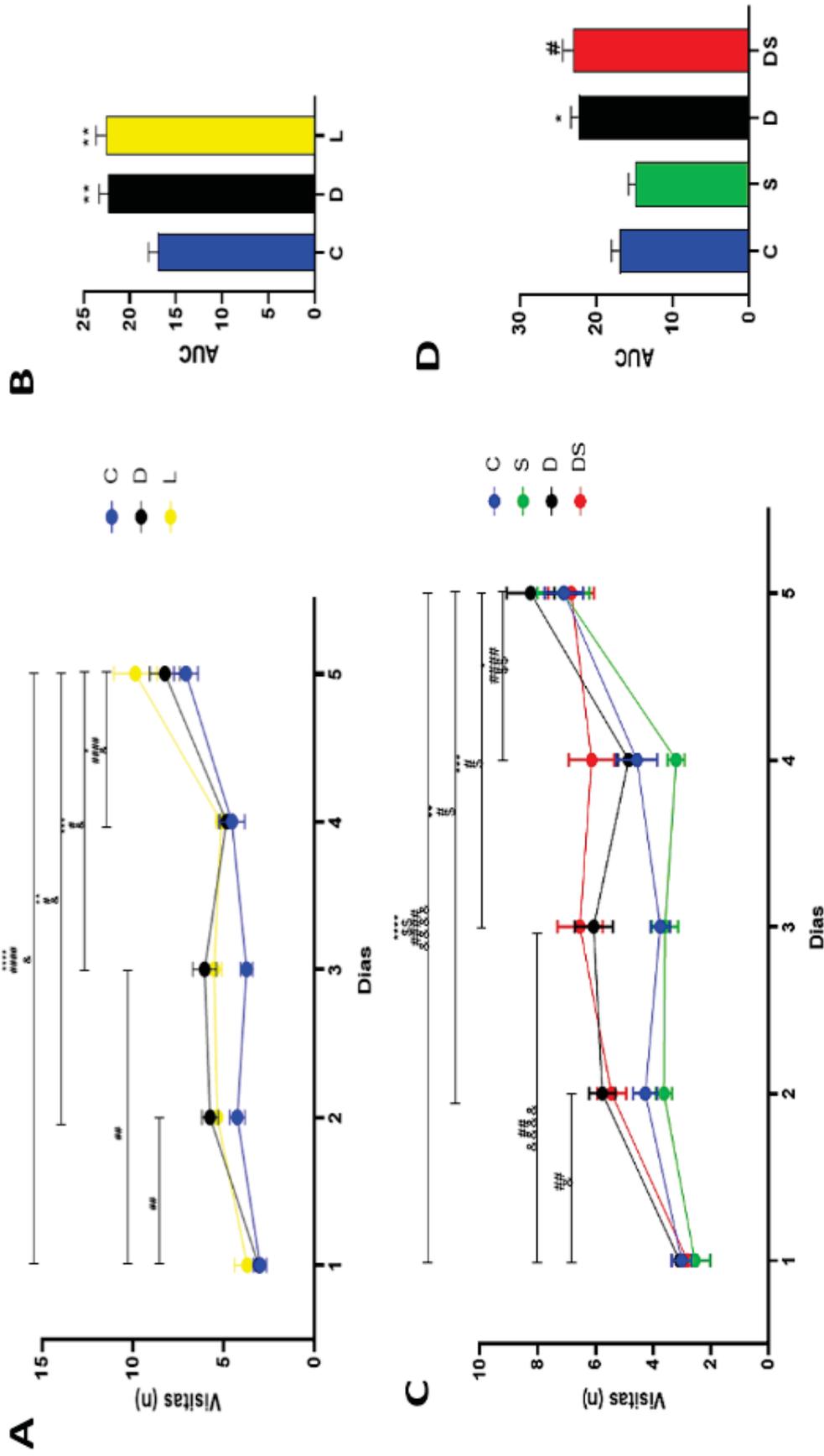
Em relação às comparações diárias entre os grupos (Tabela 2 – cilindros visitados), os grupos D e L apresentaram, respectivamente, médias 44 ( $p < 0,005$ ) e 34 % ( $p < 0,05$ ) superiores, em comparação ao grupo C nos dias 2; 85 ( $p < 0,0005$ ) e 62 % ( $p < 0,05$ ) no dia 3; e 35 ( $p < 0,05$ ) e 42 % ( $p < 0,005$ ) no dia 4. No dia 5, não houve diferença entre os grupos.

## II) Efeitos da Suplementação com Óleo de Peixe Rico em AGPI n-3

Os animais do grupo S apresentaram comportamento similar ao do grupo C, apresentando maior atividade exploratória direta no dia 5 (Figura 14 C). Logo, o grupo S teve maior número de cilindros explorado no dia 5 em relação ao dia 1 (178 % maior;  $p < 0,0001$ ), 2 (95 % maior;  $p < 0,0005$ ), 3 (98 % maior;  $p < 0,0005$ ) e 4 (122 % maior;  $p < 0,0001$ ). O grupo DS também teve comportamento similar ao grupo D. Os animais do grupo DS exploraram 92 % ( $p < 0,05$ ), 131 % ( $p < 0,0001$ ), 117% ( $p < 0,005$ ) e 142% ( $p < 0,005$ ) a mais nos dias 2, 3, 4 e 5, respectivamente, em comparação ao dia 1. Assim, a AUC dos grupos D e DS foram cerca de 32 % ( $p < 0,05$ ) e 54 % ( $p < 0,0001$ ) maiores em relação as dos grupos C e S, respectivamente (Figura 14 D).

Em relação às comparações diárias entre os grupos (Tabela 3 – cilindros visitados), os grupos D e DS apresentaram o dobro de cilindros visitados no dia 3 ( $p < 0,05$ , D vs. C; e  $p < 0,005$ , DS vs. S). No dia 4, o grupo DS apresentou médias 90 % maiores que o grupo S ( $p < 0,005$ ). Não houve diferença entre os grupos no dia 5.

FIGURA 14: Atividade exploratória dos grupos ao longo de 5 dias de avaliação



**Legendas:** Número de cilindros visitados ao longo do período de teste dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  para o grupo controle; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , ###  $p < 0,0005$ , ####  $p < 0,0001$  para o grupo diabetizado; &  $p < 0,0001$  para grupo controle positivo (A); AUC dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (ANOVA de uma via, \*\*  $p < 0,005$  vs. C) (B); Número de cilindros visitados ao longo do período de teste dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  para o grupo controle; §  $p < 0,0005$ , §§  $p < 0,0001$  para grupo suplementado com óleo de peixe; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$ , ###  $p < 0,0005$ , ####  $p < 0,0001$  para o grupo diabetizado; &  $p < 0,05$ , &&&  $p < 0,0001$  para grupo diabetizado suplementado com óleo de peixe) (C); AUC dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (ANOVA de duas via, \*  $p < 0,05$  vs. C; #  $p < 0,05$  vs. S) (D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo).

#### 5.2.4. Atividade Exploratória – Exploração indireta (frequência de *rearing* e *edge-sniff*)

##### I) Efeito da Diabetização – Frequência de *Rearing*

Todos os grupos tiveram maior número de *rearing* no primeiro dia de teste, de modo essas médias diminuíram ao longo dos dias de avaliação (Figura 15 A). O grupo C apresentou redução de 34 % no dia 2 ( $p < 0,05$ ), 36 % no dia 3 ( $p < 0,05$ ), 46 % no dia 4 ( $p < 0,0005$ ) e 43 % no dia 5 ( $p < 0,005$ ), em comparação ao dia 1. O grupo D também apresentou redução no número de *rearing* em 39 % no dia 2 ( $p < 0,005$ ), 36 % no dia 3 ( $p < 0,005$ ), 53 % no dia 4 ( $p < 0,0001$ ) e 58 % no dia 5 ( $p < 0,0001$ ), em comparação ao dia 1. Por sua vez, o grupo L teve redução de 55 % no dia 2 ( $p < 0,0001$ ), 75 % no dia 3 ( $p < 0,0001$ ), 76% no dia 4 ( $p < 0,0001$ ) e 56 % no dia 5 ( $p < 0,0005$ ), comparativamente ao dia 1. Desse modo, a AUC do grupo L foi 35 % menor em relação ao grupo D ( $p < 0,05$ , Figura 15 B).

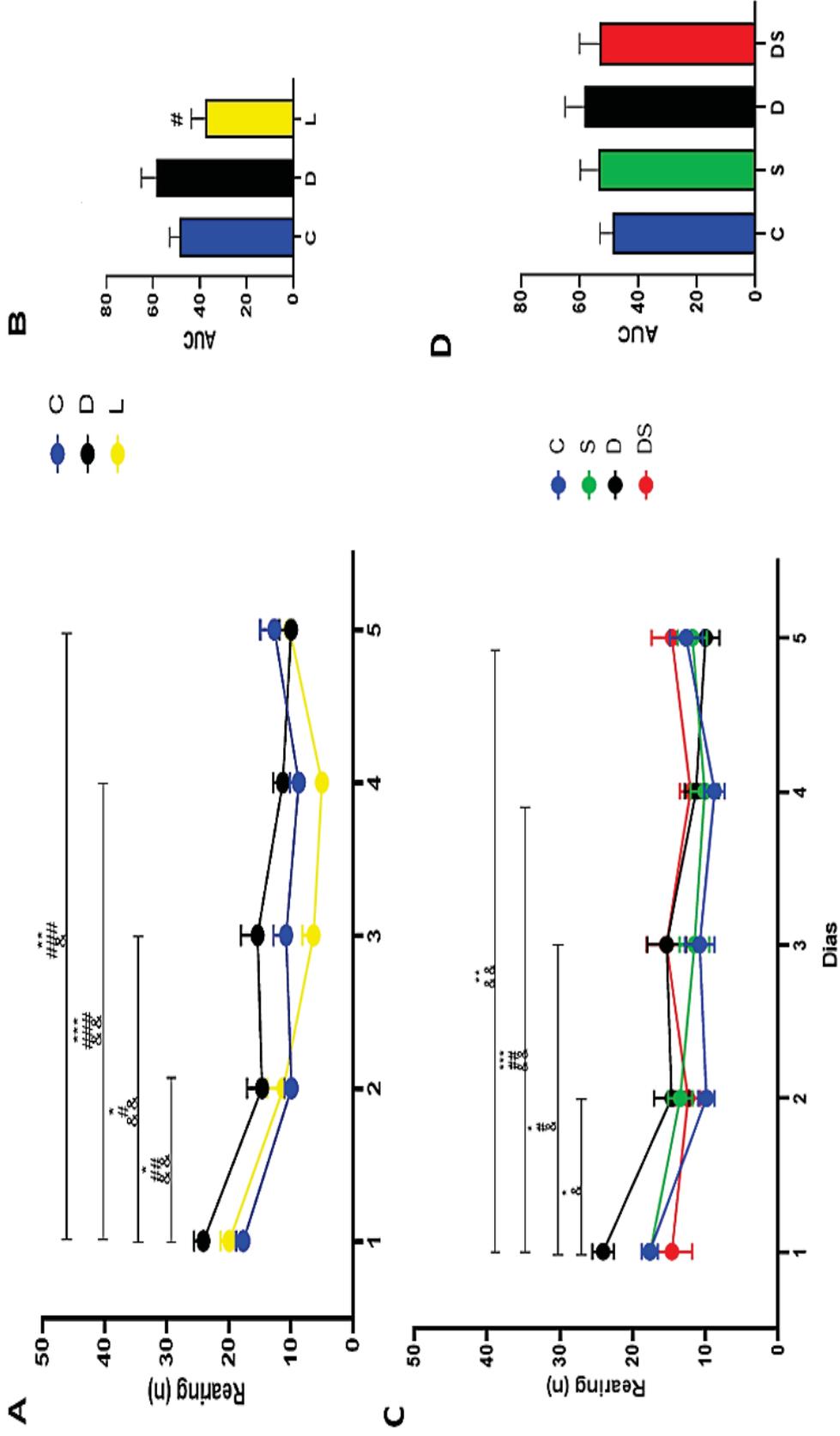
Em relação a comparações diárias entre os grupos (Tabela 2 – *Rearing*), o grupo D apresentou médias mais 38 e 96 % mais elevadas nos dias 1 e 3 ( $p < 0,005$ ; D vs. C), respectivamente. Por outro lado, o grupo L apresentou valores 39 e 42 % menores nos dias 3 e 4 ( $p < 0,0005$  e  $p < 0,005$ ) em comparação ao grupo C, respectivamente.

##### II) Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe Rico em AGPI n-3 – Frequência de *Rearing*

O grupo S apresentou redução de 37 % no dia 3 ( $p < 0,05$ ) e 49 % no dia 4 ( $p < 0,0001$ ), em relação as médias do dia 1 (Figura 22 C). Não houve diferença nas médias do dia 5. Não houve diferença nas médias do grupo DS ao longo do teste. Similarmente, não houve diferença na AUC dos grupos (Figura 22 D).

Em relação às comparações diárias entre os grupos (Tabela 3 – *Rearing*), o grupo DS apresentou redução do número de *rearing* em comparação ao grupo D (redução de 24 %,  $p < 0,05$ ). Não houve diferença nos demais grupos ao longo do teste.

FIGURA 15: Frequência de *rearings* dos grupos ao longo de 5 dias de avaliação



**Legendas:** Número *rearing* ao longo do período de teste dos grupos controle, diabético e controle positivo (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$  para o grupo controle; ##  $p < 0,005$ , ###  $p < 0,0005$ , ####  $p < 0,0001$  para o grupo diabético; &  $p < 0,0005$ , &&  $p < 0,0001$  para grupo controle positivo) (A); AUC dos grupos controle, diabético e controle positivo (ANOVA de uma via, #  $p < 0,05$  vs. D). (B); Número de *rearing* ao longo do período de teste dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$  para o grupo controle; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,0005$  para grupo suplementado com óleo de peixe; &  $p < 0,005$ , &&  $p < 0,0001$  para o grupo diabético (C); AUC dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (ANOVA de duas via) (D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo).

## I) Efeito da Diabetização – Frequência de *Edge – Sniff*

O grupo C apresentou maior frequência de *edge-sniff* no quinto dia de teste (Figura 16 A). Assim, a exploração indireta no dia 5 foi cerca de 38 % maior em comparação aos dias 1 e 2 ( $p < 0,05$ ), e 59 % maior em comparação aos dias 3 e 4 ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,0005$ , respectivamente). Diferentemente, o grupo L apresentou maior frequência de *edge-sniff* no dia 1, tendo redução da atividade exploratória indireta de 39 % no dia 2 ( $p < 0,005$ ), 43 % no dia 3 ( $p < 0,005$ ), 41 % no dia 4 ( $p < 0,005$ ) e 34 % no dia 5 ( $p < 0,05$ ). A AUC do grupo L foi 24 e 31 % menor que a AUC dos grupos C ( $p < 0,005$ ) e D ( $p < 0,0005$ ), respectivamente (Figura 16 B).

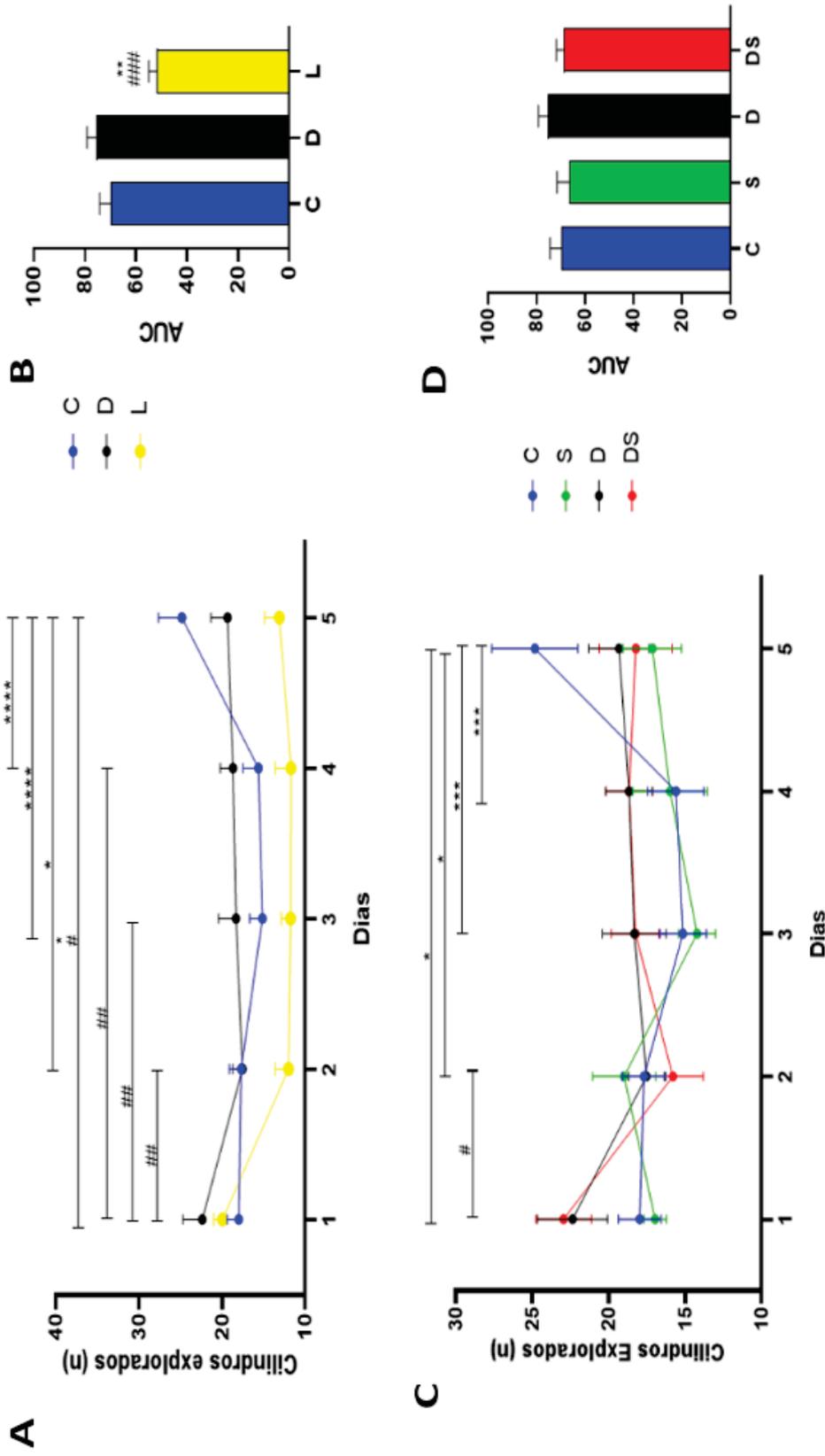
Em relação às comparações diárias entre os grupos (Tabela 2 – *Edge Sniff*), o grupo L teve menor frequência de exploração por *edge-sniff* em comparação aos outros grupos. Esses valores foram aproximadamente 30 % menores no dia 2 ( $p < 0,005$ , L vs. C;  $p < 0,05$ , L vs. D), 35 % nos dias 3 e 4 ( $p < 0,05$ , L vs. D), e 46 % no dia 5 ( $p < 0,005$ , L vs. C).

## II) Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe – Frequência de *Edge – Sniff*

Quanto aos grupos suplementados, houve redução de 31 % no dia 2 ( $p < 0,01$ ) no grupo DS, em comparação ao dia 1 (Figura 16 C). Não houve diferença nos demais intervalos de avaliação, bem como na avaliação do grupo S ao longo do período de teste. Similarmente, não foi observada diferença entre a AUC dos grupos (Figura 16 D).

Nas comparações diárias (Tabela 3 – *Edge Sniff*), somente o grupo DS apresentou diferença entre as médias no dia 1, sendo está 35 % superior em relação ao grupo S ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença nos demais intervalos de avaliação.

FIGURA 16: Frequência de *edge-sniff* fidos grupos experimentais ao longo de 5 dias de avaliação



**Legendas:** Número *edge-sniff* ao longo do período de teste dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0005$  para o grupo controle; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$  para grupo controle positivo) (A); AUC dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (ANOVA de uma via, \*\*  $p < 0,005$  vs. C; ###  $p < 0,0005$  vs. D) (B); Número de *edge-sniff* ao longo do período de teste dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,0005$  para o grupo controle; #  $p < 0,05$  para o grupo diabetizado (C); AUC dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (ANOVA de duas vias) (D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo).

### 5.2.5. Atividade Exploratória - Evasão (tempo de exposição ao centro da prancha)

#### I) Efeitos da Diabetização

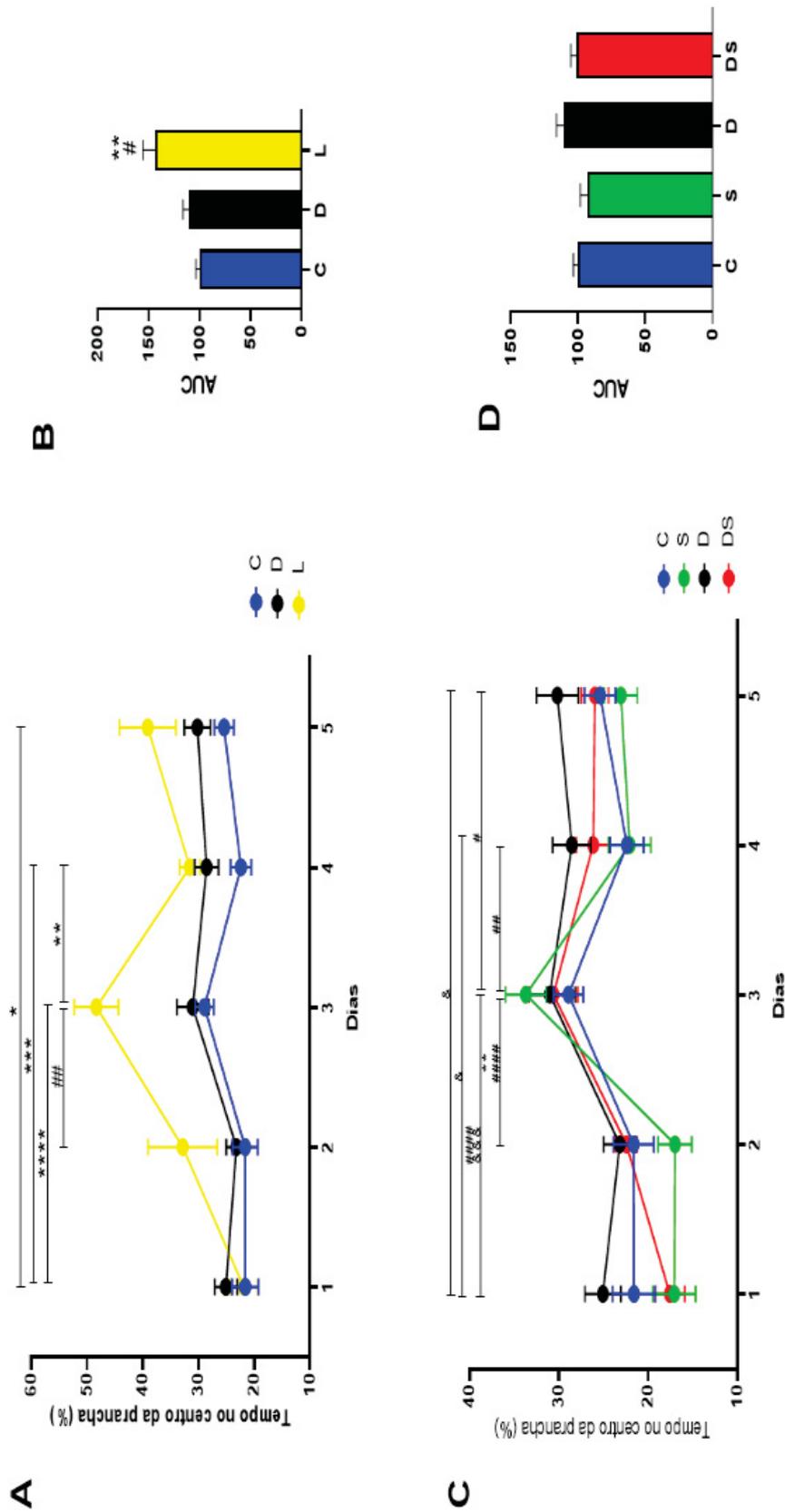
O grupo C permaneceu mais tempo no centro da arena no dia 3 em comparação ao dia 2 (aumento de 22 %,  $p < 0,005$ ) (Figura 17 A). Já o grupo L demonstrou variações ao longo do teste, sendo que o mesmo apresentou aumento de 128 % ( $p < 0,0001$ ), 57 % ( $p < 0,005$ ) e 85 % ( $p < 0,005$ ), nos dias 3, 4 e 5 em comparação ao dia 1, respectivamente. Não houve diferença no tempo de permanência do grupo D. A AUC do L foi 43 e 30 % maior que as dos grupos C ( $p < 0,005$ ) e D ( $p < 0,05$ ), respectivamente (Figura 17 B).

Quanto aos resultados referentes a dias específicos (Tabela 2 – Tempo no centro da prancha), o grupo L permaneceu por mais tempo no centro da prancha a partir do dia 3 em comparação aos grupos C (71 % menor,  $p < 0,0001$ ) e D (54 % menor,  $p < 0,005$ ). No dia 4, o resultado de L foi maior que o de C ( $p < 0,005$ ) e de D ( $p < 0,05$ ), e no dia 5, 50% maior que o C ( $p < 0,05$ ).

#### II) Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe Rico em AGPI n-3

O grupo S obteve o maior resultado no dia 3, sendo este 94 % maior em comparação ao dia 1 ( $p < 0,0001$ ), 88% maior em relação ao dia 2 ( $p < 0,0001$ ), e 33% maior em comparação ao dia 4 ( $p < 0,005$ ) e 5 ( $p < 0,05$ ) (Figura 17 C). Similarmente, o grupo DS apresentou média 76 % e 52% superiores nos dias 3 ( $p < 0,005$ ) e 4 ( $p < 0,05$ ), em comparação ao dia 1. Entretanto, a AUC não foi diferente entre os grupos (Figura 17 D). No que se refere a avaliações em dias específicos (Tabela 3 – Tempo no centro da prancha), não houve diferença entre os grupos.

FIGURA 17: Tempo de permanência no centro da prancha dos grupos experimentais longo de 5 dias de avaliação



**Legendas:** Tempo de permanência no centro da prancha ao longo do período de teste dos grupos controle, diabético e controle positivo (ANOVA de medidas repetidas;  $## p < 0,005$  para grupo C;  $* p < 0,05$ ,  $** p < 0,005$ ,  $*** p < 0,0005$  para o grupo controle positivo) (A); AUC dos grupos controle, diabético e controle positivo (ANOVA de uma via,  $** p < 0,005$  vs. C;  $# p < 0,0005$  vs. D) (B); ; Tempo de permanência no centro da prancha ao longo do período de teste dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (ANOVA de medidas repetidas;  $** p < 0,005$  para grupo C;  $## p < 0,0005$  para o grupo suplementado com óleo de peixe;  $§ p < 0,05$ ,  $§§ p < 0,0005$  para grupo diabético suplementado com óleo de peixe) (C); AUC dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (ANOVA de duas vias) (D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo).

5.2.6. Cognição – Memória de longo prazo (escolhas de cilindros errados – sem recompensa)

#### I) Efeitos da Diabetização

Todos os grupos apresentaram variações ao longo dos dias de teste, sendo o dia 5 o intervalo com maior número de erros (Figura 18 A). A evolução do grupo C ao longo do período de teste ( $p < 0,0001$ ), exibiram que os erros foram maiores no dia 5, comparativamente aos dias 1 (135 % maior,  $p < 0,05$ ), 3 (176 % maior,  $p < 0,05$ ) e 4 (358 % maior,  $p < 0,005$ ). O dia 4 foi o dia com menor número de escolhas erradas, com redução de 57 %, em relação à média do dia 2 ( $p < 0,05$ ). O grupo D também apresentou evolução similar ( $p < 0,0005$ ). O número de erros no dia 5 foram 192, 57 e 156 % maior em relação aos dias 1 ( $p < 0,005$ ), 3 ( $p < 0,05$ ) e 4 ( $p < 0,0005$ ), respectivamente. A evolução do grupo L ( $p < 0,0005$ ), também demonstrou maior número de erros no dia 5, sendo os valores obtidos neste dia 130, 173 e 160 % mais elevado, em comparação aos dias 1 ( $p < 0,05$ ), 2 ( $p < 0,005$ ) e 3 ( $p < 0,05$ ), respectivamente.

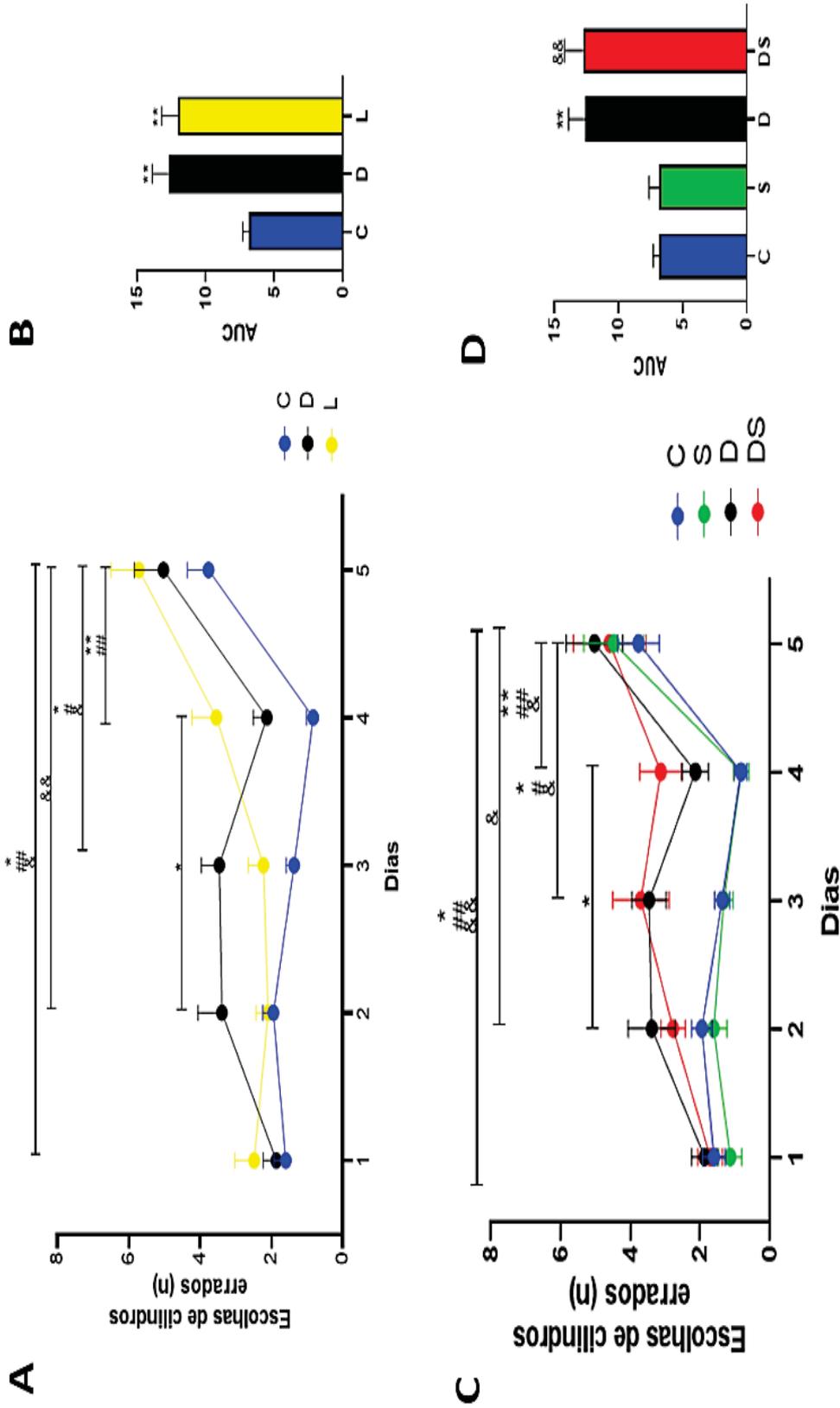
A AUC dos grupos D e L foram 84 e 75 % maiores em comparação a do grupo C ( $p < 0,0005$ , D vs. C;  $p < 0,005$ , L vs. C; Figura 18 B). Quanto aos resultados referentes a dias específicos (Tabela 2 – Cilindros Errados), o grupo D teve médias 166 e 142 % mais elevadas nos dias 3 ( $p < 0,005$ ) e 4 ( $p < 0,05$ ), respectivamente, em comparação ao grupo C. O grupo L apresentou quatro vezes mais erros no dia 4 ( $p < 0,0005$ ), comparativamente ao grupo C.

## II) Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe Rico em AGPI n-3

Quanto aos efeitos da suplementação com OP, o grupo S demonstrou resultados similares ao grupo C ao longo da avaliação comportamental ( $p < 0,0005$ ), com maior número de erros no dia 5 em comparação aos dias 1 (292 %;  $p < 0,005$ ), 2 (177 %;  $p < 0,05$ ), 3 (238 %;  $p < 0,05$ ) e 4 (413 %;  $p < 0,05$ ) (Figura 25 C). Já no grupo DS, não houve variação ao longo do tempo ( $p = 0,066$ ). A AUC dos grupos D e DS foram cerca de 85 % superiores a AUC de C e S ( $p < 0,005$ ; Figura 18 D).

Quanto aos resultados referentes a dias específicos (Tabela 3 – Cilindros Errados), os grupos D e DS apresentaram médias 160 % maiores em comparação aos grupos C e S ( $p < 0,05$ ) no dia 3, e também do dia 4 (cerca de 140 %  $p < 0,05$ , D vs. C; 180 %,  $p < 0,005$ , DS vs. S, respectivamente).

FIGURA 18: Número de cilindros errados escolhidos pelos grupos experimental ao longo de 5 dias de avaliação



**Legendas:** Número de cilindros errados escolhidos ao longo do período de teste dos grupos controle, diabético e controle positivo (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  para grupo controle; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$  para grupo diabético; &  $p < 0,05$ , &&  $p < 0,005$  para grupo controle positivo) (A); AUC dos grupos controle, diabético e controle positivo (ANOVA de uma via, \*\*  $p < 0,005$  vs. C) (B); Número de cilindros errados escolhidos ao longo do período de teste dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  para grupo controle; &  $p < 0,05$ , &&  $p < 0,005$  para grupo diabético; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,005$  para grupo diabético) (C); AUC dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (ANOVA de duas vias; \*\*  $p < 0,005$  vs. C; &&  $p < 0,005$  vs. S) (D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo).

### 5.2.7. Cognição – Memória de curto prazo (escolhas de cilindros com recompensa já visitados anteriormente)

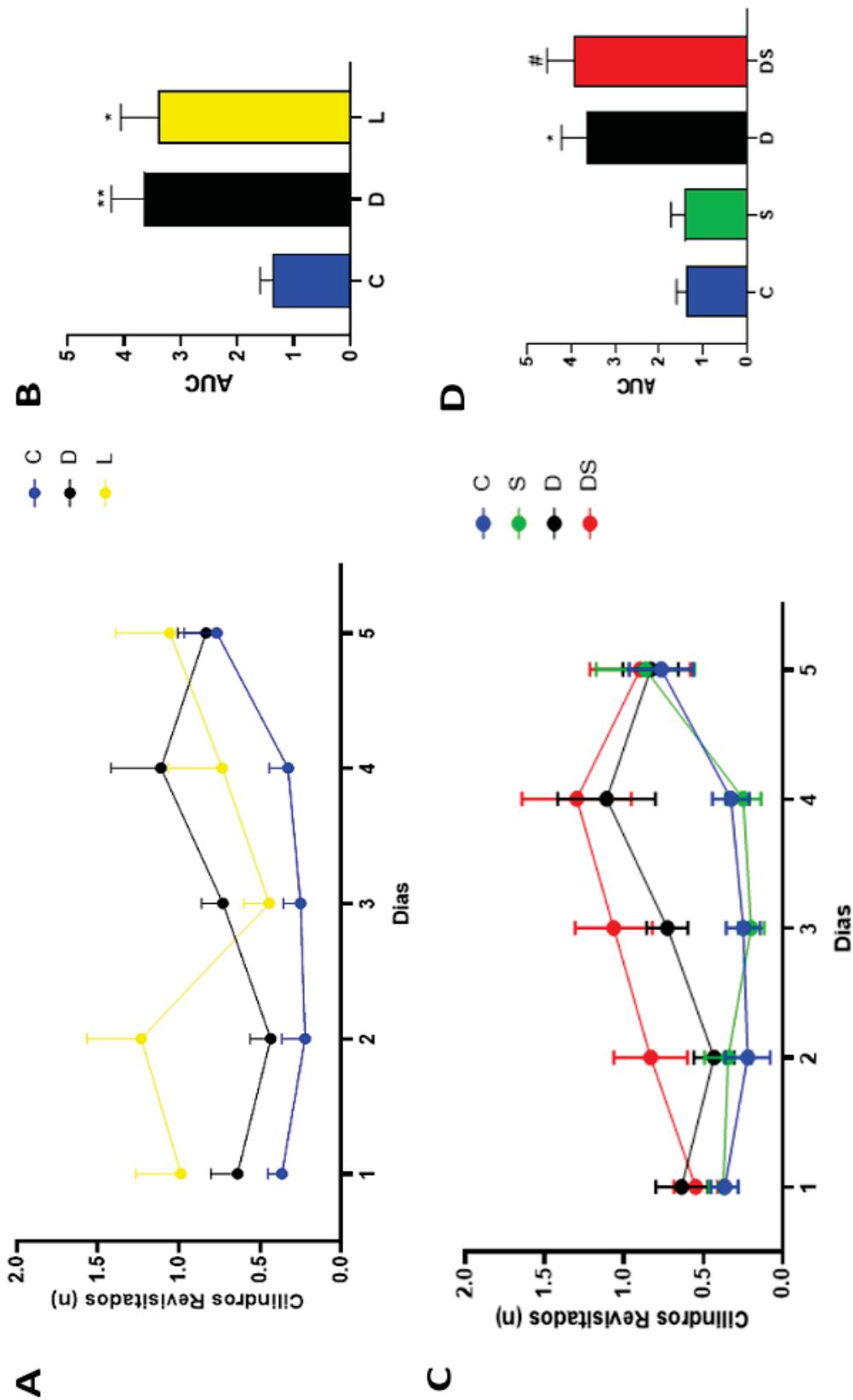
#### I) Efeitos da Diabetização

Não houve variações estatisticamente significativas ao longo da análise comportamental quanto ao número de cilindros revisitados nos grupos C, D e L ( $p = 0,36$ ;  $p = 0,30$  e  $p = 0,12$ , respectivamente; Figura 19 A), contudo, a AUC dos grupos D e L foram 160 ( $p < 0,005$ ) e 150 % ( $p < 0,05$ ) maiores que a do grupo C (Figura 19 B). Em relação a diferenças entre os grupos em dias específicos, o grupo D apresentou média seis vezes maior que o grupo C. Não houve diferenças entre os demais grupos (Tabela 3 – Cilindros Revisitados).

#### II) Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe Rico em AGPI n-3

Não houve variações estatisticamente significativas ao longo da análise comportamental quanto ao número de cilindros revisitados nos grupos S e DS ( $p = 0,47$  e  $p = 0,41$ , respectivamente; Figura 19 C). A AUC do grupo DS foi 180 % maior em comparação ao grupo S ( $p < 0,05$ ; Figura 19 D). Não houve diferença na AUC do grupo S em comparação ao grupo C. Quanto a diferença entre os grupos em dias específicos, o grupo DS apresentou valores superiores em relação aos grupos S no dia 3 e 4 ( $p < 0,05$ ; Tabela 3 – Cilindros Revisitados)

FIGURA 19: Número de cilindros revisitados pelos experimentais longo de 5 dias de avaliação



**Legendas:** Número de cilindros revisitados ao longo do período de teste dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (ANOVA de medidas repetidas) (A); AUC dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (ANOVA de uma via, \*  $p < 0,05$  vs. C; \*\*  $p < 0,005$  vs. C) (B); Número de cilindros revisitados ao longo do período de teste dos grupos controle, controle suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado e suplementado com óleo de peixe (ANOVA de medidas repetidas) (C); AUC dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado e suplementado com óleo de peixe (ANOVA de duas vias; \*  $p < 0,05$  vs. C; #  $p < 0,05$  vs. S) (D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo).

### 5.2.8. Cognição – Erros por omissão (não visitar cilindros com recompensa)

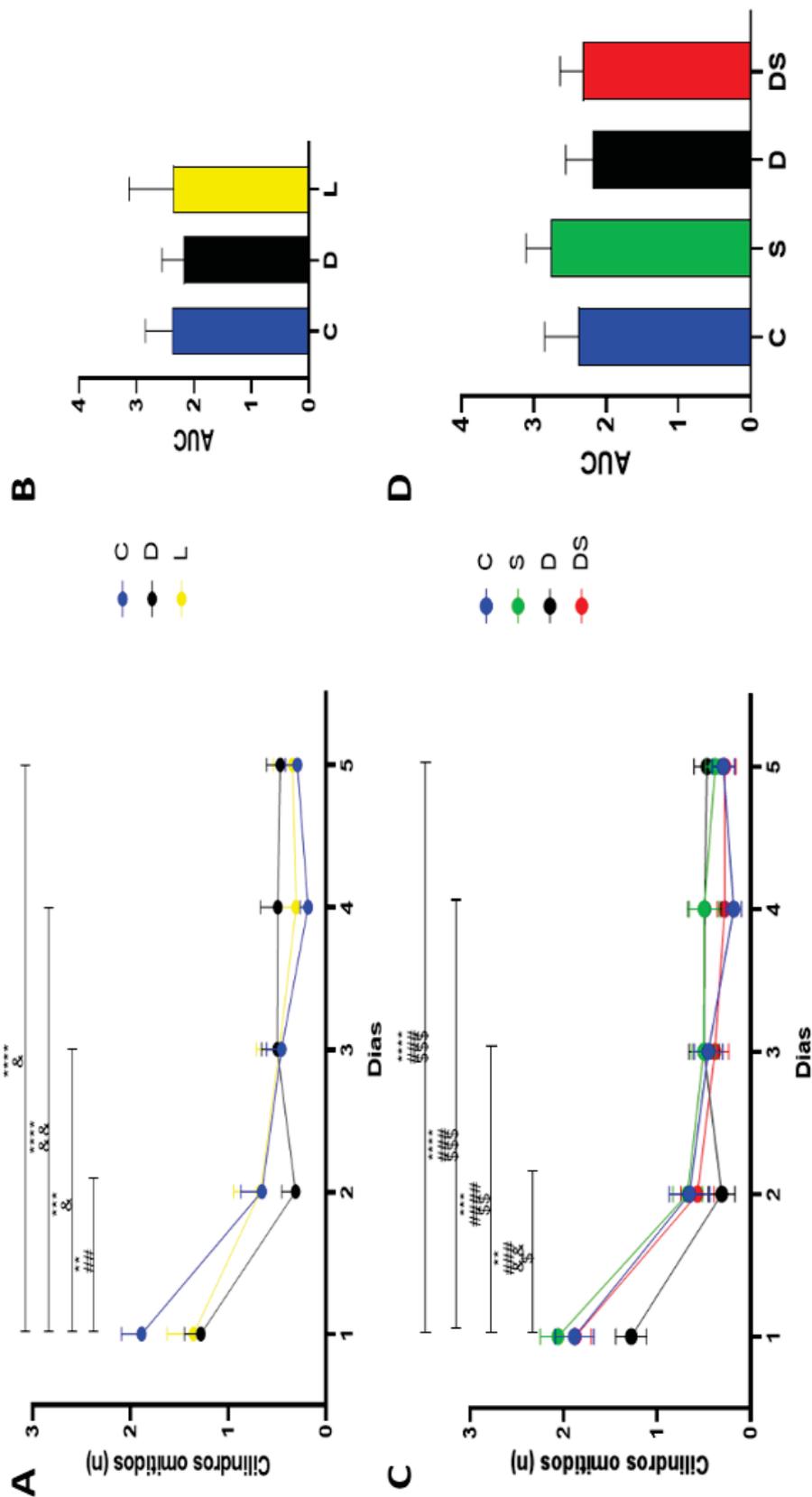
#### I) Efeitos da Diabetização

Todos os grupos tiveram variações ao longo da avaliação comportamental ( $p < 0,0001$ ; Figura 20 A). O dia com maior número de cilindros omitidos foi o dia 1. O grupo C teve redução de 65 % no dia 2 ( $p < 0,005$ ), 76 % no dia 3 ( $p < 0,0005$ ), 90 % no dia 4 ( $p < 0,0001$ ) e 84% no dia 5 ( $p < 0,0001$ ). O grupo D apresentou redução significativa apenas no dia 2 (redução de 75 %; dia 2 vs. dia 1;  $p < 0,005$ ). O grupo L teve redução de 67, 79 e 76 % nos dias 3 ( $p < 0,05$ ), 4 ( $p < 0,005$ ) e 5 ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença na AUC dos grupos ( $p = 0,61$ ; Figura 20 B), assim como nas comparações em dias específicos (Tabela 2 – Cilindros Omitidos).

#### II) Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe Rico em AGPI n-3

Os grupos suplementados apresentaram variações ao longo do período de teste ( $p < 0,0001$ ; Figura 20 C). O grupo S apresentou redução de 69, 78, 75 e 81 % nos dias 2 ( $p < 0,0005$ ), 3 ( $p < 0,0001$ ), 4 ( $p < 0,0005$ ) e 5 ( $p < 0,0005$ ), respectivamente, em relação ao dia 1. Similarmente, o grupo DS teve médias 69, 79, e 85 % menores nos dias 2 ( $p < 0,05$ ), 3 ( $p < 0,005$ ), 4 ( $p < 0,0005$ ) e 5 ( $p < 0,0005$ ), respectivamente em relação ao dia 1. Não houve diferença na AUC dos grupos (Figura 20 D), bem como nas comparações em dias específicos (Tabela 3 – Cilindros Omitidos).

FIGURA 20: Número de cilindros omitidos pelos grupos experimentais ao longo de 5 dias de avaliação



**Legendas:** Número de cilindros omitidos ao longo do período de teste dos grupos controle, diabético e controle positivo (Teste de Friedman;  $p < 0,005$ ,  $*** p < 0,0005$ ,  $**** p < 0,0001$  para grupo controle;  $## p < 0,005$ ,  $### p < 0,0005$ ,  $#### p < 0,0001$  para grupo diabético;  $& p < 0,05$ ,  $&& p < 0,005$ ,  $&&& p < 0,0005$  para grupo controle positivo) (A); AUC dos grupos controle, diabético e controle positivo (Teste de Kruskal-Wallis) (B). Número de cilindros omitidos ao longo do período de teste dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (Teste de Friedman;  $** p < 0,005$ ,  $*** p < 0,0005$ ,  $**** p < 0,0001$  para grupo controle;  $### p < 0,0005$ ,  $#### p < 0,0001$  para o grupo diabético;  $& p < 0,05$ ,  $&& p < 0,005$ ,  $&&& p < 0,0005$  para o grupo controle suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe) (C); AUC dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (Teste de Kruskal-Wallis) (D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo).

### 5.2.9 Tempo de performance

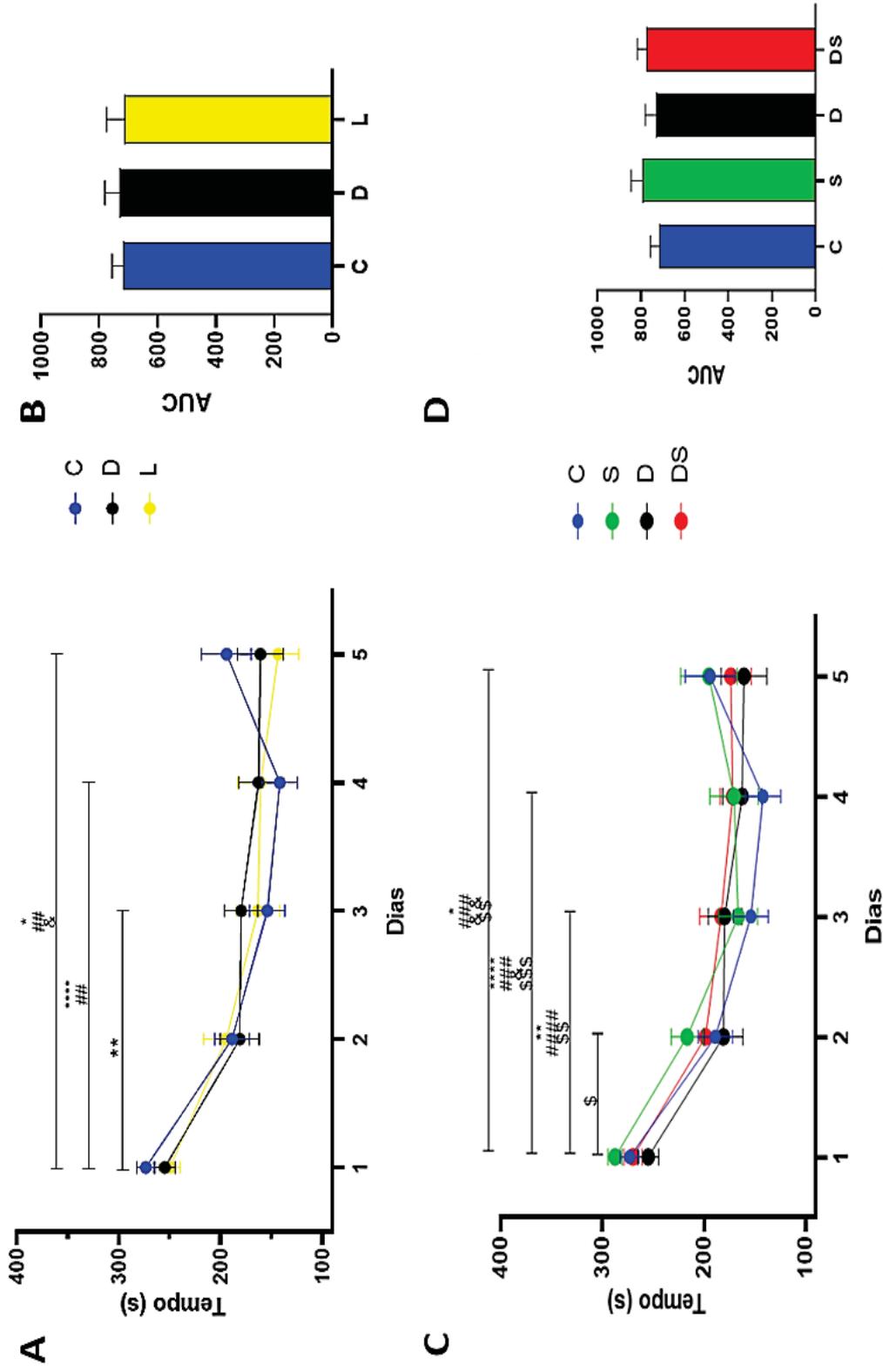
#### I) Efeitos da Diabetização

Todos os grupos apresentaram variação do tempo de performance ao longo do período de avaliação (grupo C:  $p < 0,0001$ ; grupo D:  $p = 0,002$ ; grupo L:  $p = 0,008$ , Figura 21 A). O grupo C teve redução de 43, 48 e 28 % nos dias 3 ( $p < 0,005$ ), 4 ( $p < 0,0005$ ) e 5 ( $p < 0,05$ ), comparativamente ao primeiro dia. O grupo D apresentou redução de 36 % ( $p < 0,005$ ) nos dias 4 e 5, em comparação ao dia 1. Por outro lado, o grupo L apresentou redução significativa do tempo de performance apenas no dia 5 (cerca de 42 %;  $p < 0,05$ ), em relação ao dia 1. Não houve diferença na AUC entre os grupos (Figura 21 B), assim como nas comparações em dias específicos (Tabela 2 - Tempo de Performance).

#### II) Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe Rico em AGPI n-3

Todos os grupos suplementados apresentaram variação do tempo de performance ao longo do período de avaliação (grupo S:  $p < 0,0001$  e grupo DS:  $p = 0,0005$ ; Figura 21 C). O grupo S apresentou redução do tempo de performance de 24, 42, 40 e 32 % nos dias 2 ( $p < 0,05$ ), 3 ( $p < 0,0001$ ), 4 ( $p < 0,0005$ ) e 5 ( $p < 0,0005$ ), respectivamente, em comparação ao dia 1. O grupo DS também teve redução entre 26 e 36 % nos dias 2 ( $p < 0,05$ ), 3 ( $p < 0,005$ ), 4 ( $p < 0,0005$ ) e 5 ( $p < 0,005$ ). Não houve diferença na AUC entre os grupos (Figura 21 D), assim como nas comparações em dias específicos (Tabela 3 - Tempo de Performance).

FIGURA 21: Tempo de performance dos grupos experimentais ao longo de 5 dias de avaliação.



**Legendas:** Tempo de performance ao longo do período de teste dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (Teste de Friedman; \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  para grupo controle; ##  $p < 0,05$  para grupo diabetizado; &  $p < 0,05$  para o grupo controle positivo) (A); AUC dos grupos controle, diabetizado e controle positivo (Teste de Kruskal-Wallis) (B); Tempo de performance ao longo do período de teste dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (Teste de Friedman; \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  para grupo controle; \$  $p < 0,05$ , \$\$  $p < 0,005$ ; \$\$\$  $p < 0,0005$  para o grupo suplementado com óleo de peixe; ###  $p < 0,005$  para grupo diabetizado; &  $p < 0,05$ , &&  $p < 0,005$ , &&&  $p < 0,0005$  para o grupo diabetizado suplementado com óleo de peixe) (C); AUC dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (Teste de Kruskal-Wallis) (D). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (15 – 16 animais por grupo).

TABELA 2: Avaliação diária de parâmetros comportamentais e cognitivos dos grupos controle (C), diabético (D) e controle positivo (L)

		PARÂMETROS									
DIAS	GRUPOS	Linhas cruzadas	Rearing (n)	Edge – Sniff (n)	Tempo no centro da prancha (%)	Cilindros visitados (n)	Cilindros errados (n)	Cilindros revisitados (n)	Cilindros omitidos (n)	Tempo (s)	
<b>Dia 1</b>	C	69,41 ± 4,13	17,23 ± 0,91	19,03 ± 1,67	22 ± 2,2	3 ± 0,33	1,6 ± 0,33	0,36 ± 0,08	1,9 ± 0,21	273,2 ± 9,0	
	D	75,18 ± 5,30	23,92 ± 1,5 **	22,88 ± 2,26	25,1 ± 2,0	3,2 ± 0,14	1,75 ± 0,36	0,63 ± 0,15	1,28 ± 0,17	254,9 ± 10,4	
	L	69 ± 5,9	19,9 ± 1,4	19,95 ± 1,07	21,89 ± 2,5	3,01 ± 0,58	2,4 ± 0,5	0,98 ± 0,26	1,35 ± 0,26 *	249,9 ± 10,36	
<b>Dia 2</b>	C	52,39 ± 5,14	7,82 ± 0,85	15,34 ± 1,44	28,43 ± 1,64	3,27 ± 0,32	1,30 ± 0,21	0,22 ± 0,09	0,45 ± 0,15	154 ± 17,2	
	D	63,76 ± 5,2	15,39 ± 2,66 **	18,33 ± 2,07	31,05 ± 2,8	6,06 ± 0,65 ***	3,46 ± 0,49 **	1,34 ± 0,35 *	0,5 ± 0,16	179,7 ± 16,19	
	L	53,6 ± 5,9	4,7 ± 0,75 ###	11,77 ± 1,09 #	48,3 ± 3,9 *** ##	5,3 ± 0,46 *	2,2 ± 0,43	0,44 ± 0,15	0,47 ± 0,23	163,1 ± 21,46	
<b>Dia 3</b>	C	54,59 ± 4,08	10,22 ± 1,07	18,1 ± 1,39	21,02 ± 2,2	3,99 ± 0,33	2,04 ± 0,29	0,21 ± 0,12	0,65 ± 0,21	188,8 ± 17,01	
	D	59,78 ± 4,86	14,69 ± 2,4	17,54 ± 1,16	23,21 ± 1,8	5,76 ± 0,45 **	3,06 ± 0,63	0,46 ± 0,12	0,31 ± 0,14	180,9 ± 19,31	
	L	53,8 ± 5,8	11,2 ± 2,6	12 ± 1,63 ** #	32,8 ± 6,2	5,36 ± 0,16 *	2,1 ± 0,34	1,15 ± 0,32	0,67 ± 0,27	194,3 ± 22,36	
<b>Dia 4</b>	C	48,91 ± 5,2	8,77 ± 1,39	15,85 ± 1,75	22,77 ± 1,8	3,58 ± 0,32	0,88 ± 0,18	0,40 ± 0,12	0,18 ± 0,08	141,7 ± 17,46	
	D	53,66 ± 4,4	11,35 ± 1,52	18,69 ± 1,53	29,83 ± 1,8 *	4,85 ± 0,36 *	2,13 ± 0,37 *	1,07 ± 0,29	0,49 ± 0,17	162,6 ± 19,27	
	L	58,8 ± 9,1	5,02 ± 1,02 ##	11,70 ± 1,89 #	33,3 ± 1,6 ***	5,1 ± 0,3 **	3,5 ± 0,68 ***	0,70 ± 0,31	0,30 ± 0,19	160,5 ± 22,8	
<b>Dia 5</b>	C	59,6 ± 6,7	9,75 ± 1,41	24,47 ± 2,67	25,36 ± 1,6	7,09 ± 0,66	4,03 ± 0,61	0,94 ± 0,26	0,29 ± 0,12	194,1 ± 24,42	
	D	53,28 ± 6,4	10 ± 1,9	19,34 ± 1,97	30,22 ± 2,3	8,25 ± 0,83	5,12 ± 0,76	0,90 ± 0,18	0,46 ± 0,14	160,6 ± 22,64	
	L	54,4 ± 7,4	10,19 ± 2,4	13,10 ± 1,7 **	39,13 ± 5,0 *	9,88 ± 1,18	5,7 ± 0,78	0,98 ± 0,32	0,34 ± 0,19	143,5 ± 20,7	

**Legendas:** Análise comparativa diária dos parâmetros de comportamento e cognição dos grupos controle, diabético e controle positivo (ANOVA de uma via para dados paramétricos, ou teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos; \* p < 0,05, \*\* p < 0,005, \*\*\* p < 0,0005, \*\*\*\* p < 0,0001 vs. C; # p < 0,05, ## p < 0,005, ### p < 0,0005, #### p < 0,0005 vs. D). Os dados estão expressos como média ± EPM (15 – 16 animais por grupo).

TABELA 3: Avaliação diária de parâmetros comportamentais e cognitivos dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (S), diabético (D) e diabético suplementado com óleo de peixe (DS)

PARÂMETROS										
DIAS	GRUPOS	Linhas cruzadas	Rearing (n)	Edge – Sniff (n)	Tempo no centro da prancha (%)	Cilindros visitados (n)	Cilindros errados (n)	Cilindros revisitados (n)	Cilindros omitidos (n)	Tempo (s)
<b>Dia 1</b>	C	69,41 ± 4,13	17,23 ± 0,91	19,03 ± 1,67	22 ± 2,2	3 ± 0,33	1,6 ± 0,33	0,36 ± 0,08	1,9 ± 0,21	273,2 ± 9,0
	S	73,26 ± 5,95	17,89 ± 0,85	16,92 ± 0,69	16,53 ± 2,3	2,25 ± 0,45	1,13 ± 0,33	0,37 ± 0,09	2,06 ± 0,19	287,5 ± 6,9
	D	75,18 ± 5,30	23,92 ± 1,5	22,88 ± 2,26	25,1 ± 2,0	3,2 ± 0,14	1,75 ± 0,36	0,63 ± 0,15	1,28 ± 0,17	254,9 ± 10,4
	DS	76,76 ± 6,66	18,16 ± 0,94 <sup>&amp;</sup>	22,97 ± 1,82 <sup>&amp;</sup>	17,62 ± 1,66 <sup>&amp;</sup>	2,82 ± 0,33	1,6 ± 0,35	0,51 ± 0,13	1,88 ± 0,17	269,9 ± 8,7
<b>Dia 2</b>	C	54,59 ± 4,08	10,22 ± 1,07	18,1 ± 1,39	21,02 ± 2,2	3,99 ± 0,33	2,04 ± 0,29	0,21 ± 0,12	0,65 ± 0,21	188,8 ± 17,01
	S	58,18 ± 5,4	14,12 ± 1,69	19,15 ± 1,94	16,7 ± 1,8	3,53 ± 0,28	1,63 ± 0,35	0,36 ± 0,13	0,67 ± 0,15	216,6 ± 15,73
	D	59,78 ± 4,86	14,69 ± 2,4	17,54 ± 1,16	23,21 ± 1,8	5,76 ± 0,45	3,06 ± 0,63	0,46 ± 0,12	0,31 ± 0,14	180,9 ± 19,31
	DS	65,3 ± 6,2	12,44 ± 1,7	15,81 ± 1,99	22,48 ± 1,2	5,44 ± 0,49	2,77 ± 0,34	0,84 ± 0,21	0,57 ± 0,17	198,5 ± 15,86
<b>Dia 3</b>	C	52,39 ± 5,14	7,82 ± 0,85	15,34 ± 1,44	28,43 ± 1,64	3,27 ± 0,32	1,30 ± 0,21	0,22 ± 0,09	0,45 ± 0,15	154 ± 17,2
	S	43,02 ± 3,6	12,67 ± 2,22	14,37 ± 1,13	33,74 ± 2,1	3,59 ± 0,45	1,42 ± 0,26	0,17 ± 0,07	0,50 ± 0,12	166,2 ± 19,02
	D	63,76 ± 5,2	15,39 ± 2,66	18,33 ± 2,07	31,05 ± 2,8	6,06 ± 0,65 <sup>*</sup>	3,46 ± 0,49 <sup>*</sup>	1,34 ± 0,35 <sup>*</sup>	0,5 ± 0,16	179,7 ± 16,19
	DS	61,38 ± 6,04 <sup>#</sup>	15,4 ± 2,68	18,26 ± 1,55	30,65 ± 2,7	6,54 ± 0,78 <sup>##</sup>	3,68 ± 0,75 <sup>#</sup>	1,03 ± 0,23 <sup>#</sup>	0,38 ± 0,14	183,2 ± 20,93
<b>Dia 4</b>	C	48,91 ± 5,2	8,77 ± 1,39	15,85 ± 1,75	22,77 ± 1,8	3,58 ± 0,32	0,88 ± 0,18	0,40 ± 0,12	0,18 ± 0,08	141,7 ± 17,46
	S	35,49 ± 3,6	8,71 ± 1,44	16,54 ± 2,35	22,16 ± 2,2	3,20 ± 0,28	1,04 ± 0,30	0,22 ± 0,10	0,33 ± 0,12	170,5 ± 23,98
	D	53,66 ± 4,4	11,35 ± 1,52	18,69 ± 1,53	29,83 ± 1,8	4,85 ± 0,36	2,13 ± 0,37 <sup>*</sup>	1,07 ± 0,29	0,49 ± 0,17	162,6 ± 19,27
	DS	59,13 ± 4,6 <sup>#</sup>	12,09 ± 1,47	18,68 ± 1,53	26,19 ± 1,9	6,13 ± 0,79 <sup>##</sup>	2,93 ± 0,59 <sup>##</sup>	1,25 ± 0,32 <sup>#</sup>	0,28 ± 0,07	171,6 ± 12,64
<b>Dia 5</b>	C	59,6 ± 6,7	9,75 ± 1,41	24,47 ± 2,67	25,36 ± 1,6	7,09 ± 0,66	4,03 ± 0,61	0,94 ± 0,26	0,29 ± 0,12	194,1 ± 24,42
	S	55,74 ± 5,0	12,61 ± 2,0	17,44 ± 1,82	22,8 ± 1,7	7,07 ± 0,85	4,54 ± 0,81	0,76 ± 0,28	0,38 ± 0,10	195,1 ± 27,86
	D	53,28 ± 6,4	10 ± 1,9	19,34 ± 1,97	30,22 ± 2,3	8,25 ± 0,83	5,12 ± 0,76	0,90 ± 0,18	0,46 ± 0,14	160,6 ± 22,64
	DS	52,23 ± 6,49	14,66 ± 2,79	18,24 ± 2,40	26 ± 1,5	6,85 ± 0,79	4,6 ± 1,04	0,84 ± 0,30	0,28 ± 0,12	173,6 ± 20,27

Legendas: Análise comparativa diária dos parâmetros de comportamento e cognição dos grupos controle, suplementado com óleo de peixe, diabético e diabético suplementado com óleo de peixe (ANOVA de duas vias para dados paramétricos, ou teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos; \* p < 0,05 vs. C; # p < 0,05, ## p < 0,005 vs. S; & p < 0,05 vs. D). Os dados estão expressos como média ± EPM (15 – 16 animais por grupo).

### 5.2.10 Integração das variáveis neurocomportamentais ao longo de 5 dias de avaliação

#### I) Efeito da Diabetização

Durante a fase de aprendizagem (dia 1 – 3), os grupo D e L apresentaram aumento nas medidas referentes a memória declarativa e memória de trabalho, em comparação ao grupo C (Figura 22 A, B e C). Contudo, no dia 3 todos os grupos apresentaram o mesmo padrão de resposta cognitiva, quanto ao número de cilindros visitados, revisitados, omitidos, número de erros e acertos. O grupo D apresentou resposta exploratória (direta e indireta) exacerbada, enquanto os animais do grupo L demonstraram redução destes parâmetros, em comparação ao grupo C (Figura 22 C).

Na fase de teste (dia 4), os animais D e L apresentaram menor tempo de performance, em relação ao grupo C. As variáveis cognitivas do grupo D foram inferiores as do grupo C, com maior número de escolhas erradas e revisitas (Figura 22 D). O grupo L, por sua vez, apresentou média superior no parâmetro de escolha a cilindros errados, em comparação aos grupos C e D, mas exibiu valores similares ao C, quanto ao número de revisitas. Nesta fase, a atividade locomotora e exploratória dos grupos permaneceu igual ao da fase de aprendizagem.

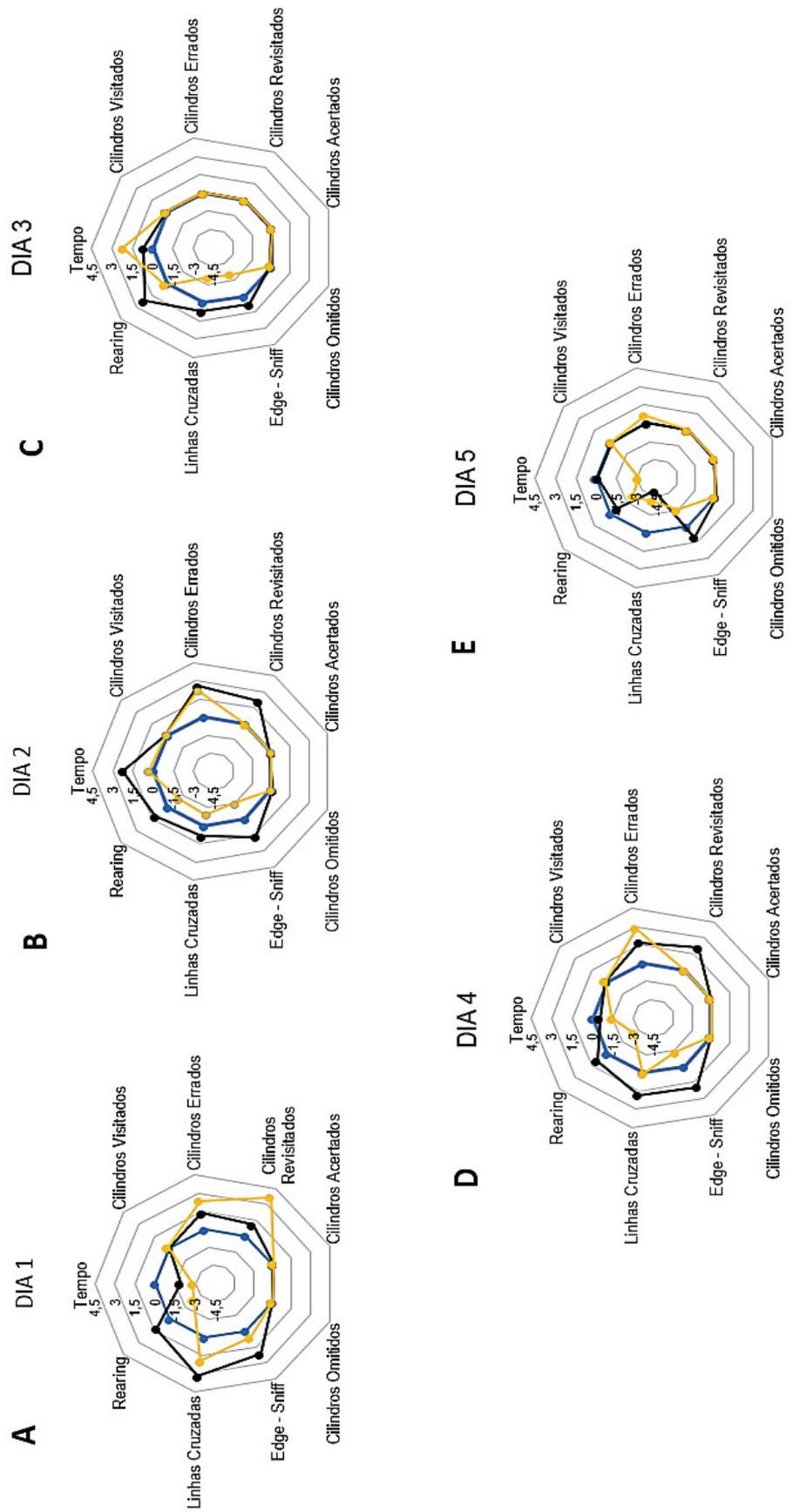
Por fim, no dia 5 (teste reverso), os grupos apresentaram valores similares quanto a cognição (Figura 22 E). Os grupos D e L reduziram a atividade locomotora número de *rearing*. O Grupo L teve menor tempo de performance, enquanto o grupo D explorou indiretamente mais vezes os cilindros.

## II) Efeito da Suplementação com Óleo de Peixe Rico em AGPI n-3

Na fase de aprendizagem, o grupo S apresentou resultados similares ao grupo C (Figura 23 A). No dia 2 e 3, os animais gastaram mais tempo para a conclusão da tarefa (Figura 23 B). Apesar de reduzirem a atividade locomotora e exploratória indireta aos cilindros, o grupo S teve maior frequência de *rearing*, comparativamente ao grupo C. No dia 4, os animais do grupo S apresentaram resultados similares aos do grupo C, com aumento discreto no número de cilindros explorados e redução da atividade locomotora e tempo de performance (Figura 23 D). Por fim, no dia 5, o grupo S exibiu melhor performance cognitiva em comparação ao grupo C, com redução do número de escolhas erradas e revisitas (Figura 23 E).

O grupo DS apresentou resultados similares aos do grupo D na performance cognitiva. Apesar de dispenderem mais tempo para a conclusão da tarefa, os animais DS apresentaram redução dos parâmetros referentes a locomoção e exploração no dia 1 e 2 (Figura 24 A e B). Contudo, no dia 3, o grupo DS demonstrou melhora das funções cognitivas, com redução do número de revisitas e erros, em comparação ao grupo D (Figura 24 C). No dia 4, os animais apresentaram resultados similares aos dados exibidos no dia 2, não havendo diferença entre a performance cognitiva do grupo DS e D (Figura 24 D). No dia 5, o grupo DS apresentou maior número de *rearing* e menor número de revisitas em comparação ao grupo D, não havendo diferença nas demais variáveis (Figura 24 E).

FIGURA 22: Integração das variáveis neurocomportamentais ao longo de 5 dias de avaliação dos grupos (C), diabetizados (D) e controle positivo (L).



Legendas:

- — ● C
- — ● D
- — ● L

87 **Legendas:** Resposta integrada de parâmetros neurocomportamentais ao longo dos 5 dias de teste dos grupos controle, diabetizado e controle positivo. Integração das variáveis nos dias 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) e 5 (E).

FIGURA 23: Integração das variáveis neurocomportamentais ao longo de 5 dias de avaliação dos grupos controle (C) e suplementado com óleo de peixe (S) (S)

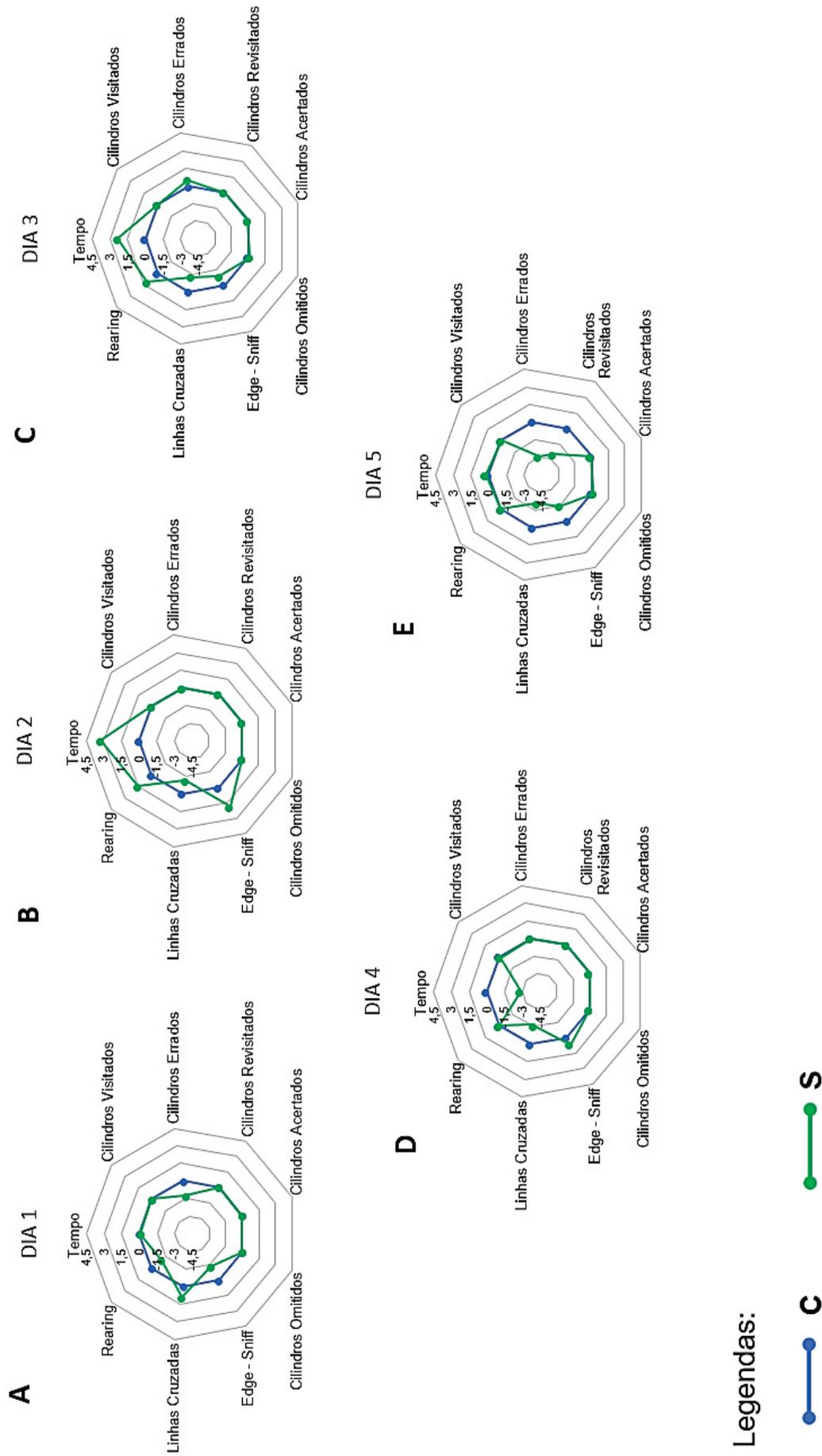
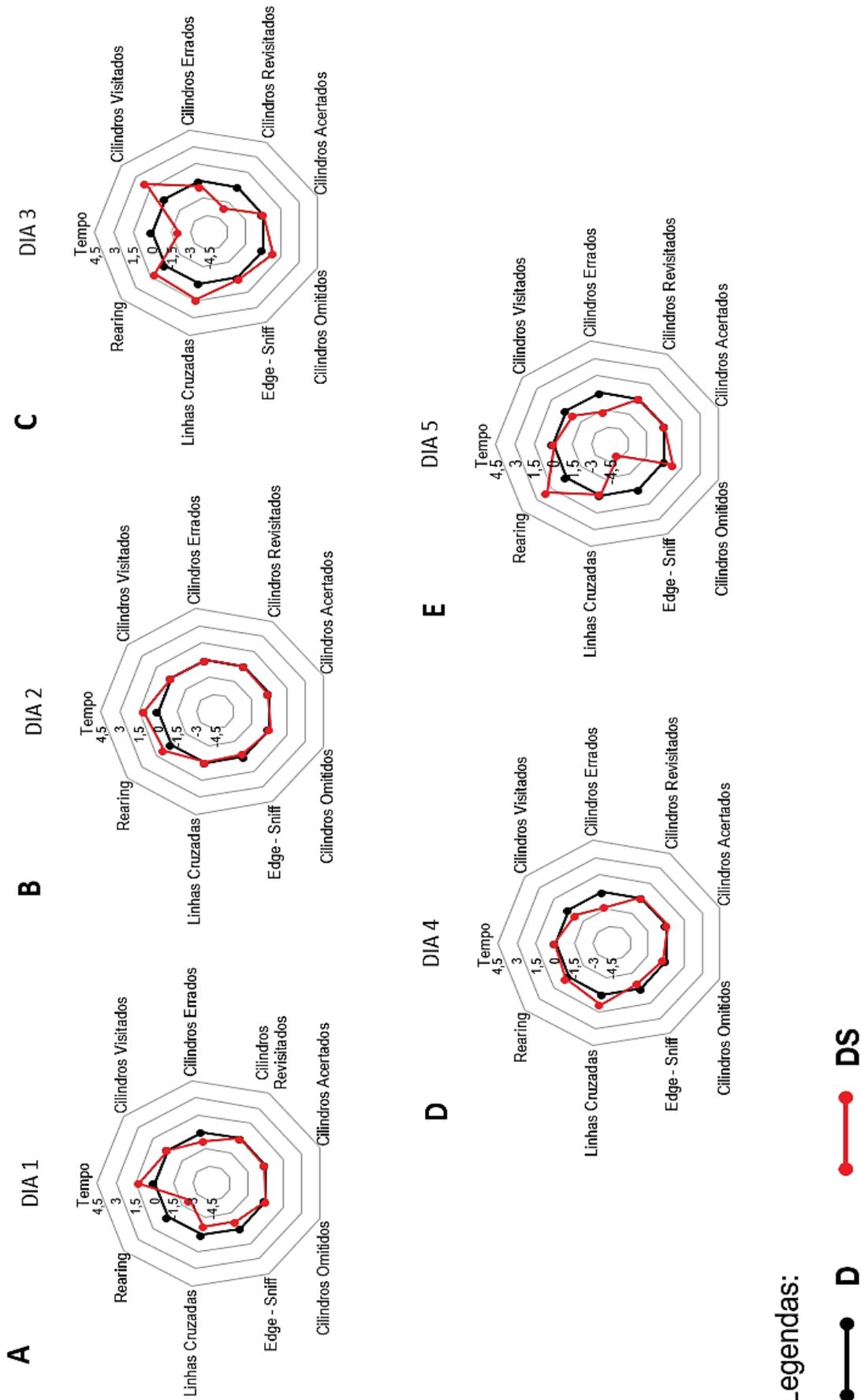


FIGURA 24: Integração das variáveis neurocomportamentais ao longo de 5 dias de avaliação dos grupos diabetizado (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS)



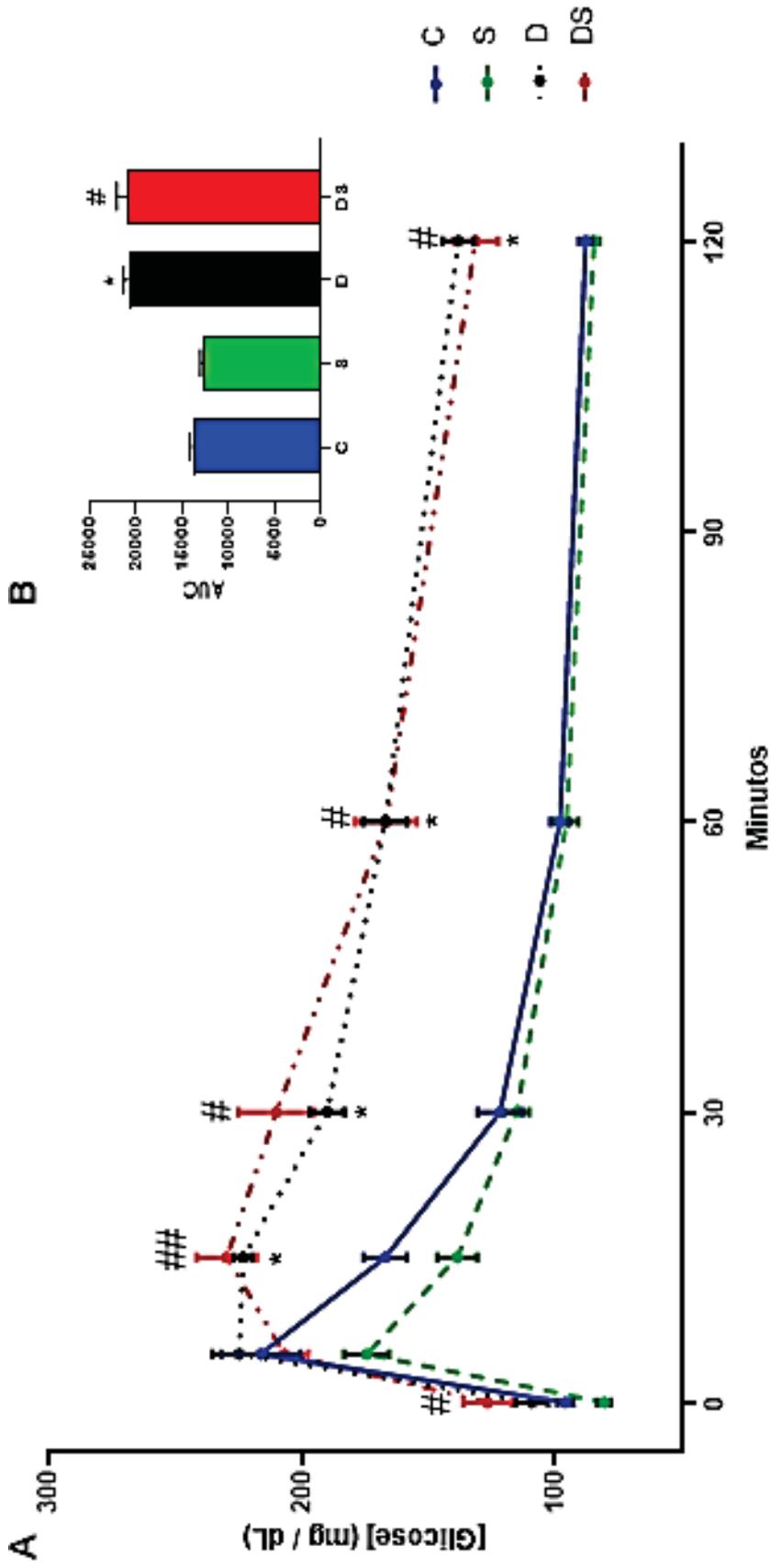
**Legendas:** Resposta integrada de parâmetros neurocomportamentais ao longo dos 5 dias de teste dos grupos diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe. Integração das variáveis nos dias 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) e 5 (E).

### 5.3 TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAVENOSO À GLICOSE

Os animais diabetizados, suplementados ou não (DS e D) apresentaram intolerância à glicose quando comparados aos seus respectivos controles (S e C) ( $p = 0,001$ ; Figura 25 A). A glicemia basal foi diferente apenas entre os grupos S vs. DS (50 % maior,  $p = 0,04$ ). Após 5 minutos da sobrecarga, todos os grupos apresentaram elevação da concentração glicêmica em relação aos valores basais, não havendo diferença entre eles. Nas mensurações de 15, 30, 60 e 120 minutos, o grupo D apresentou, respectivamente, valores 38 ( $p = 0,007$ ), 56 ( $p = 0,001$ ), 70 ( $p = 0,005$ ) e 57 % ( $p = 0,04$ ) maiores quando comparado ao grupo C. No mesmo intervalo, o grupo DS exibiu médias 65 ( $p = 0,002$ ), 82 ( $p = 0,02$ ), 76 ( $p = 0,04$ ) e 55 % ( $p = 0,03$ ) mais elevadas em relação ao grupo S.

O retorno da glicemia a valores basais dos grupos C e S ocorreu em 60 e 30 minutos após a sobrecarga, respectivamente. Tanto os animais do grupo D, quanto do grupo DS não retornaram à média basal após 120 minutos de teste. A AUC do grupo D foi 50 % maior que a do grupo C, assim como o grupo DS obteve valores 65 % mais elevado em relação ao grupo S ( $p < 0,0001$ ; Figura 25 B).

FIGURA 25: Teste de tolerância intravenoso à glicose d grupos controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (S), diabetizados (D) e diabetizados suplementados com óleo de peixe (DS).

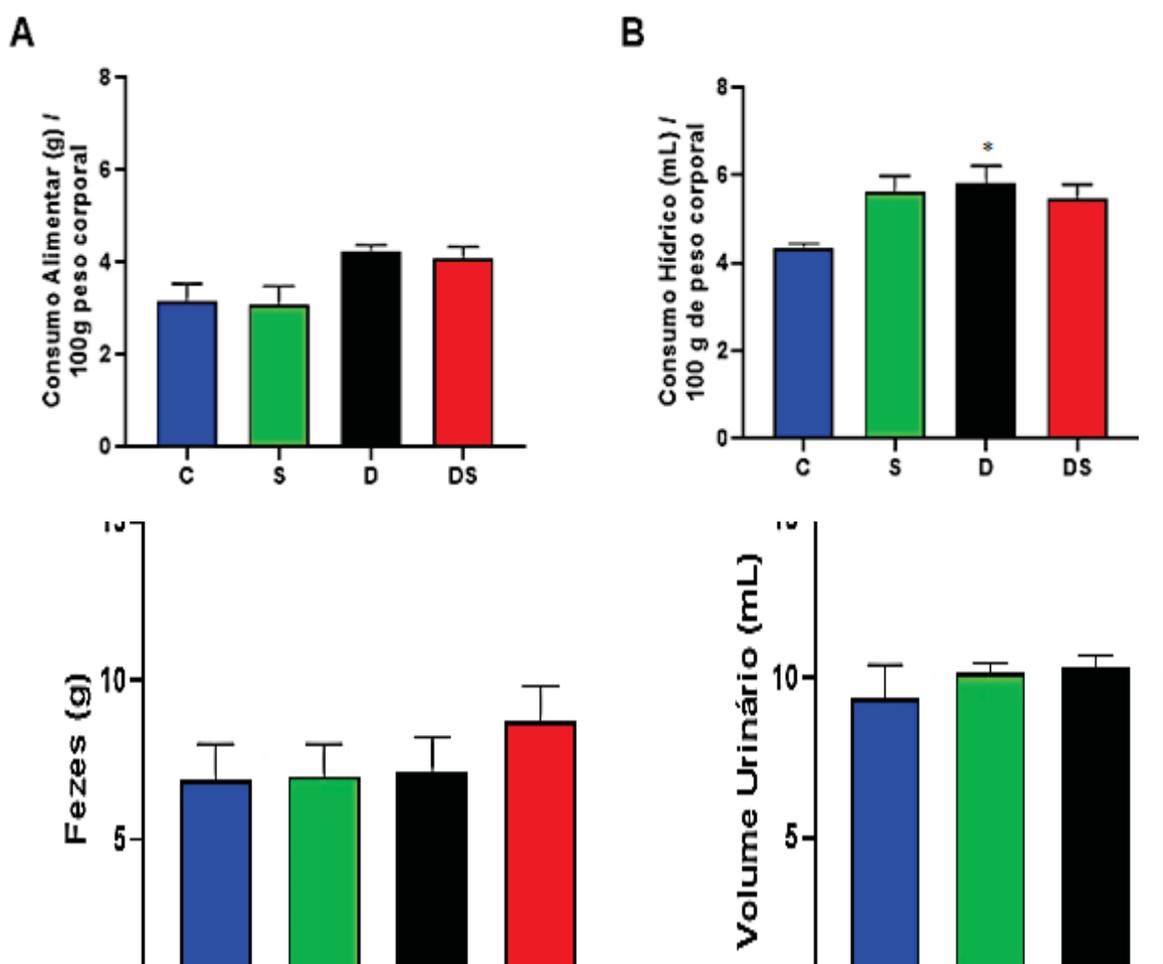


**Legenda:** Teste de tolerância intravenoso à glicose (iTTG) nos animais controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (S), diabetizado (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS) aos 140 dias de idade (ANOVA de medidas repetidas; \*  $p < 0,005$  vs. C; #  $p < 0,05$  vs. S; ##  $p < 0,005$  vs. S) (A); AUC do TTG dos grupos ao longo de 120 minutos (ANOVA de duas vias; \*  $p < 0,0001$  vs. C, #  $p < 0,0001$  vs. S.) (B). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (9 animais por grupo).

#### 5.4 AVALIAÇÃO EM GAIOLA METABÓLICA

Os animais do grupo D apresentaram maior consumo hídrico quando comparado ao grupo C ( $p = 0,02$ ; Figura 26 B). Não houve diferença entre os grupos quanto ao consumo alimentar, mesmo embora tenha havido aumento na ingestão ( $p = 0,09$ ; Figura 26 A), volume fecal ( $p = 0,50$ ; Figura 26 C) e volume urinário ( $p = 1,55$ ; Figura 26 D).

FIGURA 26: Consumo alimentar e hídrico e volume urinário e fecal dos animais controle (C), controle suplementado com óleo de peixe (S), diabetizado (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS) aos 140 dias de idade.



**Legenda:** Ingestão alimentar dos grupos ao longo de 12 horas (A); Ingestão hídrica dos grupos ao longo de 12 horas (B), \*  $p < 0,05$  vs. C; Volume urinário dos grupos ao longo de 12 horas (C); Volume fecal dos grupos ao longo de 12 horas (D). Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA de duas vias e expressos como média  $\pm$  EPM (9 animais por grupo).

## 5.5 CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E LIPÍDEOS PLASMÁTICOS

As mensurações plasmáticas efetuadas estão apresentadas na tabela 4. A concentração plasmática de glicose dos grupos D e DS foram 33 e 39 % maiores em relação ao grupo C e S, respectivamente ( $p < 0,0001$ , D vs. C;  $p = 0,021$ , DS vs. S). No perfil lipídico, os animais do grupo D tiveram aumento na concentração de TG (25 % maior;  $p = 0,0006$ ), CT (16 % maior;  $p = 0,03$ ), HDLc (35 % maior;  $p < 0,0001$ ) e VLDLc (27 % maior;  $p = 0,0018$ ) em relação ao grupo C.

O grupo DS teve redução nas concentrações de TG, CT e VLD-c quando comparado ao grupo D (diminuição de 18 % para TG;  $p = 0,01$ ; 14 % para CT;  $p = 0,03$  e 22 % para VLDLc;  $p = 0,0015$ ), e também redução de CT em comparação ao grupo S (diminuição de 25 %;  $p < 0,0001$ ). Não houve diferença entre os grupos nas concentrações de LDLc.

## 5.6 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE INSULINA E IL-6 E IL-10

A insulinemia do grupo D foi aproximadamente 10 % maior em relação a C ( $p = 0,0049$ , Tabela 4), contudo, não foi observado diferença entre os demais grupos ( $p > 0,05$ ). Quanto à concentração de interleucinas 6 e 10, não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

## 5.7 ÍNDICE DE HOMA-IR E QUICKI

Os grupos D e DS tiveram valores de HOMA-IR 50 % mais elevados ( $p < 0,0001$ ) e do QUICKI 7 % menores ( $p < 0,0001$ ) em relação aos grupos C e S, respectivamente (Tabela 4).

## 5.8 ÍNDICE DE CASTELLI I E II

O ID1 dos animais do grupo D foi maior em comparação ao do grupo C (aproximadamente 65% maior;  $p < 0,0001$ ; Tabela 4). Diferentemente, o grupo suplementado com OP (DS) teve redução dos mesmos valores em comparação a D (cerca de 48 % menor). O ID2 do grupo S foi menor em relação ao grupo C (redução de aproximadamente 34 %), assim como o grupo DS em comparação ao grupo D (redução de aproximadamente 58 %).

## 5.9 VARIÁVEIS CORPORAIS

As variáveis corporais estão apresentadas na tabela 4. Os pesos dos fígados dos grupos D e DS foram 12 e 22 % maiores em comparação aos grupos C e S, respectivamente ( $p < 0,0001$ ). Os depósitos de tecido adiposo retroperitoneal ( $p < 0,0001$ ) e gonadal ( $p < 0,0001$ ) foram reduzidos nos animais D e DS quando comparados ao C e S, respectivamente (redução de 52 e 43 % na gordura retroperitoneal e redução de 49 e 41 % na gordura gonadal). No tecido adiposo mesentérico, apenas o grupo D teve redução de 47 % em comparação ao grupo C ( $p < 0,0001$ ).

## 5.10 CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

O conteúdo de glicogênio hepático e do músculo gastrocnêmio não foram diferentes entre os grupos (Tabela 4). Por outro lado, a suplementação com OP aos animais do grupo DS provocou aumento do conteúdo de glicogênio do músculo sóleo em relação ao grupo D (cerca de 33 % superior;  $p = 0,0027$ ) e S (cerca de 42 % superior;  $p = 0,0008$ ).

TABELA 4: Parâmetros metabólicos dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (S), diabetizado (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS)

Parâmetros	C	S	D	DS
Glicose plasmática (mg/dL) (n=15-21)	96,58 ± 2,504	103,9 ± 3,008	128,6 ± 5,262 ****	144,9 ± 9,103 ****
Insulina plasmática (mU / mL) (n= 8-13)	2,543 ± 0,025	2,583 ± 0,031	2,719 ± 0,039 **	2,562 ± 0,036 *
Índice de HOMIA-IR (n=13)	0,620 ± 0,013	0,655 ± 0,025	0,947 ± 0,032 ****	1,001 ± 0,066 ****
Índice de QUICKI (n=13)	0,416 ± 0,001	0,413 ± 0,002	0,387 ± 0,002 ****	0,385 ± 0,004 ****
Coolesterol total plasmáticos (mg/dL) (n=20 - 24)	59,00 ± 2,485	78,78 ± 2,509 ****	68,34 ± 2,076 *	58,74 ± 2,815 &, ****
HDL-c plasmático (mg/dL) (n=15- 18)	47,80 ± 2,602	40,44 ± 1,422	64,79 ± 4,142 *	66,95 ± 6,178 ****
LDL-c plasmático (mg/dL) (n= 17 - 19)	34,98 ± 1,909	34,45 ± 1,853	35,81 ± 2,498	39,27 ± 1,559
VLDL-c plasmático (mg/dL) (n=17- 22)	12,07 ± 0,466	10,31 ± 0,754	15,37 ± 0,931 *	12,01 ± 0,739 *
Triacilgliceróis plasmático (mg/dL) (n=17 - 22)	59,01 ± 2,141	51,42 ± 2,978	73,71 ± 3,603 *	60,07 ± 3,700 *
Índice de Castelli 1 (n = 13-15)	1,10 ± 0,05	1,11 ± 0,08	1,83 ± 0,06 ****	0,93 ± 0,09 ****
Índice de Castelli 2 (n = 12 -14)	0,69 ± 0,07	0,46 ± 0,03 *	1,01 ± 0,11	0,42 ± 0,07 **&
IL-6 plasmática (pg / mL) (n=9 -11)	348,6 ± 9,684	344,6 ± 3,909	343,6 ± 4,654	340,3 ± 2,166
IL-10 plasmática (pg / mL) (n=9-11)	287,8 ± 3,028	293,6 ± 4,170	297,0 ± 4,345	306,2 ± 4,939
Fígado (g/100g) (n= 26-24)	2,811 ± 0,018	2,663 ± 0,030	3,170 ± 0,061 ****	3,254 ± 0,066 **
Gordura mesentérica (g/100g) (n = 22-28)	1,369 ± 0,038	1,272 ± 0,053	0,7138 ± 0,017 ****	1,148 ± 0,063 &&&&
Gordura retroperitoneal (g/100g) (n=28-33)	2,014 ± 0,074	1,876 ± 0,093	0,9537 ± 0,034 ****	1,073 ± 0,072 ****
Gordura gonadal (g/100g) (n=23-25)	1,234 ± 0,054	1,193 ± 0,049	0,635 ± 0,053 ****	0,699 ± 0,054 ****
Glicogênio hepático (mmol/g) (n=22-27)	39,63 ± 0,933	40,34 ± 1,120	39,72 ± 1,176	39,63 ± 1,331
Glicogênio - m. sóleo (mmol/g) (n= 10 - 12)	3,78 ± 0,21	3,13 ± 0,22	3,34 ± 0,15	4,45 ± 0,26 ***, &&
Glicogênio - m. gastrocnêmio (mmol/g) (n= 9)	0,59 ± 0,07	0,63 ± 0,07	0,74 ± 0,12	0,68 ± 0,03

**Legendas:** Parâmetros metabólicos e murinométricos dos animais dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (S), diabetizado (D) e diabetizado suplementado com óleo de peixe (DS) aos 150 dias de idade, \* p < 0,05, \*\* p < 0,005, \*\*\*\* p < 0,0001 vs. C; # p < 0,005, ### p < 0,0001 vs. S; & p < 0,05, && p < 0,005, &&& p < 0,0001 vs. D. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA de duas vias e expressos como média ± EPM.

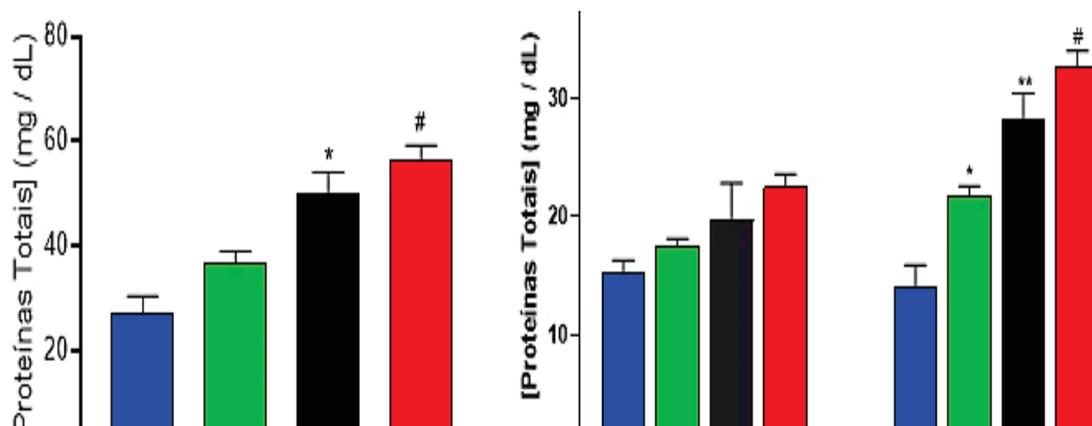
## 5.11 SISTEMA ANTIOXIDANTE

### 5.11.1 Quantificação de Proteínas Totais em Regiões Encefálicas

O desenvolvimento da diabetes (D) promoveu aumento de 66 % na concentração proteica total (Figura 27 A), em comparação ao grupo C ( $p = 0,0002$  vs. C). A suplementação com OP ao grupo diabetizado (DS) elevou ainda mais (45 %) comparada ao grupo S ( $p = 0,0006$ ). A concentração de proteínas totais no diencéfalo (Figura 27 B) aumentou nos animais diabetizados suplementados ou não (DS e D), contudo não foi diferente da dos animais controle (S e C, respectivamente,  $p > 0,05$ ). Já no telencéfalo (Figura 27 B), a suplementação com OP ao animal não diabetizado provocou aumento de 54 % na concentração de proteínas, significativamente maior que a encontrada no grupo controle sem suplementação ( $p = 0,01$  vs. C). A diabetização elevou ainda mais a concentração proteica (100 % no D e 49 % no DS), sendo ambos significativamente diferentes comparados aos seus respectivos controles ( $p < 0,0001$  vs. C,  $p = 0,0004$  vs. S).

Quanto à concentração proteica do diencéfalo (Figura 27 B), não houve diferença entre os grupos. No telencéfalo, os animais dos grupos D e DS obtiveram valores 100 e 49 % maiores em relação ao grupo C e S, respectivamente ( $p < 0,0001$ ), e o grupo S apresentou média 54 % superior em comparação ao C ( $p = 0,0009$ ).

FIGURA 27: Concentração de Proteínas Totais, Diencefalo e Telencefalo dos Animais Controle (C), Controle Suplementado com Óleo de Peixe (S), Diabetizado (D) e Diabetizado Suplementado com Óleo de Peixe (DS)



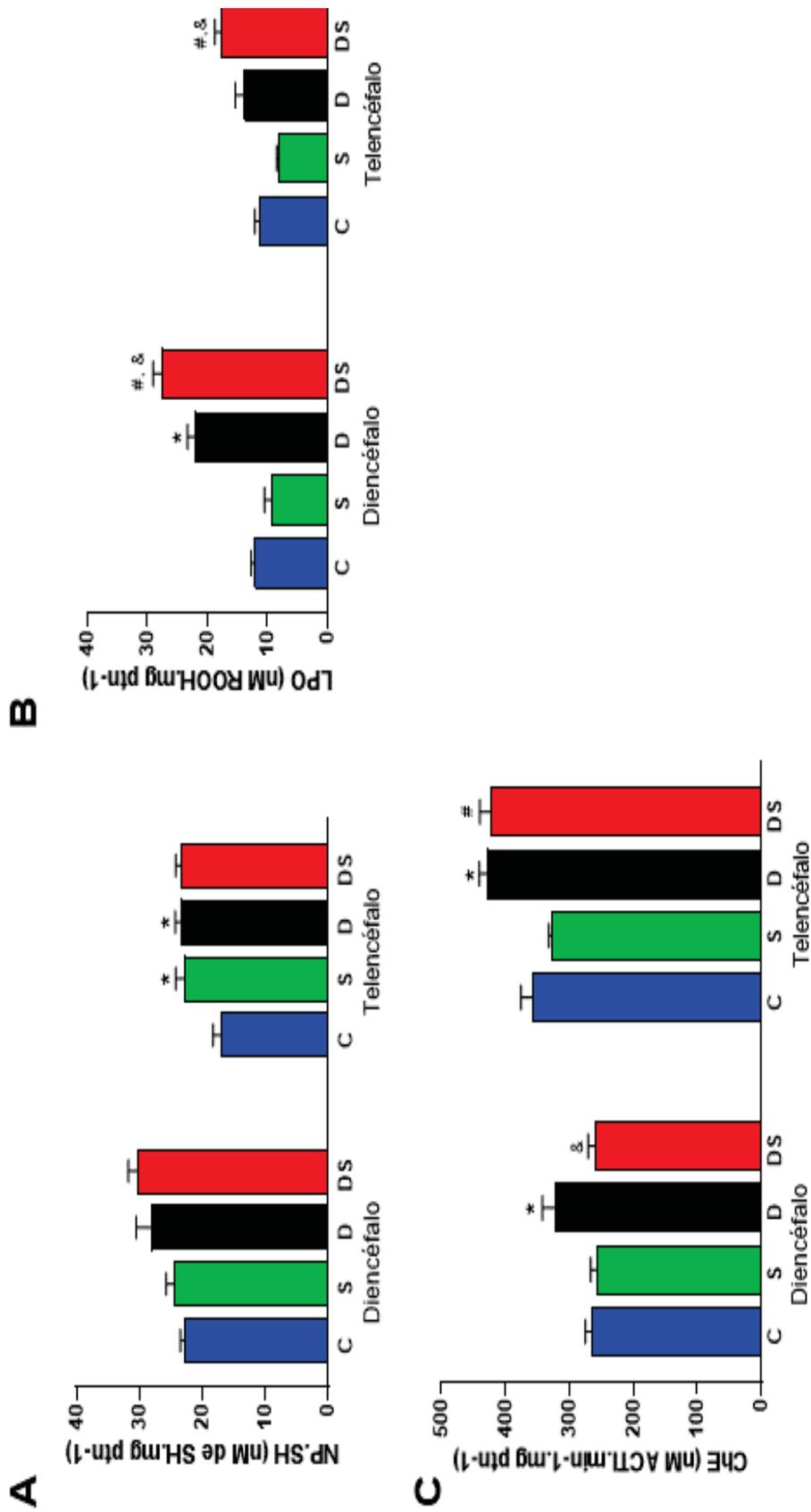
**Legenda:** Concentração de proteínas totais (A). \*  $p < 0,0005$  vs. C, #  $p < 0,0005$  vs. S; concentração de proteínas no diencefalo e telencefalo (B), \*  $p < 0,05$  vs. C, \*\*  $p < 0,0001$  vs. C, #  $p < 0,0005$  vs. S. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA de duas vias e expressos como média  $\pm$  EPM (7 animais por grupo).

### 5.12.2 Índices de Estresse Oxidativo e Neurotoxicidade em Regiões Encefálicas

No diencefalo, apesar da diabetização ter elevado a concentração de NP-SH, essa não foi diferente entre os grupos (Figura 28 A). Em relação a lipoperoxidação, a diabetização provocou aumento na região diencefálica de 82 % ( $p < 0,0001$ ; Figura 28 B) bem como na atividade da ChE aumento 22 % ( $p = 0,019$ ; Figura 28 C) comparado ao grupo C. A suplementação com OP (DS) provou aumento ainda maior (192 %) comparado ao grupo S ( $p < 0,0001$ ) e de 25 % superior comparado ao grupo diabetizado sem suplementação ( $p = 0,01$  vs. D), seguido de redução da atividade da ChE (19 %) em comparação aos animais do grupo D ( $p = 0,005$ ), retornando aos valores do controle ( $p > 0,05$  vs. S).

No telencéfalo (Figura 28 A), a suplementação com OP ao grupo controle (S) elevou a concentração de NP-SH de 33 % comparada ao C ( $p = 0,007$ ), contudo isso não alterou a taxa de LPO (Figura 28 B) nem a atividade da ChE (Figura 28 C) nessa região ( $p > 0,05$  vs. C). A diabetização (D), por sua vez, elevou a a concentração de NP-SH de 33 %, da LPO de 28% e a atividade da colinesterase de 29%. A suplementação com OP não modificou as alterações já promovidas pela diabetização ( $p > 0,05$  vs. D).

FIGURA 28: Concentração de NP-SH, Índice de Lipoperoxidação e Atividade da Colinesterase Total em Regiões do Diencefalo e Telencefalo dos Animais Controle (C), Controle Suplementado com Óleo de Peixe (S), Diabetizado (D) e Diabetizado Suplementado com Óleo de Peixe (DS)



**Legenda:** Tióis não proteicos em diencefalo e telencefalo dos grupos controle, controle suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (A), \*  $p < 0,005$  vs. C; Peroxidação de Lipídios em diencefalo e telencefalo dos grupos controle, controle suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (B), \*  $p < 0,0001$  vs. C, #  $p < 0,0001$  vs. S, &  $p < 0,05$  vs. D; colinesterase total em diencefalo e telencefalo dos grupos controle, controle suplementado com óleo de peixe, diabetizado e diabetizado suplementado com óleo de peixe (C), \*  $p < 0,05$  vs. C, &  $p < 0,005$  vs. D, #  $p < 0,0005$  vs. S. Os dados foram submetidos ao teste de ANOVA de duas vias e expressos como média  $\pm$  EPM (7 animais por grupo).

## 6 DISCUSSÃO

O DM constitui problema de saúde global, e tem afetado parcelas mais jovens da população mundial. O Brasil, é o quarto país com o maior número de pessoas com DM2, sendo cerca de 46% dos pacientes são não-diagnosticados (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). Por se tratar de uma doença multifatorial silenciosa, o quadro hiperglicêmico sustentado, concomitante a RI e desequilíbrio na metabolização de lipídeos direciona o organismo a complicações micro e macro vasculares tardias, chamadas de comorbidades (BARDINI; ROTELLA; GIANNINI, 2012).

Dentre as comorbidades diabéticas destacam-se a ED e DCV, sendo a comorbidade mais incapacitante e com maior mortalidade, respectivamente (BAYS et al., 2007; LOUZADA; VARGAS, 2015; MIJNHOUT et al., 2006; MYERS; KOKKINOS; NYELIN, 2019; SHAH et al., 2015; SIMA, 2010c, 2010b). Entretanto, para se compreender comorbidades esporádicas ao DM, bem como identificar potenciais efeitos terapêuticos do OP, faz-se necessário considerar o envolvimento multifatorial sistêmico incluído na fisiopatologia da cronificação diabética.

Para reproduzir características crônicas do DM, foi utilizado no presente estudo o modelo de diabetização com STZ-n. Este modelo é amplamente empregado para avaliar a fisiopatologia da síndrome, visto que o processo de indução diabética é vagaroso e inicialmente com discreta sintomatologia (TAKADA et al., 2007). Em nosso trabalho, o quadro diabético foi confirmado e caracterizado aos 90 dias de idade, sendo que a concentração plasmática de glicose do grupo diabético ( $132,9 \pm 4,790$ ) foi 37 % maior comparada a do controle ( $97,16 \pm 2,454$ ) ( $p < 0,0001$ ; dados não mostrados). Após essa confirmação, os animais foram mantidos até 150 dias de idade e suplementados ou não com óleo de peixe rico em AGPI n-3. Independentemente da cronificação patológica ou

da suplementação com OP, os animais mantiveram os sinais clínicos clássicos que acompanham o DM (Tabela 4).

Os ratos diabetizados, suplementados ou não com OP, apresentaram leve hiperglicemia em comparação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ , D vs. C), juntamente com intolerância glicêmica evidenciada no GTT ( $p < 0,0001$ ; D vs. C; Figura 25 A). Neste aspecto, a suplementação com OP não teve efeito sobre a hiperglicemia ( $p = 0,14$ ; DS vs. D; Tabela 4) e intolerância glicêmica ( $p = 0,99$ ; DS vs. D; Figura 25 B). Tais resultados já foram observados em estudo similar em nosso grupo (MACHADO, 2008) e, portanto, já esperado, uma vez que o OP não exerce efeitos hipoglicemiantes.

A falta de insulina ou a resistência periférica à insulina poderia justificar o resultado encontrado no GTT e a hiperglicemia (SRINIVASAN, 2007b). O lento processo de desenvolvimento da hiperglicemia e intolerância glicêmica são características que se assemelham ao DM humano. Normalmente, a hipoinsulinemia tende a acompanhar esse quadro. Entretanto, nossos animais diabetizados apresentaram leve hiperinsulinemia ( $p = 0,008$ , D vs. C; Tabela 4), corroborando com os achados de Murali (2002). Isso pode ser explicado como um mecanismo contra regulatório para manter a normoglicemia (RATO et al., 2015). Com a cronificação, células  $\beta$ -pancreáticas sobreviventes da diabetização neonatal tornam-se hipertróficas na tentativa de compensar o aumento da glicose circulante. Logo, esses animais apresentam elevada resistência insulínica (demonstrado pelo índice de HOMA-IR elevado) e baixa sensibilidade (índice de QUICK reduzido). Ao todo, as características exibidas dos animais tratados com STZ indicam claramente que uma condição de DM2 foi alcançada nesses ratos.

Outros estudos divergem em relação à insulinemia basal (ASHOKKUMAR; PARI, 2005; TAKADA et al., 2007). Uma possível explicação para tal divergência é a abordagem adotada durante o estudo, como por exemplo a dosagem de STZ e o DPN

utilizado para a indução. Considerando essas variações, o modelo de diabetes induzido por STZ-n, exibe vários estágios do diabetes tipo II, como alteração na tolerância à glicose e aumento moderado ou severo da glicemia (BAIG; PANCHAL, 2019; KESAVARAO; RAGHAVARAO; SURYANARAYANA, 2019)

O *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico é o método padrão ouro para determinar a sensibilidade à insulina (MATTHEWS et al., 1985). No entanto, é invasivo, demorado e pouco prático na experimentação animal. Conseqüentemente, vários métodos indiretos têm sido propostos para estudos experimentais (CALCATERRA et al., 2021). Em particular, medidas substitutas, baseadas em níveis de insulina e glicose em jejum, são ferramentas validadas que simplificam a medição de resistência insulínica e são usadas em estudos epidemiológicos e na prática clínica (CALCATERRA et al., 2021); estes incluem a avaliação do modelo de homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR) (WALLACE; LEVY; MATTHEWS, 2004) e o índice quantitativo de verificação de sensibilidade à insulina (QUICKI) (KATZ et al., 2000).

Em nosso estudo, os animais do grupo D e DS apresentaram valores de HOMA-IR 50% maiores ( $p < 0,0001$ ) e QUICKI 7% menores ( $p < 0,0001$ ; Tabela 4), em relação aos grupos C e S, respectivamente. Entretanto, tanto o HOMA-IR quanto o QUICKI não refletem a sensibilidade dos tecidos periféricos em relação a insulina. De fato, a redução da insulinemia observada no grupo DS ( $p = 0,01$ ; DS vs. D), sugere que a suplementação aumenta a sensibilidade insulínica. Em estudo prévio, nosso grupo teve sucesso em demonstrar que a suplementação prolongada com OP aumentou a sensibilidade sistêmica à insulina em músculo esquelético (HIRABARA et al., 2013) e tecido adiposo (YAMAZAKI et al., 2011).

A disfuncionalidade insulínica é o agente desencadeante da dislipidemia diabética (WU; PARHOFER, 2014), observada aos 150 dias de idade dos animais diabetizados. A

elevação de TG e LDL, constituem fatores de alto risco para DCV nos pacientes diabéticos (JANSSEN; STREET, 2021; SALEH, 2015; SHAH et al., 2015). Os parâmetros lipídicos apresentados por nossos animais diabetizados indicaram hipercolesterolemia e hipertriacilglicerolemia ( $p = 0,03$  e  $p = 0,01$ ; D vs. C; Tabela 4). De fato, a resistência insulínica induz a lipólise, e aumenta a liberação de AGL provenientes do tecido adiposo, que são reabsorvidos pelo fígado (NOLAN; FÆRCH, 2012b; WU; PARHOFER, 2014). Isso justifica nossos achados quanto a redução do tecido adiposo visceral nos animais do grupo D em comparação ao grupo C ( $p < 0$ ). O aumento da incidência de DM2 está diretamente relacionado com mudanças no estilo de vida, como o sedentarismo e dietas com alta proporção de carboidratos refinados e gorduras, principalmente saturadas e trans. Em contradição, é observado que em populações que consomem grande quantidade AGPI n-3, a prevalência de DCV, DM2 e intolerância à glicose é pequena (ZIBAEENEZHAD et al., 2017). Além disso, muitos estudos mostram o efeito protetivo desses ácidos graxos na síndrome diabética (HIRABARA et al., 2013; SOUZA et al., 2020; WANG et al., 2017; YAMAZAKI et al., 2011). Em nossas análises, os animais DS apresentaram diminuição do CT ( $p=0,03$ ), TG ( $p = 0,01$ ) e VLDL ( $p = 0,01$ ), em comparação aos animais do grupo D (Tabela 4).

Os mecanismos de ação do ômega 3 sugeridos para a redução dos TG é a modulação da via de síntese e aumento da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos. AGPI n-3 fazem inibição da enzima diacilglicerol aciltransferase e a supressão da transcrição do gene lipogênico SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein) (CARPENTIER; PORTOIS; MALAISSE, 2006). Isto limita a quantidade de TG disponível para o empacotamento na VLDL, levando a produção de partículas de VLDL pequenas com menos TG (CHAN; WATTS; BARRETT, 2002; GRIFFIN, 2001).

Já o aumento na  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos parece ocorrer pela habilidade dos ácidos graxos n-3 em ativar o receptor- $\alpha$  nuclear ativado pelos proliferadores de peroxissomos (PPAR $\alpha$ ) que aumentam a expressão gênica de enzimas envolvidas na via de oxidação dos ácidos graxos (CARPENTIER; PORTOIS; MALAISSE, 2006; CHAN; WATTS; BARRETT, 2002; GRIFFIN, 2001).

O aumento do risco cardiovascular em pacientes resistentes à insulina é caracterizado por concentrações elevadas de VLDL, acompanhados por aumento da aterogenicidade (SOUZA et al., 2020). Normalmente, a rastreabilidade de DCV no meio clínico, é realizado por meios indiretos para avaliação de risco do desenvolvimento de doenças ateroscleróticas, como o índice de Castelli 1 (IC1) e 2 (IC2) (BELALCAZAR et al., 2013; BHARDWAJ et al., 2020). Neste aspecto, os animais do grupo D exibiram maiores índices de IC1 ( $p < 0,0001$ ; Tabela 4). A suplementação com OP aos animais diabetizados (DS) reduziu o IC1 e IC2 ( $p < 0,0001$ ) em comparação ao grupo D, bem como o IC2 comparado aos animais do grupo S ( $p = 0,02$ ; S vs. C; Tabela 4). A redução na concentração plasmática do colesterol total nos animais diabetizados suplementados com OP também é importante resultado do nosso estudo, uma vez que a hipercolesterolemia está envolvida no aumento da expressão de moléculas de adesão e, conseqüentemente, aumento da adesão de monócitos no endotélio vascular, os quais atuam no processo aterogênico (STEINBERG, 2002).

Embora os fatores de risco clássicos já tenham seu papel estabelecido no contexto das doenças metabólicas, diversas condições emergentes, como a dos biomarcadores do processo inflamatório, ainda não estão definitivamente entendidas. Adicionalmente, a insulina desempenha importante papel anti-inflamatório frente ao estado hiperglicêmico sustentado (SUN; LI; GAO, 2014). Dentre todas as citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a cronificação do DM2, a IL-6 é exibida em concentrações

plasmáticas relativamente altas, tendo grande importância sistêmica, e considerada como mal prognóstico evolutivo (KERN et al., 2001; SUN; LI; GAO, 2014). Em contrapartida, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que age como modulador endógeno em diversos tecidos e em diferentes contextos fisiológicos. *In vivo*, sua elevada concentração plasmática, está diretamente relacionada a melhor ação insulínica em músculo esquelético e fígado (CINTRA et al., 2008).

A inflamação crônica mediada por macrófagos é considerada marca registrada da resistência à insulina, e os AGPI n-3 exibem efeitos anti-inflamatórios, por inibirem as vias inflamatórias pelo TNF- $\alpha$  e receptores Toll-Like (TLR). Os TLR são capazes de ativar a via do NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, atuam na produção de citocinas inflamatórias. Os AGs saturados atuam na ativação enquanto os AGPI n-3 inibem os receptores TLR-2 e TLR-4 (LEE et al., 2004). Essa ação pode reduzir a expressão de genes pró-inflamatórios e aumentando a expressão de genes anti-inflamatórios no tecido adiposo (LALIA; LANZA, 2016).

Em nossos animais não observamos modificações nas concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-10 entre as variáveis de condição diabética sem ou com suplementação com OP (Tabela 4). Considerando que o tecido adiposo contribui com aproximadamente 1/3 da concentração circulante de IL-6 (KERN et al., 2001), e que o modelo empregado no presente estudo não induziu a obesidade (SRINIVASAN, 2007; TAKADA et al., 2007), o resultado encontrado pode ser assim explicado. Ainda, o tempo de cronificação diabética, bem como o de suplementação com OP podem ter sido insuficientes para eventuais modificações plasmáticas. Contudo, esses resultados não invalidam uma possível modulação tecidual, como os relatados por Eguchi e colaboradores (2011), em seus estudos sobre RI e seus efeitos sobre tecido adiposo e hepático. Neste estudo, os autores demonstraram que a suplementação com OP preveniu o aumento de IL-6 em

tecido adiposo e hepático de animais com RI desencadeada por estresse. Contudo, não houve diferença entre as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-10 (EGUCHI et al., 2011).

Paralelamente as alterações metabólicas em órgãos periféricos, o desequilíbrio glicêmico-insulinêmico é associado a disfunções cognitivas de aprendizagem e memória (KIM, 2019), sendo identificadas como déficit cognitivo. Dentre as modificações neuroestruturais causadas pelo DM experimental em roedores, destacam-se a morte neuronal em córtex frontal e hipocampo (JING et al., 2013), além da desmielinização e degeneração axonal estriatal e cortical (HUANG et al., 2012). Apesar de existirem divergências quanto ao real dano cognitivo relacionado a encefalopatia diabética (ED), é bem estabelecido o comprometimento da funcionalidade hipocampal frente ao desequilíbrio do metabolismo de carboidratos e lipídeos.

A cronificação do diabetes, assim como o nível de hiperglicemia influenciam diretamente no fenótipo comportamental (AHMED; ELGHARABAWY; AL-NAJJAR, 2017; KISS et al., 2013). Um estudo avaliando a cognição de ratos em 3, 6 e 9 semanas após a confirmação diabética demonstrou que a hiperglicemia moderada prejudica inicialmente a memória de trabalho, seguida da memória de referência e aprendizado (AHMED et al., 2019b). Para verificar eventuais dados esporádicos decorrentes do processo de crônificação diabética, bem como efeitos potenciais do OP sobre tais danos, nossos animais foram submetidos ao teste HBm. Como neste teste as recompensas podem ser encontradas em um subconjunto de locais potenciais, tanto a memória de trabalho, quanto a memória de referência pode ser avaliada simultaneamente (GORDAN et al., 2012; LABOTS et al., 2015b; OHL; HOLSBOER; LANDGRAF, 2001).

A formação de memória envolve processos distintos, sendo a aprendizagem a etapa primária desse processo. Em nosso estudo, a diabetização parece interferir no processo de aquisição de memória, visto que o grupo D exibe aumento de erros por

escolha de cilindros revisitados (memória de trabalho) e de cilindros sem recompensa (memória de referência). Porém essas variáveis não são diferentes do grupo C no terceiro dia (Figura 22 C), sugerindo que mesmo diabetizados são capazes de aprender a tarefa e a localização da recompensa. Já no processo de evocação (dia 4), fase em que a memória é testada, o grupo D apresentou resultados similares aos do dia 2, indicando um possível déficit na consolidação da memória de curto e longo prazo desses animais (Tabela 2).

Com base nos resultados supracitados, uma possível correlação entre a RI e consolidação da memória pode ser traçada, uma vez que a administração de glicose intra-hipocampal desencadeia efeitos similares aos da insulina intra-hipocampal (KOBILLO; YUAN; VAN PRAAG, 2011; MCNAY et al., 2010), sendo a melhora da aprendizagem um desses efeitos (MESSIER, 2004). Apesar de pouco compreendido, tem sido sugerido que a insulina pode exercer efeitos no SNC, uma vez que neurônios expressam tanto receptores de insulina quanto transportadores GLUT 4 (GRILLO et al., 2009b; PIROLI et al., 2007). Alguns autores relatam que células piramidais do hipocampo apresentam alta expressão de transportadores GLUT 4 (ALQUIER et al., 2001; CHOEIRI; STAINES; MESSIER, 2002), e a translocação destes ocorre via estimulação de várias isoformas de proteínas quinase, incluindo proteína quinase C (PKC), PI<sub>3</sub>K e Ca<sup>2+</sup>/calmodulina quinase II (Ca<sup>2+</sup>/CaM) (CHEN et al., 2005; SACKTOR et al., 1993; SMITH et al., 2008; THAI et al., 1998). Essas proteínas são necessárias para a formação de memória hipocampo-dependente, sugerindo, que a ativação de GLUT 4 deve ocorrer durante esse processo (HEIDA et al., 2009; NIJHOLT et al., 2008; SHEMA; SACKTOR; DUDAI, 2007), agindo como um facilitador para o fornecimento de energia sob demanda (MCNAY; PEARSON-LEARY, 2020).

Pearson-Leary e colaboradores (2018) demonstraram o envolvimento de transportadores GLUT 4 na formação de memória hipocampo-dependente. Os

pesquisadores observaram aumento na expressão de GLUT 4 no hipocampo de camundongos após o teste de memória de trabalho espacial. A inibição intra-hipocampal aguda e seletiva do transportador GLUT 4 prejudicou a aquisição da memória, mas não a recuperação da memória (PEARSON-LEARY; JAHAGIRDAR; SAGE, 2018). Por outro lado, o bloqueio prolongado do transporte de glicose via GLUT4 no hipocampo, mediado por insulina preveniu a depleção glicolítica associada à tarefa e melhorou a memória de trabalho e de curto prazo, além de prejudicar a memória de longo prazo. Esses efeitos foram acompanhados pelo aumento da expressão das subunidades AMPA (subunidade GluR1) hipocampal e do GLUT3 neuronal, mas diminuição da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), consistente com a capacidade prejudicada de formar memórias de longo prazo (PEARSON-LEARY; MCNAY, 2016).

Muitos estudos correlacionaram os efeitos nutracêuticos da suplementação com OP a melhora do desempenho cognitivo (KIDD, 2007). A composição das membranas celulares exerce efeitos consideráveis sobre proteínas ali presentes (tais como enzimas e receptores), e evidências robustas tem demonstrado que a estrutura da membrana desempenha papel significativo em patologias envolvendo a redução da capacidade cognitiva (RAPOPORT; RAMADAN; BASSELIN, 2011). A membrana celular é altamente dependente da incorporação de tipos particulares de ácidos graxos, principalmente o DHA (KIDD, 2007). O DHA, por sua vez, é o principal componente lipídico das membranas neuronais, sendo associado a desenvolvimento celular, melhorar o aprendizado e a memória e prevenir doenças neurodegenerativas (KERDILES; LAYÉ; CALON, 2017; MOZAFFARIAN; RIMM, 2006; ZHANG et al., 2019).

Díaz-Gerevini e colaboradores (2019), demonstraram melhora na performance comportamental frente ao declínio cognitivo decorrentes da ED. Utilizando um modelo animal de diabetes espontâneo (eSS), os autores correlacionaram os resultados

encontrados à suplementação com OP e redução do estresse oxidativo (DÍAZ-GEREVINI et al., 2019b). Em nosso experimento os animais suplementados com OP exibiram resultados vinculados a presença ou ausência de diabetização. O grupo DS apresentou desempenho cognitivo similar ao grupo D durante a aprendizagem, com aparente redução do número de cilindros revisitados e errados no dia 3 (Figura 24 A - C). Conduto, na fase de teste seus resultados foram semelhantes ao grupo D (Figura 24 D, Tabela 2). Diferentemente de estudos anteriores (ALVAREZ-NÖLTING et al., 2012; ARNAL et al., 2010; DÍAZ-GEREVINI et al., 2019b), a suplementação com OP em nossos animais não teve efeito na restauração da integridade cognitiva do quadro de ED.

A fisiopatologia diabética direciona o metabolismo celular sistêmico a um estado de alta reatividade oxidativa (MATOUGH et al., 2012), compartilhado por ambos os tipos de DM (HASKINS et al., 2003; RÖSEN et al., 2001). Mudanças no equilíbrio redox, diminuição das concentrações teciduais de antioxidantes (como glutathione reduzida) e atividades prejudicadas de enzimas de defesa antioxidantes, são consideradas algumas das fontes de EROS no DM (HASKINS et al., 2003). Quanto a isto, nossos resultados corroboram com a literatura, visto que animais diabetizados apresentaram desequilíbrio oxidativo em regiões de diencefalo e telencefalo (Figura 27).

Alto nível de peroxidação lipídica foi encontrado em pacientes diabéticos (BONNEFONT-ROUSSELOT; BASTARD, 2000; ROBERTSON, 2004). A peroxidação dos lipídios (LPO) da membrana prejudica seriamente as funções da membrana e perturba o receptor do gradiente iônico e as funções de transporte, resultando em disfunções celulares (FRANCO; BORTNER; CIDLOWSKI, 2006; NOHL, 1993). Animais do grupo S apresentam uma tendência a redução das taxas de LPO em comparação ao grupo C (Figura 28 B). Entretanto, observamos efeito oposto a este no grupo DS. Ácidos graxos poli-insaturados são altamente vulneráveis à ação de radicais

lives, devido à presença de insaturações ao longo de sua cadeia molecular, favorecendo a LPO (MATOUGH et al., 2012; SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2008).

Outra característica importante observada em nossos animais é o aumento da concentração de NP-HS, sendo que o tiol intracelular mais abundante é a glutatona reduzida (GSH). O aumento de NP-SH pode ser indicativo de uma redução do seu consumo, sugerindo uma possível redução da atividade das enzimas antioxidantes GST e GPx em zonas telencefálicas de animais diabéticos (Figura 28 A). Uma vez instado o desequilíbrio oxidativo, a suplementação foi incapaz de reverter esse processo. Surpreendentemente, animais do grupo S apresentaram concentrações de NP-SH equivalentes ao grupo D e DS. Apesar de contraditório, nosso grupo de pesquisa obteve resultados semelhantes em tecido adiposo de animais suplementados com dose superecomendada de OP (ZAZULA, 2021). Visto que o encéfalo, assim como o tecido adiposo, apresenta elevadas concentrações lipídicas em sua composição, podemos sugerir que o aumento de NP-SH pode estar relacionado às características pró-inflamatórias estabelecidas em virtude da idade dos animais ou tempo de suplementação.

Adicionalmente, o aumento da atividade da colinesterase total (ChE) nos animais diabéticos pode indicar um efeito frequentemente observado em encéfalos de animais diabéticos e com DA, que é a diminuição da concentração de acetilcolina (ACh) (RIVERA et al., 2005a; SOREQ; SEIDMAN, 2001). O encéfalo saudável possui elevadas concentrações de colinesterase, sendo a acetilcolinesterase (AChE) a isoforma mais abundante (SUSSMAN; BON; SILMAN, 1993). Curiosamente, a ACh é um neurotransmissor associado ao aprendizado e à memória, e pode variar de acordo com alguns insultos ao SNC, incluindo estresse oxidativo (WILKINSON et al., 2012). Ainda, prejuízos na sinalização de insulina e IGF-1 causam deficiências cerebrais na biossíntese de ACh (RIVERA et al., 2005a; WILKINSON et al., 2012). A insulina e o IGF-I podem

estimular a expressão gênica da colina acetiltransferase (ChAT), sendo que esta encontra-se prejudicada nos estágios iniciais da DA (RIVERA et al., 2005a; WILKINSON et al., 2012). Portanto, anormalidades associadas à sinalização de insulina e de IGF-I no cérebro podem estar ligadas ao comprometimento cognitivo no DM2 crônico (KUHAD; SETHI; CHOPRA, 2008).

A flexibilidade cognitiva, ou seja, a capacidade de mudar rapidamente o comportamento diante de circunstâncias modificadas, é interrompida em muitos distúrbios psiquiátricos e neurológicos (IZQUIERDO et al., 2017). A aprendizagem reversa requer que um sujeito ajuste de forma flexível seu comportamento quando as contingências relacionadas à recompensa que eles aprenderam anteriormente são revertidas (CORDNER; TAMASHIRO, 2015; HARDUNG; JÄCKEL; DIESTER, 2021). Em nossa pesquisa os animais não apresentaram diferenças significativas no teste reverso (Tabela 3), entretanto observamos a propensão dos animais suplementados com OP a exibir menor número de erros relacionados a memória explícita (Figura 23 e 24 E).

A composição lipídica da membrana neuronal pode variar em relação sua a localização. Em virtude de suas propriedades biofísicas, maiores concentrações de DHA são encontrados na membrana sináptica (NALIWAIKO, 2009). O DHA atua como modulador do receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA), que quando ativado, induz a potenciação de longa duração (LTP), sendo este a base da formação da memória. Ainda, receptores NMDA se relacionam com fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) e a via do receptor de tirosina quinase B (TrkB) para aumentar a plasticidade sináptica. Portanto, observando os resultados dos animais suplementados com OP no teste reverso, podemos correlacionar a maior flexibilidade cognitiva desses animais em relação aos grupos não suplementados.

Tanto a carência de AGPI quanto a hiperglicemia decorrente da RI, podem promover alterações no comportamento exploratório, locomotor e cognitivo de roedores em diferentes abordagens comportamentais (DÍAZ-GEREVINI et al., 2019b). A hiperatividade e aumento de comportamentos exploratório é frequentemente observado em animais diabéticos e, geralmente esta relacionado a forrageamento e ingestão alimentar elevados (REBOLLEDO-SOLLEIRO et al., 2013). Apesar de observamos a tendência ao aumento de parâmetros exploratórios diretos e indiretos nos animais do grupo diabetizados (Figura 22), não houve diferenças significativas entre os grupos C e D (Figura 14 B, 15 B, 16 B, 17 B). Possivelmente, a ausência de resultados proeminentes a esse respeito seja em virtude do modelo de diabetização empregado, visto que nossos animais são normofágicos (Figura 26).

Por outro lado, a redução do comportamento exploratório (*edge-sniff* e *rearing*) nos animais do grupo L (Figura 15 e 16 ), pode indicar redução da capacidade olfatória, visto que o modelo utilizado no presente estudo é oriundo de lesão citotóxica em células hipocâmpicas e pode apresentar comportamentos semelhantes aos de outros modelos de DA (GRIEB, 2016; SONG et al., 2014), além disso, a redução da olfação diminui aspectos motivacionais nos animais. Já o aumento no tempo de permanência no centro do aparato sugere alterações na manifestação de comportamentos límbicos e de preservação (Figura 24 B). A memória emocional apresenta aspectos evolutivos importantes que visam a sobrevivência (ATES et al., 2014; PACKARD, 2009). Neste contexto, o grupo L exibiu comportamentos que sugerem maior vulnerabilidade, diferentemente dos animais controle e diabetizados (Figura 24 D).

Tradicionalmente, testes de aprendizagem utilizam o tempo para o término de uma tarefa (latência) como uma medida inversamente proporcional a performance cognitiva. Assim, a medida que aprendem ao longo do intervalo experimental, os animais

tendem a reduzir o tempo para a conclusão da tarefa ao longo dos dias de teste (BEILHARZ; MANIAM; MORRIS, 2016; GORDAN et al., 2012). Suspreendentemente, os grupos expostos à STZ (via i.c.v ou i.p em período neonatal) apresentaram menores tempo de performance no dia 1, 2 e 4 (Figura 27 A; Figura 28 A, B e D), sendo que este parâmetro não foi modificado pela suplementação com OP (Figura 30). Neste sentido, sugere-se a existência de vias alternativas para a execução da tarefa, podendo dois fatores participarem desta modulação: : a sobrecarga gerada na memória de trabalho e estratégias de busca.

A variação individual na velocidade de execução, pode sobrecarregar a memória de trabalho de um indivíduo. Considerando que o mHB é um teste de discriminação espacial de escolha livre (ou seja, recompensas são encontradas em diferentes locais e o animal pode explorar livremente), o tempo de espera pode variar entre as tentativas. Logo, o período em que os animais devem manter a lista de locais já visitados na memória de trabalho também é variável (VAN DER STAAY et al., 2012). Assim, animais mais “lentos” precisam reter as informações na memória de trabalho por mais tempo, para não terem seu desempenho prejudicado. Dessa maneira, o tempo para conclusão de uma tarefa não pode ser considerado como uma medida isolada de performance real.

Roedores usam diferentes estratégias de busca na resolução de tarefas espaciais, podendo ser espacial, serial ou randômica (HALEY; RABER, 2011). Quando um animal aprende a tarefa e é capaz de formar um mapa cognitivo, a estratégia de busca espacial pode ser empregada (EICHENBAUM, 2015). Como resultado, observa-se que o animal busca diretamente o local aprendido. Em contraste, se o animal não estabeleceu um mapa de localização, mas aprendeu a tarefa, ele pode usar a busca serial, ou seja, o animal busca em cada local em ordem consecutiva até o local sinalizado ser encontrado . Já na busca randômica, não há padrão de busca (CASTAÑÉ ANNA; THEOBALD; ROBBINS, 2010;

INMAN-WOOD; WILLIAMS, 2000; LOCKLEAR; KRITZER, 2014) . Adotando uma estratégia de busca animais são capazes de compensar os deficits induzidos experimentalmente, sem o envolvimento da memória espacial (VAN DER STAAY et al., 2012). Portanto a redução do tempo de performance em animais L no dia 1, 4 e 5 (Figura 28 A, D e E), pode refletir melhor resultado por compensação e não reflete aprendizado propriamente.

Estruturas corticais, assim como as hipocampais, desempenham importante papel em vias cognitivas pertencentes a memória de reconhecimento (MCCRIMMON; RYAN; FRIER, 2012). Resultados de vários estudos, envolvendo diferentes graus de lesão encefálica, indicam que o hipocampo parece estar envolvido em testes que englobam a recordação espacial de um objeto, e o córtex pré-frontal e perirrinal estão mais envolvidos na preferência por novos objetos (BARKER; NEUROSCIENCE; 2011, 2011; BUSSEY et al., 1998, 2000; HAMED, 2017; MUMBY; PINEL, 1994). Esse teste se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido (HAMED, 2017).

Em nossa abordagem, os animais pertencentes ao grupos D e L apresentaram comprometimento da discriminação não espacial, evidenciado pela igualdade na exploração entre os objetos familiar e novo no dia 1 (Figura 18 A), e pelo aumento da exploração do objeto familiar nos animais do grupo L (Figura 18 C). Diante desses resultados, a suplementação parece não exercer efeitos nos animais do grupo S, sendo que os resultados foram similares aos do grupo C. Já os animais DS aumentaram a exploração do objeto novo no dia 5 (figura 19 D), demonstrando que danos a memória de trabalho não espacial, também não foram modificadas diante da suplementação com OP.

## 7 CONCLUSÃO

O modelo de diabetização em período neonatal mostrou-se válido para mimetizar aspectos tempo-dependentes do DM2, sem haver modificações significativas no acréscimo de massa, consumo alimentar e hídrico, e volume urinário e fecal, ao longo do tempo. Aos 150 dias de idade, os animais diabetizados exibiram o fenótipo clássico de resistência insulínica, acompanhada de hiperinsulinemia e hiperglicemia. Adicionalmente, esses sintomas foram associados a dislipidemia, maior risco de desenvolvimento de doenças ateroscleróticas e redução do tecido adiposo. A suplementação com OP foi eficiente em reduzir a concentração dos lipídeos plasmáticos, bem como retornar a insulinemia a concentrações normais. Apesar de não haver diferença nas concentrações plasmáticas de IL-6 e IL-10, animais diabetizados apresentaram prejuízo na memória declarativa e de trabalho, além de aumentar os indicadores de danos oxidativos. A suplementação com OP aumentou a flexibilidade cognitiva dos animais, contudo, foi ineficiente diante do déficit de aprendizagem e contenção dos danos oxidativos em região de telencéfalo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. et al. Time-dependent impairments in learning and memory in Streptozotocin-induced hyperglycemic rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 5, p. 1431–1446, 1 out. 2019.

AHMED, A. S.; ELGHARABAWY, R. M.; AL-NAJJAR, A. H. Ameliorating effect of anti-Alzheimer's drugs on the bidirectional association between type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. **Experimental Biology and medicine**, v. 242, n. 13, p. 1335–1344, 2017.

ALLEN, K. V.; FRIER, B. M.; STRACHAN, M. W. J. The relationship between type 2 diabetes and cognitive dysfunction: Longitudinal studies and their methodological limitations. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, n. 1–3, p. 169–175, 19 abr. 2004.

ALQUIER, T. et al. Altered Glut4 mRNA levels in specific brain areas of hyperglycemic-hyperinsulinemic rats. **Neuroscience Letters**, v. 308, n. 2, p. 75–78, 1 ago. 2001.

ALVAREZ-NÖLTING, R. et al. Protection by DHA of early hippocampal changes in diabetes: Possible role of CREB and NF- $\kappa$ B. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 1, p. 105–115, 11 jan. 2012.

ANDREWS, P.; JOHNSON, R. J. Evolutionary basis for the human diet: consequences for human health. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, n. 3, p. 226–237, 1 mar. 2020.

ARNAL, E. et al. Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 166, n. 1, p. 271–278, 10 mar. 2010.

ASHOKKUMAR, N.; PARI, L. Effect of N-benzoyl-d-phenylalanine and metformin on carbohydrate metabolic enzymes in neonatal streptozotocin diabetic rats. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, n. 1–2, p. 105–113, 1 jan. 2005.

ATES, M. et al. Anxiety- and depression-like behavior are correlated with leptin and leptin receptor expression in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. <http://dx.doi.org/10.3109/10520295.2013.825319>, v. 89, n. 3, p. 161–171, 2014.

BAGLIETTO-VARGAS, D. et al. Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 64, p. 272–287, 2016.

BAIG, M. A.; PANCHAL, S. S. Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Neonatal Rats: An Insight into its Applications to Induce Diabetic Complications. **Current Diabetes Reviews**, v. 16, n. 1, p. 26–39, 11 abr. 2019.

BARDINI, G.; ROTELLA, C. M.; GIANNINI, S. Dyslipidemia and diabetes: reciprocal impact of impaired lipid metabolism and Beta-cell dysfunction on micro- and macrovascular complications. **The review of diabetic studies : RDS**, v. 9, n. 2–3, p. 82–93, 2012.

BARKER, G.; NEUROSCIENCE, E. W.-J. OF; 2011, UNDEFINED. When is the hippocampus involved in recognition memory? **Soc Neuroscience**, 2011.

BARONE, E. et al. Brain Insulin Resistance and Hippocampal Plasticity: Mechanisms and Biomarkers of Cognitive Decline. 2019.

BAYS, H. et al. Adiposopathy: treating pathogenic adipose tissue to reduce cardiovascular disease risk. **Current treatment options in cardiovascular medicine**, v. 9, n. 4, p. 259–271, 2007.

BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Short-term exposure to a diet high in fat and sugar, or liquid sugar, selectively impairs hippocampal-dependent memory, with differential impacts on inflammation. **Behavioural Brain Research**, v. 306, p. 1–7, 1 jun. 2016.

BELALCAZAR, S. et al. Conventional biomarkers for cardiovascular risks and their correlation with the castelli risk index-indices and TG/HDL-c. **revistasum.umanizales.edu.co**, p. 14–26, 2013.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **The Journal of endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527–528, 1968.

BHARDWAJ, S. et al. ATHEROGENIC INDEX OF PLASMA, CASTELLI RISK INDEX AND ATHEROGENIC COEFFICIENT-NEW PARAMETERS IN ASSESSING CARDIOVASCULAR RISK. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, p. 2230–7605, 2020.

BIESSELS, G. J.; DESPA, F. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 14, n. 10, p. 591–604, 1 out. 2018.

BIESSELS, G. J.; GISPEN, W. H. The impact of diabetes on cognition: What can be learned from rodent models? **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. SUPPL., p. 36–41, 2005.

BIOBAKU, F. et al. Macronutrient-Mediated Inflammation and Oxidative Stress: Relevance to Insulin Resistance, Obesity, and Atherogenesis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 104, n. 12, p. 6118–6128, 1 dez. 2019.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; BASTARD, J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. **Diabetes & Metabolism**, 2000.

BORKMAN, M. et al. The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. **The New England journal of medicine**, v. 328, n. 4, p. 238–244, 28 jan. 1993.

BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Introduction to Fatty Acids and Lipids. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 112, p. 1–16, 2015.

BUSSEY, T. et al. Functionally dissociating aspects of event memory: the effects of combined perirhinal and postrhinal cortex lesions on object and place memory in the rat. **Soc Neuroscience**, 1998.

BUSSEY, T. et al. Distinct patterns of behavioural impairments resulting from fornix transection or neurotoxic lesions of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. **Elsevier**, v. 111, p. 187–202, 2000.

CALCATERRA, V. et al. Sex-Specific Differences in the Relationship between Insulin Resistance and Adiposity Indexes in Children and Adolescents with Obesity. **Children** **2021, Vol. 8, Page 449**, v. 8, n. 6, p. 449, 26 maio 2021.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1851, n. 4, p. 469–484, 2015.

CARPENTIER, Y.; PORTOIS, L.; MALAISSE, W. J. n- 3 Fatty acids and the metabolic syndrome. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2006.

- CASTAÑÉ ANNA, A.; THEOBALD, D. E. H.; ROBBINS, T. W. Selective lesions of the dorsomedial striatum impair serial spatial reversal learning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 1, p. 74–83, 26 jun. 2010.
- CHAN, D.; WATTS, G.; BARRETT, P. Regulatory effects of HMG CoA reductase inhibitor and fish oils on apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant obese male subjects with dyslipidemia. **Diabetes**, 2002.
- CHAYTOR, N. S. Cognition in Adults and Older Adults With Type 1 Diabetes: Chicken or Egg? **Diabetes Spectrum**, v. 29, n. 4, p. 219–224, 1 nov. 2016.
- CHEN, X. et al. PI3 kinase signaling is required for retrieval and extinction of contextual memory. **Nature Neuroscience** 2005 8:7, v. 8, n. 7, p. 925–931, 5 jun. 2005.
- CHOEIRI, C.; STAINES, W.; MESSIER, C. Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. **Neuroscience**, v. 111, n. 1, p. 19–34, 22 abr. 2002.
- CHOLERTON, B.; BAKER, L. D.; CRAFT, S. Insulin, cognition, and dementia. **European Journal of Pharmacology**, v. 719, n. 1–3, p. 170–179, 2013.
- CHRISTI, W. W.; HARWOO, J. L. Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 401, 2020.
- CINTRA, D. E. et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 4, p. 628–637, 1 abr. 2008.
- CORDNER, Z. A.; TAMASHIRO, K. L. K. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. **Physiology & Behavior**, v. 152, p. 363–371, 1 dez. 2015.
- COSTA, A. F. et al. Carga do diabetes mellitus tipo 2 no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 2, 2017.
- CURI, R. et al. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002.
- DE CARVALHO, C. C. C. R.; CARAMUJO, M. J. The Various Roles of Fatty Acids. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 10, 9 out. 2018.

DE LA MONTE, S. M. et al. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 10, p. 89–109, 2006.

DÍAZ-GEREVINI, G. T. et al. Diabetic encephalopathy: beneficial effects of supplementation with fatty acids  $\omega$  3 and nordihydroguaiaretic acid in a spontaneous diabetes rat model. v. 7, p. 1–15, 2019a.

DÍAZ-GEREVINI, G. T. et al. Diabetic encephalopathy: Beneficial effects of supplementation with fatty acids  $\omega$ 3 and nordihydroguaiaretic acid in a spontaneous diabetes rat model. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 1, 8 fev. 2019b.

DU, X. et al. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 4, p. 1071–1080, 1 abr. 2006.

DURING, M. J. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. **Nature Medicine** 2003 9:9, v. 9, n. 9, p. 1173–1179, 17 ago. 2003.

EGUCHI, R. et al. Fish oil consumption prevents glucose intolerance and hypercorticotesteronemia in footshock-stressed rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 11 maio 2011.

EICHENBAUM, H. The Hippocampus as a Cognitive Map ... of Social Space. **Neuron**, v. 87, n. 1, p. 9–11, 1 jul. 2015.

FAROOQUI, A. A. Lipid Mediators in the Neural Cell Nucleus: Their Metabolism, Signaling, and Association with Neurological Disorders. <http://dx.doi.org/10.1177/1073858409337035>, v. 15, n. 4, p. 392–407, 7 ago. 2009.

FRANCO, R.; BORTNER, C. D.; CIDLOWSKI, J. A. Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis. **Journal of Membrane Biology**, v. 209, n. 1, p. 43–58, 17 jan. 2006.

GORDAN, M. L. et al. Evaluation of neurobehavioral deficits following different severities of cerebral ischemia in rats: A comparison between the modified hole board test and the Morris water maze test. **Behavioural Brain Research**, v. 235, n. 1, p. 7–20, 1 nov. 2012.

- GRIEB, P. Intracerebroventricular Streptozotocin Injections as a Model of Alzheimer's Disease: in Search of a Relevant Mechanism. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1741–1752, 2016.
- GRIFFIN, B. A. The effect of n-3 fatty acids on low density lipoprotein subfractions. **Lipids**, v. 36, n. SUPPL., 2001.
- GRILLO, C. A. et al. INSULIN-STIMULATED TRANSLOCATION OF GLUT4 TO THE PLASMA MEMBRANE IN RAT HIPPOCAMPUS IS PI3-KINASE DEPENDENT. **Brain Res**, v. 1296, p. 35–45, 2009a.
- GRILLO, C. A. et al. Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. **Brain Research**, v. 1296, p. 35–45, 16 out. 2009b.
- HALEY, G. E.; RABER, J. Spatial learning and memory in animal models and humans. **Neuromethods**, v. 50, p. 91–109, 2011.
- HAMED, S. A. Brain injury with diabetes mellitus: evidence, mechanisms and treatment implications. <https://doi.org/10.1080/17512433.2017.1293521>, v. 10, n. 4, p. 409–428, 3 abr. 2017.
- HARDUNG, S.; JÄCKEL, Z.; DIESTER, I. Prefrontal contributions to action control in rodents. **International Review of Neurobiology**, v. 158, p. 373–393, 1 jan. 2021.
- HASKINS, K. et al. Oxidative stress in type 1 diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1005, p. 43–54, 2003.
- HEIDA, J. G. et al. Separating kindling and LTP: Lessons from studies of PKM zeta in developing and adult rats. **Neuroscience Letters**, v. 453, n. 3, p. 229–232, 10 abr. 2009.
- HIRABARA, S. M. et al. Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1136–1145, 1 jun. 2013.
- HUANG, M. et al. Abnormalities in the brain of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats revealed by diffusion tensor imaging. **NeuroImage: Clinical**, 2012.

INMAN-WOOD, S.; WILLIAMS, M. Effects of prenatal cocaine on Morris and Barnes maze tests of spatial learning and memory in the offspring of C57BL/6J mice. **Neurotoxicol Teratol**, 2000.

INNIS, S. M. Brain astrocyte synthesis of docosahexaenoic acid from n-3 fatty acids is limited at the elongation of docosapentaenoic acid. **The Journal of Lipid Research**, v. 43, p. 1529–1536, 2002.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Prevalence. Em: **IDF Diabetes Atlas**. 9. ed. [s.l: s.n.].

IZQUIERDO, A. et al. The neural basis of reversal learning: An updated perspective. **Neuroscience**, v. 345, p. 12, 3 mar. 2017.

JANSSEN, J. A. M. J. L.; STREET, E. Hyperinsulinemia and Its Pivotal Role in Aging, Obesity, Type 2 Diabetes, Cardiovascular Disease and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 7797**, v. 22, n. 15, p. 7797, 21 jul. 2021.

JING, Y. et al. Neurodegeneration in streptozotocin-induced diabetic rats is attenuated by treatment with resveratrol. **Neuroendocrinology**, 2013.

KALIANNAN, K. et al. Multi-omic analysis in transgenic mice implicates omega-6/omega-3 fatty acid imbalance as a risk factor for chronic disease. **Communications Biology 2019 2:1**, v. 2, n. 1, p. 1–18, 26 jul. 2019.

KATZ, A. et al. **Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans****The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Printed**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article/85/7/2402/2851441>>.

KERDILES, O.; LAYÉ, S.; CALON, F. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and brain health: Preclinical evidence for the prevention of neurodegenerative diseases. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 203–213, 1 nov. 2017.

KERN, P. A. et al. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 5 43-5, p. 745–751, 2001.

KESAVARAO, K. S.; RAGHAVARAO, T.; SURYANARAYANA, P. **MODULATION OF THE PLASMA GLUCOSE, INSULIN AND LIPID PROFILE**

**LEVELS OF NEONATAL STREPTOZOTOCIN (NSTZ) INDUCED PRE-DIABETIC RATS BY BITTER GOURD (MOMORDICA CHARANTICA).** [s.l: s.n.].

KIDD, P. M. Omega-3 DHA and EPA for Cognition, Behavior, and Mood: Clinical Findings and Structural-Functional Synergies with Cell Membrane Phospholipids. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 207–227, 2007.

KIM, H. Cognitive dysfunctions in individuals with diabetes mellitus. v. 36, n. 3, p. 183–191, 2019a.

KIM, H.-G. Cognitive dysfunctions in individuals with diabetes mellitus. **Yeungnam University Journal of Medicine**, v. 36, n. 3, p. 183–191, 30 set. 2019b.

KISS, A. C. I. et al. Neonatally induced mild diabetes: Influence on development, behavior and reproductive function of female Wistar rats. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2013.

KOBILO, T.; YUAN, C.; VAN PRAAG, H. Endurance factors improve hippocampal neurogenesis and spatial memory in mice. **Learning & Memory**, v. 18, n. 2, p. 103–107, 1 fev. 2011.

KOOIJ, M. A. VAN DER et al. Neurobiology of Disease NF- $\kappa$ B inhibition after neonatal cerebral hypoxia – ischemia improves long-term motor and cognitive outcome in rats. **Neurobiology of Disease**, v. 38, n. 2, p. 266–272, 2010.

KUHAD, A.; SETHI, R.; CHOPRA, K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. **Life Sciences**, v. 83, n. 3–4, p. 128–134, 18 jul. 2008.

LABOTS, M. et al. The Modified Hole Board - Measuring Behavior, Cognition and Social Interaction in Mice and Rats. **Journal of Visualized Experiments**, v. 98, n. April, p. 1–7, 2015a.

LABOTS, M. et al. The modified hole board - Measuring behavior, cognition and social interaction in mice and rats. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 98, 8 abr. 2015b.

LAI, N. et al. Mitochondrial Utilization of Competing Fuels Is Altered in Insulin Resistant Skeletal Muscle of Non-obese Rats (Goto-Kakizaki). **Frontiers in physiology**, v. 11, 16 jun. 2020.

LALIA, A. Z.; LANZA, I. R. Insulin-Sensitizing Effects of Omega-3 Fatty Acids: Lost in Translation? **Nutrients**, 2016.

LEE, J. Y. et al. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 17, p. 16971–16979, 23 abr. 2004.

LICHTENSTEIN, A. H.; SCHWAB, U. S. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. **Atherosclerosis**, v. 150, n. 2, p. 227–243, jun. 2000.

LOCKLEAR, M. N.; KRITZER, M. F. Assessment of the effects of sex and sex hormones on spatial cognition in adult rats using the Barnes maze. **Hormones and Behavior**, v. 66, n. 2, p. 298–308, 1 jul. 2014.

LOMBARDO, Y. B.; CHICCO, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2006.

LOUZADA, S. M.; VARGAS, C. R. ENCEFALOPATIA DIABÉTICA E DEPRESSÃO: DANO OXIDATIVO NO CÉREBRO. **Clinical & Biomedical Research**, v. 35, n. 4, p. 184–195, 2015.

MACHADO, A. F. **ESTABELECIMENTO DE MODELO ANIMAL DE DIABETES TIPO II**. [s.l: s.n.].

MATOUGH, F. A. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 12, n. 1, p. 5, 2012.

MATTHEWS, D. R. et al. **Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man***Diabetologia*. [s.l: s.n.].

MCCRIMMON, R. J.; RYAN, C. M.; FRIER, B. M. Diabetes and cognitive dysfunction. **The Lancet**, v. 379, n. 9833, p. 2291–2299, 16 jun. 2012.

MCNAY, E. C. et al. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 93, n. 4, p. 546–553, 1 maio 2010.

- MCNAY, E.; PEARSON-LEARY, J. GluT4: A central player in hippocampal memory and brain insulin resistance. **Experimental neurology**, 2020.
- MESSIER, C. Glucose improvement of memory: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 490, n. 1–3, p. 33–57, 19 abr. 2004.
- MIJNHOUT, G. S. et al. Diabetic encephalopathy: A concept in need of a definition [1]. **Diabetologia**, v. 49, n. 6, p. 1447–1448, 2006.
- MOHEET, A.; MANGIA, S.; SEAQUIST, E. R. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1353, n. 1, p. 60–71, 1 set. 2015.
- MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E. B. Fish Intake, Contaminants, and Human Health: Evaluating the Risks and the Benefits. **JAMA**, v. 296, n. 15, p. 1885–1899, 18 out. 2006.
- MUMBY, D.; PINEL, J. Rhinal cortex lesions and object recognition in rats. **Behavioral neuroscience**, 1994.
- MUNSHI, M. N. **Cognitive dysfunction in older adults with diabetes: What a clinician needs to know**. **Diabetes Care** American Diabetes Association Inc., , 1 abr. 2017.
- MYERS, J.; KOKKINOS, P.; NYELIN, E. Physical Activity, Cardiorespiratory Fitness, and the Metabolic Syndrome. **Nutrients 2019, Vol. 11, Page 1652**, v. 11, n. 7, p. 1652, 19 jul. 2019.
- NALIWAIKO, K. **SUPLEMENTAÇÃO CRÔNICA COM ÓLEO DE PEIXE. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS NO HIPOCAMPO DE RATOS WISTAR PODEM EXPLICAR O EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO ÓLEO DE PEIXE?** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009.
- NELSON L, D.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de bioquímica**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 1158–1158
- NETTLETON, J.; KATZ, R. n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. **Journal of American Dietetic Association**, 2005.

NIJHOLT, I. M. et al. Inhibition of PKA anchoring to A-kinase anchoring proteins impairs consolidation and facilitates extinction of contextual fear memories. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 1, p. 223–229, 1 jul. 2008.

NOHL, H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. **British Medical Bulletin**, v. 49, n. 3, p. 653–667, 1 jan. 1993.

NOLAN, J. J.; FÆRCH, K. **Estimating insulin sensitivity and beta cell function: Perspectives from the modern pandemics of obesity and type 2 diabetes.** **Diabetologia**, nov. 2012.

OHL, F.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, 2001.

PACKARD, M. G. **Anxiety, cognition, and habit: A multiple memory systems perspective.** **Brain Research**, 1 out. 2009.

PEARSON-LEARY, J.; JAHAGIRDAR, V.; SAGE, J. Insulin modulates hippocampally-mediated spatial working memory via glucose transporter-4. **Behavioural brain**, 2018.

PEARSON-LEARY, J.; MCNAY, E. C. Novel Roles for the Insulin-Regulated Glucose Transporter-4 in Hippocampally Dependent Memory. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 47, p. 11851–11864, 23 nov. 2016.

PIROLI, G. G. et al. Corticosterone Impairs Insulin-Stimulated Translocation of GLUT4 in the Rat Hippocampus. **Neuroendocrinology**, v. 85, n. 2, p. 71–80, maio 2007.

POMYTKIN, I. et al. Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 24, n. 9, p. 763–774, 1 set. 2018.

PSYCHOLOGY, C. B.-J. OF COMPARATIVE AND PHYSIOLOGICAL; 1979, UNDEFINED. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **psycnet.apa.org**, [s.d.].

PUGAZHENTHI, S.; QIN, L.; REDDY, P. H. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 5, p. 1037–1045, 2017.

RAPOPORT, S. I.; RAMADAN, E.; BASSELIN, M. Docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into the brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 96, n. 1–4, p. 109–113, 1 nov. 2011.

RATO, L. et al. Testicular Metabolic Reprogramming in Neonatal Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Rats Impairs Glycolytic Flux and Promotes Glycogen Synthesis. 2015.

REBOLLEDO-SOLLEIRO, D. et al. Role of thirst and visual barriers in the differential behavior displayed by streptozotocin-treated rats in the elevated plus-maze and the open field test. **Physiology & Behavior**, v. 120, p. 130–135, ago. 2013.

RIBEIRO CESARETTI, M. L.; KOHLMANN, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 190–197, abr. 2006.

RIVERA, E. J. et al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: Link to brain reductions in acetylcholine. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 8, n. 3, p. 247–268, 1 jan. 2005a.

RIVERA, E. J. et al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: Link to brain reductions in acetylcholine. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 8, n. 3, p. 247–268, 5 dez. 2005b.

ROBERTSON, A. P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 41, p. 42351–42354, 8 out. 2004.

RÖSEN, P. et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 17, n. 3, p. 189–212, 2001.

RYAN, C. M. et al. **Improving Metabolic Control Leads to Better Working Memory in Adults With Type 2 Diabetes**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://diabetesjournals.org/care/article-pdf/29/2/345/594565/zdc00206000345.pdf>>.

SACKTOR, T. C. et al. Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 18, p. 8342–8346, 15 set. 1993.

SALEH, J. Glycated hemoglobin and its spinoffs: Cardiovascular disease markers or risk factors? **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 8, p. 449, 8 ago. 2015.

SANDA, V.; JISAK, M. Inhibition of Soybean Lipoxygenases – Structural and Activity Models for the Lipoxygenase Isoenzymes Family. **Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products**, 28 out. 2011.

SATROM, K. M. et al. Neonatal hyperglycemia induces CXCL10/CXCR3 signaling and microglial activation and impairs long-term synaptogenesis in the hippocampus and alters behavior in rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 15 mar. 2018.

SCHNEIDER, S. I. D. R. **AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO COGNITIVA, LOCOMOTORA, NEUROMETABÓLICA E DA LATERALIDADE ENCEFÁLICA EM RATOS WISTAR COM DIABETES MELLITUS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA.** [s.l: s.n.].

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and medicine**, v. 45, n. 3, p. 231–241, 1 ago. 2008.

SHAH, A. D. et al. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1·9 million people. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 3, n. 2, p. 105–113, 1 fev. 2015.

SHARMA, G. et al. **Cognitive impairments in type 2 diabetes, risk factors and preventive strategies.** **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology** De Gruyter,, 1 mar. 2020.

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

SHEMA, R.; SACKTOR, T. C.; DUDAI, Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM $\zeta$ . **Science**, v. 317, n. 5840, p. 951–953, 17 ago. 2007.

SIMA, A. A. F. Encephalopathies: the emerging diabetic complications. **Acta diabetologica**, v. 47, n. 4, p. 279–293, dez. 2010a.

SIMA, A. A. F. **Encephalopathies: The emerging diabetic complications. Acta Diabetologica**, dez. 2010b.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365–379, 1 out. 2002.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases. <https://doi.org/10.1081/FRI-120028831>, v. 20, n. 1, p. 77–90, fev. 2006.

SIMOPOULOS, A. P. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. **Nutrients 2016, Vol. 8, Page 128**, v. 8, n. 3, p. 128, 2 mar. 2016.

SMITH, J. A. H. et al. CaMK activation during exercise is required for histone hyperacetylation and MEF2A binding at the MEF2 site on the Glut4 gene. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 3, p. 698–704, set. 2008.

SOARES, E. et al. SPATIAL MEMORY IMPAIRMENTS IN A PREDIABETIC RAT MODEL. **Neuroscience**, v. 250, p. 565–577, 2013.

SONG, J. et al. Agmatine improves cognitive dysfunction and prevents cell death in a streptozotocin-induced Alzheimer rat model. **Yonsei Medical Journal**, v. 55, n. 3, p. 689–699, 2014.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. - **Nature Reviews Neuroscience**, 2001.

SOUZA, D. R. DE et al. Fish oil reduces subclinical inflammation, insulin resistance, and atherogenic factors in overweight/obese type 2 diabetes mellitus patients: A pre-post pilot study. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 34, n. 5, p. 107553, 1 maio 2020.

SPINELLI, M.; FUSCO, S.; GRASSI, C. Brain insulin resistance impairs hippocampal plasticity. Em: **Vitamins and Hormones**. [s.l.] Academic Press Inc., 2020. v. 114p. 281–306.

SRINIVASAN, K. Animal models in type 2 diabetes research. **Article in The Indian Journal of Medical Research**, 2007.

SUN, Q.; LI, J.; GAO, F. New insights into insulin: The anti-inflammatory effect and its clinical relevance. **World Journal of Diabetes**, v. 5, n. 2, p. 89, 4 abr. 2014.

SUSSMAN, J.; BON, S.; SILMAN, J. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. **Progress in brain research**, 1993.

TAKADA, J. et al. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 56, n. 7, p. 977–984, jul. 2007.

TAOUI, M. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 282, n. 3, 2002.

THAI, M. V. et al. Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) -Binding Site Is Required for GLUT4 Gene Expression in Transgenic Mice: REGULATION OF MEF2 DNA BINDING ACTIVITY IN INSULIN-DEFICIENT DIABETES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 23, p. 14285–14292, 5 jun. 1998.

VAN BUSSEL, F. C. G. et al. **Cerebral pathology and cognition in diabetes: The merits of multiparametric neuroimaging.** **Frontiers in Neuroscience** Frontiers Research Foundation, , 5 abr. 2017.

VAN DER STAAY, F. J. et al. **The appetitively motivated “cognitive” holeboard: A family of complex spatial discrimination tasks for assessing learning and memory.** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, jan. 2012.

WALLACE, T. M.; LEVY, J. C.; MATTHEWS, D. R. **Use and Abuse of HOMA Modeling.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://diabetesjournals.org/care/article-pdf/27/6/1487/645883/zdc00604001487.pdf>>.

WANG, F. et al. Treatment for 6 months with fish oil-derived n-3 polyunsaturated fatty acids has neutral effects on glycemic control but improves dyslipidemia in type 2 diabetic patients with abdominal obesity: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Eur J Nutr**, v. 56, p. 2415–2422, 2017.

WEIR, N. L. et al. Associations between omega-6 polyunsaturated fatty acids, hyperinsulinemia and incident diabetes by race/ethnicity: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Clinical Nutrition**, v. 39, n. 10, p. 3031–3041, 1 out. 2020.

WILKINSON, D. G. et al. Cholinesterase Inhibitors Used in the Treatment of Alzheimer's Disease. **Drugs & Aging** 2004 **21:7**, v. 21, n. 7, p. 453–478, 31 ago. 2012.

WU, L.; PARHOFER, K. G. **Diabetic dyslipidemia. Metabolism: Clinical and Experimental** W.B. Saunders, , 1 dez. 2014.

YAMAZAKI, R. K. et al. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 28 abr. 2011.

YANG, Y. et al. Metabolic pathways in the periphery and brain: Contribution to mental disorders? **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 1863, n. 3, p. 138–145, 2017.

ZAZULA, M. F. **ALTERAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DA PROLE DE RATAS SUPLEMENTADAS COM DOSES SUPRARRECOMENDADAS DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS ÔMEGAS 3 E 6.** [s.l: s.n.].

ZHANG, T. T. et al. Health benefits of dietary marine DHA/EPA-enriched glycerophospholipids. **Progress in Lipid Research**, v. 75, p. 100997, 1 jul. 2019.

ZHOU, H. et al. Function of the GABAergic System in Diabetic Encephalopathy. **Cellular and Molecular Neurobiology**, n. 0123456789, 2022.

ZIBAEENEZHAD, M. J. et al. Comparison of the effect of omega-3 supplements and fresh fish on lipid profile: a randomized, open-labeled trial. **Nutrition & Diabetes** 2017 **7:12**, v. 7, n. 12, p. 1–8, 19 dez. 2017.



### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.024656/2019-68

**APROVADO/APPROVAL:** 21/05/2019 – R.O. 04/2019

**TÍTULO:** Investigação do efeito da suplementação com óleo de peixe rico em AGPI n-3 sobre parâmetros neurais, metabólicos e inflamatórios relacionados à diabetes mellitus tipo 3.

**TITLE:** Investigation of the effect of n-3 PUFA rich fish oil supplementation on neural, metabolic and inflammatory parameters related to type 3 diabetes mellitus.

**AUTORES/AUTHORS:** Luiz Cláudio Fernandes, Katya Naliwaiko, Stephanie Rubianne Silva Carvalho, Bruna Comotti de Oliveira, Malu Cristina Montoro, Amanda Bialli.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Fisiologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko  
**Coordenadora da CEUA**



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 10/06/2019, às 11:38, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **KATYA NALIWAIKO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 22/11/2019, às 16:37, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **1864664** e o código CRC **F022C31D**.