

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO
NÍVEL DOUTORADO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE DOIS COMPOSTOS DE ZINCO NOS
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICOS EM
MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Doutoranda: Christiane Leite Cavalcanti

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Jailane de Souza Aquino

JOÃO PESSOA - PB

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO
NÍVEL DOUTORADO**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE DOIS COMPOSTOS DE ZINCO NOS
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICOS EM
MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Doutoranda: Christiane Leite Cavalcanti

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Jailane de Souza Aquino

Tese final apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição.

Linha de Pesquisa: Clínica e Epidemiologia aplicada à Nutrição.

JOÃO PESSOA - PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C376e Cavalcanti, Christiane Leite.

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE DOIS COMPOSTOS DE ZINCO NOS
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICOS
EM MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 /

Christiane Leite Cavalcanti. - João Pessoa, 2018.

120 f. : il.

Orientação: Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves.

Coorientação: Jailane de Souza Aquino.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Ansiedade, Depressão, Estresse Oxidativo, Glicemia.

I. Gonçalves, Maria da Conceição Rodrigues. II. Aquino,
Jailane de Souza. III. Título.

UFPB/BC

CHRISTIANE LEITE CAVALCANTI

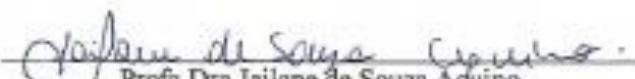
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE DOIS COMPOSTOS DE ZINCO NOS
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E HISTOLÓGICOS EM
MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 1

Aprovada em 27 de Março de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Profª Dra Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves
Orientadora/Presidente da banca
Departamento de Nutrição/ CCS/UFPB



Profª Dra Jailane de Souza Aquino
Co-Orientadora
Departamento de Nutrição/ CCS/UFPB



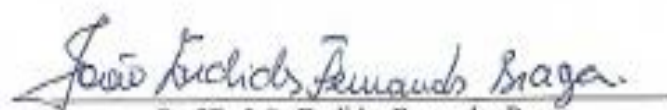
Prof Dr Alexandre Sérgio Silva
Membro Interno
Departamento de Educação Física/ CCS/UFPB



Prof Dr José Luiz de Brito Alves
Membro Interno
Departamento de Nutrição/ CCS/UFPB



Profª Dra Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori
Membro Externo
Departamento de Psicologia/ CCHLA/UFPB



Prof Dr João Euclides Fernandes Braga
Membro Externo
Departamento de Enfermagem / CCS/UFPB

Prof Dr Robson Cavalcante Veras
Suplente Interno
Departamento de Ciências Farmacêuticas/ CCS/UFPB

Profa Dra Juliana Kessia Barbosa Soares
Suplente Externo
Departamento de Nutrição/ CES/UFCG

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela presença amorosa e misericordiosa em toda a minha vida;

A minha família, em especial, aos meus pais **Albano** e **Maria José**, meu porto seguro em todos os momentos e aos meus irmãos **Alessandro**, **Max** e **Rodrigo**;

A minha filha, **Sarah**, meu presente mais valioso, razão das minhas alegrias e realizações;

Ao meu namorado, **Ricardo**, companheiro no amor, nos sonhos e na vida;

A minha orientadora, **Professora Dra. Maria da Conceição Rodrigues Gonçalves**, por me aceitar como orientanda, pelas sugestões e por todo apoio ao longo da minha vida acadêmica;

A minha co-orientadora, **Professora Dra. Jailane de Souza Aquino**, por me proporcionar a oportunidade de vivenciar a pesquisa experimental no LANEX, pelos seus ensinamentos, dedicação, compromisso, paciência e profissionalismo. Obrigada pelo apoio nos momentos mais difíceis e pelo seu cuidado e zelo na realização e conclusão desta pesquisa;

Aos **professores da banca de qualificação e da defesa**, sou grata pelas valiosas sugestões, discussões e correções;

Ao professor **Dr. Alexandre Sérgio da Silva**, pela participação na construção do primeiro artigo e por permitir a realização das análises bioquímicas no laboratório do LEADS-UFPB;

Ao professor **Dr. José Luiz de Brito**, pela colaboração nas eutanásias, pela valiosa contribuição na construção e revisão do primeiro artigo, além do apoio na realização das análises enzimáticas;

Ao professor **Adriano Alves**, pela disponibilidade e profissionalismo em realizar as análises histológicas;

A Professora **Dra. Cláudia Lagranha**, por permitir a realização das análises enzimáticas no laboratório do CAV-UFPE;

Ao **Dr. Diorginis Ferreira**, pela disponibilidade em realizar as análises enzimáticas e pela contribuição nas análises estatísticas;

Ao **Professor Dr. Evandro Leite de Souza**, coordenador do PPGCN, pelo comprometimento, empenho e dedicação;

Aos **professores do PPGCN**, meus sinceros agradecimentos pelo convívio e por contribuírem na minha formação;

Aos funcionários do PPGCN, **Seu Carlos** e **Seu Marcos**, pela disponibilidade e profissionalismo;

As colegas da turma de Doutorado, especialmente, **Ana Flávia Britto** pela amizade e companheirismo, **Luciana Toscano** pela amizade e auxílio nas análises estatísticas e as colegas de turma: **Juliana, Myrella, Raphaela, Katharine e Raquel** pelas experiências compartilhadas;

A equipe do LANEX: **Emmanuel Veríssimo, Jader Carvalho, Jéssyca Alencar, Naís Lira, Priscilla Lins, Raquel Coutinho** e **Rosianne Tsujisaki** pela dedicação, convívio amistoso e, acima de tudo, pela enorme colaboração na realização deste trabalho;

Ao funcionário do LANEX, **Sr. Lindenberg**, pela disponibilidade e ajuda diária;

Aos funcionários do Biotério Central da UFPB, **Sr. Crispim**, pela presteza na solicitação e captação dos animais e ao **Sr. Josué**, pelo auxílio;

A doutoranda **Lydiane Toscano**, pela disponibilidade em realizar as análises bioquímicas;

A equipe do **Laboratório de Psicofarmacologia**, em especial a **Renan Braga**, pela colaboração na realização do treinamento para a execução dos testes comportamentais;

A professora **Dr^a. Liana Clébia de Moraes Pordeus**, pela realização das análises estatísticas dos testes comportamentais;

À **CAPES** pelo apoio financeiro;

Aos **animais**, que com suas vidas propiciaram os experimentos e o progresso da ciência, meu respeito e gratidão.

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

(Cora Coralina)

RESUMO

O Zinco (Zn) apresenta um papel na melhora da sensibilidade à insulina, de modo que sua suplementação vem sendo utilizada como tratamento coadjuvante do Diabetes Mellitus, entretanto, não existe consenso quanto à eficácia dos compostos utilizados. Nesse sentido, a realização desse estudo objetivou avaliar o efeito da suplementação de dois compostos de Zn nos parâmetros comportamentais, bioquímicos e histológicos nas potenciais complicações em modelo experimental de Diabetes Mellitus Tipo 1. Utilizou-se 54 ratos machos adultos randomizados em seis grupos: Controle (C; n=8); Suplementado com Sulfato de Zn (SZ; n=8); Suplementado com Gluconato de Zn (GZ; n=8); Diabético (D; n=10); Diabético Suplementado com Sulfato de Zn (DSZ; n=10) e Diabético Suplementado com Gluconato de Zn (DGZ; n=10). Os grupos SZ e DSZ receberam suplementação oral de Sulfato de Zn e os grupos GZ e DGZ receberam suplementação oral de Gluconato de Zn, ambos na dose (15 mg/kg de massa corporal), durante 4 semanas. Os dados (média±SEM) foram analisados pelo Teste de Mann-Whitney para os parâmetros comportamentais e pela ANOVA, seguido do *post-hoc* de Tukey, para os parâmetros bioquímicos, com nível de significância de $p<0,05$. Não houveram diferenças significativas quanto aos sintomas clássicos da doença, porém o grupo D apresentou perda significativa de massa corporal e redução das medidas murinométricas ($p<0,05$) comparado com os grupos DSZ e DGZ, indicando que a suplementação de Zn atenuou a perda de peso no diabetes. Quanto aos parâmetros comportamentais, o grupo DSZ apresentou maior tempo de permanência e maior número de entradas nos braços abertos no Teste do Labirinto em Cruz Elevado ($p<0,05$); maior ambulação e menor tempo de imobilidade no Teste de Campo Aberto ($p<0,05$) e menor tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado ($p<0,05$); enquanto o grupo DGZ apresentou menor tempo de imobilidade e maior tempo de natação no Teste do Nado Forçado ($p<0,05$), sem diferenças estatísticas nos demais testes, indicando que a suplementação com Sulfato de Zn apresentou efeito ansiolítico e a suplementação com Gluconato de Zn apresentou efeito antidepressivo nos animais diabéticos, corroborando com os resultados da análise histológica, com atenuação das alterações histológicas cerebrais como redução de neurônios isquêmicos e hemorragia dos animais do grupo DGZ. O grupo DSZ apresentou melhor controle glicêmico, comparado aos grupos D e DGZ, considerando HbA1c e valores da glicemia no Teste Oral de Tolerância à Glicose e no Teste de Tolerância à Insulina ($p<0,05$), sugerindo uma melhor captação da glicose resultante da suplementação de Sulfato de Zn. No entanto, os grupos DSZ e DGZ apresentaram alterações negativas no perfil lipídico ($p<0,05$). Os níveis da Capacidade Antioxidante Total foram aumentados nos grupos DSZ e DGZ, comparado ao grupo D ($p<0,05$), contudo não houve diferença significativa dos níveis de Malondialdeído. O grupo DSZ apresentou melhora das funções hepáticas, com atenuação das alterações histológicas, comparado aos grupos D e DGZ ($p<0,05$). Os grupos DSZ e DGZ apresentaram melhora da função renal, comparado ao grupo D ($p<0,05$), entretanto, o grupo DGZ apresentou maior efeito protetor dos tecidos renais, comparado ao grupo DSZ. Os resultados apontam um melhor efeito terapêutico do Sulfato de Zn comparado ao Gluconato de Zn, melhorando o controle glicêmico, aumentando a atividade antioxidante e atenuando lesões nos tecidos hepáticos e renais. Entretanto, a suplementação com os dois compostos de Zn resultou em reações adversas sobre o perfil lipídico, dessa forma, a suplementação deve ser monitorada dentro do limite tolerável.

Palavras chave: Ansiedade, Depressão, Estresse Oxidativo, Glicemia, Histologia, Suplementação Nutricional.

ABSTRACT

The Zinc (Zn) plays a role in improving insulin sensitivity, so its supplementation has been used as adjuvant treatment of Diabetes Mellitus, however, there is no consensus as to the efficacy of the compounds used. In this sense, the accomplishment of this study aimed to evaluate the effect of the supplementation of two Zn compounds on the behavioral, biochemical and histological parameters in an experimental model of Type 1 Diabetes Mellitus. Fifty four male adult rats were randomized into six groups: Control (C = n = 8); Supplementary with Zn Sulphate (SZ; n = 8); Supplementary with Zn Gluconate (GZ; n = 8); Diabetic (D; n = 10); Diabetic Zn Sulfate Supplementary (DSZ; n = 10) and Diabetic Zn Gluconate Supplementary (DGZ; n = 10). The SZ and DSZ groups received oral supplementation of Zn Sulfate and the GZ and DGZ groups received oral Zn Gluconate supplementation at both the dose (15 mg/kg body weight) for 4 weeks. The Data (mean±SEM) were analyzed by the Mann-Whitney test or ANOVA, followed by Tukey post-hoc, with significance level of $p < 0.05$. The partial results were: there were no significant differences regarding the classic symptoms of the disease, but group D presented significant loss of body mass and reduction of the murinometric measures ($p < 0.05$) compared to the DSZ and DGZ groups, indicating that Zn supplementation attenuated the loss of weight in diabetes. Regarding the behavioral parameters, the DSZ group presented a longer residence time and a greater number of entries in the open arms in the Elevated Cross Labyrinth Test ($p < 0.05$); greater ambulation and shorter time of immobility in the Open Field Test ($p < 0.05$) and less time of immobility in the Forced Swimming Test ($p < 0.05$); while the DGZ group presented lower immobility time and longer swimming time in the Forced Swim Test ($p < 0.05$), with no statistical differences in the other tests, indicating that supplementation with Zn Sulphate presented an anxiolytic effect and Gluconate supplementation of Zn presented antidepressant effect in diabetic animals, corroborating with the results of the histological analysis, with attenuation of the cerebral histological alterations as reduction of ischemic neurons and hemorrhage of the animals of the DGZ group. The DSZ group presented better glycemic control compared to the D and DGZ groups, considering HbA1c and glycemia values in the Oral Glucose Tolerance Test and the Insulin Tolerance Test ($p < 0.05$), suggesting a better uptake of the resulting glucose of Zn Sulfate supplementation. However, the DSZ and DGZ groups presented negative changes in the lipid profile ($p < 0.05$). Total Antioxidant Capacity levels were increased in the DSZ and DGZ groups, compared to the D group ($p < 0.05$), however there was no significant difference in Malondialdehyde levels. The DSZ group presented improvement in liver function, with attenuation of histological changes, compared to D and DGZ groups ($p < 0.05$). The DSZ and DGZ groups showed improvement in renal function, compared to group D ($p < 0.05$); however, the DGZ group presented a greater protective effect of the renal tissues compared to the DSZ group. The results indicate a greater therapeutic effect of Zn Sulphate compared to Zn Gluconate, improving glycemic control, increasing antioxidant activity and attenuating liver and kidney tissue damage. However, supplementation with the two Zn compounds resulted in adverse reactions on the lipid profile, which may contribute to the development of cardiovascular complications, therefore, supplementation should be monitored within the tolerable limit.

Key words: Anxiety, Depression, Oxidative Stress, Glycemia, Histology, Nutritional Supplementation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia do DM1.....	19
Figura 2. Representação esquemática dos efeitos tóxicos nas células β pelo uso de ALX e STZ	22
Figura 3. Estrutura de: a) Glicose; b) Estreptozotocina.....	23
Figura 4. Principais vias de toxicidade da STZ	24
Figura 5. Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia	27
Figura 6. Fontes alimentares de Zn.....	29
Figura 7. Homeostase do Zn.....	33
Figura 8. Fluxograma das divisões e subdivisões dos grupos experimentais.....	45
Figura 9. Delineamento do ensaio biológico	46
Figura 10. Aparato do Nado Forçado	48
Figura 11. Aparato Labirinto em Cruz Elevado	49
Figura 12. Aparato de Campo Aberto.....	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tipos de estudos com diferentes compostos e doses de Zn.....	37
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGE	Produto Final de Glicacoo Avançada
ALX	Aloxana
BB	Ratos BB (<i>Biobreading</i>)
C	Grupo Controle
CA	Campo Aberto
CAOT	Capacidade Antioxidante Total
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
C-HDL	<i>High Density Lipoprotein-C</i>
C-LDL	<i>Low Density Lipoprotein-C</i>
C-VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein-C</i>
CT	Colestetol Total
D	Grupo Diabético
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
DGZ	Grupo Diabético Suplementado com Gluconato de Zinco
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMG	DM Gestacional
DSBD	Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes
DSZ	Grupo Diabético Suplementado com Sulfato de Zinco
ERO	Espécie Reativa de Oxignio
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
GSPx	Glutathiona Peroxidase
GZ	Grupo Suplementado com Gluconato de Zinco
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-1	Interleucina
LADA	<i>Latent Autoimmune Diabetes in Adults</i>
LANEX	Laboratório de Nutrio Experimental

LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LEADS	Laboratório de Estudos Aplicado ao Desempenho e Saúde
MDA	Malondialdeído
MT	Metalotionéina
NAS	<i>National Academy of Sciences</i>
NOD	Camundongos Diabéticos não Obesos
PKC	Protéina Quinase C
RL	Radicais Livres
SBCAL	Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
SZ	Grupo Suplementado com Sulfato de Zinco
STZ	Estreptozotocina
TG	Triglicerídio
TNF	Teste do Nado Forçado
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
TTI	Teste de Tolerância à Insulina
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabete Study</i>
Zn	Zinco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DOS ARTIGOS
TABLES AND FIGURES ARTICLE 1

Table 1. Murinometric parameters of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.....	83
Figura 1. A) Body mass and B) Food intake C) Water intake and D) Diuresis of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.....	84
Figura 2. A) Blood glucose in the ITT and B) Blood glucose in the OGTT of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.....	85
Table 2. Biochemical parameters of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.....	86
Table 3. Oxidative parameters of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.....	86
Figure 3. Oxidative status in skeletal muscle of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.....	87
Figure 4. A) Histology (H & E, x 100) and B) Hepatic oxidative parameters in healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.....	88
Figure 5. Histology (H & E, x 100) and kidney oxidative parameters in healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.....	88

LISTA DE ILUSTRAÇÕES DOS ARTIGOS
FIGURES ARTICLE 2

Figure 1. Experimental assay design	104
Figure 2. Evaluation of antidepressant activity using the Forced Swim Test in healthy and diabetic rats treated with two different Zn compounds	108
Figure 3. Evaluation of the anxiolytic activity using the Elevated Plus Maze considering the length of stay and the number of entries in the open arms in healthy and diabetic rats treated with two different Zn compounds.....	109
Figure 4. Evaluation of the anxiolytic activity using the Elevated Plus Maze considering the length of stay and the number of entries in the closed arms in healthy and diabetic rats treated with two different Zn compounds.....	109
Figure 5. Evaluation of motor activity using the Open Field Teste in healthy and diabetic rats treated with two different Zn compounds	110
Figure 6. Histology of the cerebral cortex of healthy and diabetic rats treated with two different Zn compounds. (H & E, x 100).....	111

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Diabetes Mellitus Tipo 1.....	18
2.2 Modelo Experimental de DM1	21
2.3 Diabetes Mellitus e Estresse Oxidativo	25
2.4 Aspectos Metabólicos e Fisiológicos do Zinco	29
2.5 Zinco e Diabetes Mellitus	35
2.6 Diabetes Mellitus, Zinco e Transtornos Comportamentais	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Desenho do Estudo	44
3.2 Aspectos Éticos.....	44
3.3 Animais.....	44
3.4 Protocolo para Indução do DM1 por STZ	45
3.5 Protocolo para Suplementação de Zinco	47
3.6 Avaliação dos Parâmetros.....	47
3.6.1 Sintomas Clássicos do DM1	47
3.6.2 Parâmetros Comportamentais	48
3.6.3 Teste de Tolerância à Insulina (TTI)	51
3.6.4 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)	51
3.6.5 Eutanásia e Medidas Murinométricas.....	52
3.6.6 Parâmetros Bioquímicos	53
3.6.7 Avaliação do Estresse Oxidativo em Músculo Esquelético.....	53
3.6.8 Análises Histológicas.....	56
3.7 Controle de Biossegurança	56
3.8 Análise dos Dados	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS.....	74
ANEXO A	75
APÊNDICES	76
ARTIGO 1	77
ARTIGO 2	101

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) compreende um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos sendo caracterizado, preponderantemente, pela hiperglicemia, a qual é resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção da insulina ou em ambos (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). A classificação proposta pela *American Diabetes Association* (2017) inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM Gestacional (DMG); dentre estes, o DM2 é a forma mais prevalente na população, correspondendo à 90-95% dos casos existentes.

É considerado uma epidemia mundial e um importante problema de saúde pública, devido aos altos índices de morbidade e mortalidade relacionados à doença (OWU et al., 2013). Dados mundiais estimam 415 milhões de pessoas com DM, com uma projeção de 642 milhões em 2040; no Brasil, calcula-se que 13,4 milhões de adultos são portadores da doença, com uma projeção de 19,2 milhões de portadores em 2035 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

O DM quando não tratado pode levar a alterações micro e macrovasculares, acarretando disfunção ou falência de vários órgãos. O fator determinante dessas complicações é a hiperglicemia que induz ao desenvolvimento de anormalidades na retina, rins, coração, vasos sanguíneos e nervos periféricos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015), além de estresse oxidativo (RAINS; JAIN, 2011; CERNEA; DOBREANU, 2013). Estudos também relatam alterações comportamentais em indivíduos diabéticos, destacando-se a depressão e ansiedade (ROTELLA; MANNUCCI, 2013; PETRAK et al., 2015).

O tratamento do DM1 em humanos envolve, além da administração de insulina, as intervenções nutricionais individualizadas e a inclusão de atividade física constante (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017). Entretanto, em estudos com modelos animais, quando se deseja estudar as complicações desta doença, os desenhos experimentais não apresentam a inserção de grupos insulino-dependentes (REES; ALCOLADO, 2005; DEEDS et al., 2011).

Investigações vêm avançando na busca por terapias coadjuvantes que possam auxiliar no tratamento do diabetes. Um dos elementos em evidência é o zinco (Zn), por integrar numerosos processos bioquímicos e fisiológicos, participar do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, atuar como cofator em processos antioxidantes, anti-inflamatórios e antiapoptóticos e ser fundamental para a preservação da saúde e prevenção de doenças, incluindo o DM (DESHPANDE; JOSHI; GIRI, 2013; KAUR et al., 2014).

Além disso, observações experimentais e clínicas sugeriram o envolvimento do Zn na fisiopatologia da depressão e ansiedade (SZEWCZYK et al., 2008; MLYNIEC et al., 2014). Nesse sentido, estudos comportamentais vêm sendo desenvolvidos em modelos animais com a finalidade de provocar estados semelhantes à depressão e a ansiedade humana, podendo ser avaliados através de testes comportamentais específicos (LANDEIRA-FERNANDEZ; CRUZ, 2007).

Em pacientes diabéticos, é evidenciado o risco aumentado para a deficiência sérica do Zn, atribuída às perdas na urina, diminuição na capacidade intestinal de absorção ou baixa ingestão dietética, sendo reportados hipozincemia e hiperzincúria (CHIMIANTI, 2013; FERNANDO; ZHOU, 2015) e, dessa forma, estudos apontam a necessidade de suplementação nesses indivíduos (FERNANDO; ZHOU, 2015; RANASINGHE et al., 2015a).

Nesse sentido, a suplementação de Zn tem sido investigada como uma terapêutica adjuvante no tratamento do DM, no entanto, os resultados dessas intervenções são conflitantes (CAPDOR et al., 2013; TOMA; MAKONNEM; YIMER, 2013), principalmente porque foram utilizados diferentes compostos e doses de Zn, sem haver uma padronização (CHIMIANTI, 2013). Contudo, grande parte dos estudos clínicos relata o efeito benéfico da suplementação de Zn apenas no DM2 (GUNASEKARA et al., 2011; JAYAWARDENA et al., 2012; CAPDOR et al., 2013).

Dentre os compostos de Zn, o sulfato e o gluconato são os mais utilizados em estudos de suplementação com animais e humanos, respectivamente, por apresentar vantagens como baixo custo, melhor biodisponibilidade e solubilidade, provocar menores efeitos colaterais e promover maior segurança (CAPDOR et al., 2013; WEGMÜLLER et al., 2014), entretanto, é necessário que haja uma padronização quanto ao composto mais eficaz (ROOHANI et al., 2013). Nesse sentido, adotou-se a hipótese de testar se há diferenças entre os efeitos desses dois compostos de Zn nas complicações do DM1.

Considerando a limitação de estudos comparativos que abordem a eficácia e as reações adversas da suplementação desses dois compostos de Zn nas complicações do DM1, na tentativa de preencher essa lacuna e trazer mais informações sobre a segurança da suplementação, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da suplementação de dois compostos de Zn nos parâmetros comportamentais, bioquímicos e histológicos em modelo animal de Diabetes Mellitus Tipo 1. E como objetivos específicos: verificar o efeito da suplementação de Zn no controle glicêmico e lipídico; investigar efeitos adversos e comparar a eficácia desses dois compostos quanto aos parâmetros estudados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Diabetes Mellitus Tipo 1

O Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1), em geral, é considerado uma doença autoimune, multifatorial, caracterizada pela destruição das células β pancreáticas, levando à hiperglicemia pela falta de produção da insulina, sendo necessária a reposição exógena permanente deste hormônio (BLUESTONE et al., 2010). Dados epidemiológicos reportam um aumento na incidência do DM1, particularmente, na população infantil (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Dentre os tipos de diabetes, o DM1 representa de 5% a 10% dos casos, sendo uma das doenças crônicas mais comuns em crianças e adolescentes, embora possa ocorrer em qualquer idade (YOU; HENNEBERG, 2016).

Etiologicamente, o DM1 é subdividido em dois tipos: Autoimune (1A) e Idiopático (1B). O tipo 1A é resultado da destruição imunomediada de células β pancreáticas com consequente deficiência de insulina. No tipo 1B, não há uma etiologia conhecida, corresponde à minoria dos casos de DM1 e caracteriza-se pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células β (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017). No tipo 1A, a taxa de destruição das células β é variável, sendo, em geral, mais rápido e intenso em crianças e adolescentes. A forma progressiva ocorre em adultos, sendo referida como diabetes autoimune latente do adulto (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults - LADA*), erroneamente classificada como DM2 pelo aparecimento tardio (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Além do componente autoimune, o tipo 1A apresenta forte associação com determinados genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA). O HLA tem uma variabilidade alélica muito grande e fornece cerca de 60% de contribuição para a susceptibilidade genética global do DM1 (GROOP; POCIOT, 2014). Os marcadores de autoimunidade são os autoanticorpos antiilhota ou antígenos específicos da ilhota e incluem os anticorpos antiinsulina (IAA), antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65), antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2B) e antitransportador de Zn (Znt8). Esses anticorpos podem ser verificados meses ou anos antes do diagnóstico clínico, ou seja, na fase pré-clínica da doença e em até 90% dos indivíduos quando se detecta hiperglicemia (KHARROUBI; DARWISH, 2015).

Apesar de ser fortemente influenciada por fatores genéticos, estudos mostram que um padrão simples de herança não esclarece a patogênese do DM1, já que aproximadamente 85%

dos novos casos de DM1 aparecem em indivíduos sem histórico familiar conhecido para a doença, por isso é considerado uma doença multifatorial (NOKOFF; REWERS, 2013). Além disso, estudos têm mostrado que há diferenças regionais na incidência do diabetes que não estão relacionados com a composição étnica da população (BELLE et al., 2011; FORLENZA; REWERS, 2011), esses dados revelam a grande contribuição do componente ambiental no desenvolvimento da doença.

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a contribuição de fatores ambientais na patogênese do DM1 em todo o mundo, entre essas estão os papéis de infecções virais (rubéola, caxumba, sarampo, citomegalovírus e herpes), hipótese da higiene (ausência de exposição a agentes infecciosos na primeira infância); deficiência de vitamina D e fatores nutricionais (abreviação do aleitamento materno e introdução precoce do leite de vaca e de cereais com glúten), embora esses fatores ainda não estão completamente elucidados (ATKINSON, 2012; KHARROUBI; DARWISH, 2015).

Os principais agentes virais responsáveis pelas manifestações anteriores ao processo de autoimunidade são os enterovírus e os rotavírus. Aparentemente, promovem a citólise direta das células β na inflamação (COPPIETERS et al., 2012). Um estudo recente tem investigado o papel do enterovírus humano como gatilho para autoimunidade do DM1 e descobriu que ocorre progressão da destruição das células β após infecção por enterovírus (FORGA; GOÑI, 2014).

Após reconhecimento do autoantígeno pancreático ligado a MHC de classe I, os TCD8+ causam a destruição das células β por citólise, através da liberação de citocinas citotóxicas (Interferon- γ) ou pela via perforina-granzima. Antígenos das células β são internalizados pelas células dendríticas nas ilhotas pancreáticas e transportados para os linfonodos de drenagem, onde são processados e apresentados às células TCD4+ em associação com peptídeos MHC da classe II. Nestes linfonodos, acontece expansão de baixa frequência de células T autorreativas circulantes. Uma vez no pâncreas, as células TCD4+ ativadas (CD4+) recrutam e ativam células inflamatórias, causando insulite, determinando reações inflamatórias e secreção de citocinas principalmente interleucina -1(IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α), culminando com a apoptose seletiva das células β (Figura 1) (RONCAROLO; BATTAGLIA, 2007).

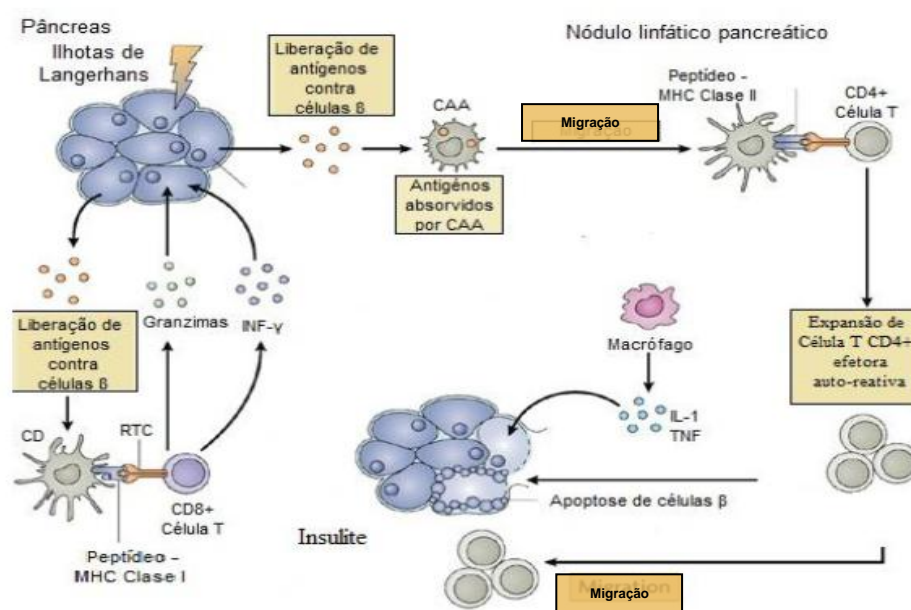


Figura 1. Fisiopatologia do DM1. Modificado de Roncarolo e Battaglia (2007).

Legenda: CD: Células Dendríticas; RTC: Receptor de Célula T; MHC: Moléculas Clássicas de Histocompatibilidade; INF- γ : Interferon- γ ; IL-1: Interleucina; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral.

A história natural do DM1 inclui quatro estágios distintos: (I) pré-diabético: início precedido por um período assintomático, no qual ocorre a autoimunidade dirigida às células β , com diminuição progressiva da resposta insulínica à glicose intravenosa ou oral; (II) início do diabetes clínico: a expressão evidente dos sintomas clínicos aparecendo quando cerca de 80% das células β já foram destruídas; (III) remissão transitória: após o diagnóstico e correção da hiperglicemia e cetoacidose, recupera-se a secreção endógena de insulina (fase lua-de-mel); nesse período, as necessidades de insulina exógena diminuem consideravelmente por períodos variados de meses a anos; (IV) instalação da doença: entre 8 a 10 anos após o início, a perda de células β é considerada completa e a deficiência de insulina é absoluta, resultando no diabetes associado com complicações agudas, crônicas e morte (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011).

O diagnóstico clínico do DM1 é realizado através da associação dos sinais e sintomas característicos da patologia, como a polidipsia, polifagia, poliúria e perda de peso em conjunto com os valores da glicemia. A presença de sintomas clínicos associadas à glicemia plasmática casual ≥ 200 mg/dL, ou glicemia plasmática de jejum ≥ 126 mg/dL, ou ainda, a fração da hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$, são os critérios adotados para o diagnóstico do DM1 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017).

Além de monitorar o tratamento do diabetes, a HbA1c tem sido recomendada como marcador de diagnóstico para essa doença pelo *International Expert Committee* (2009), endossados pela *World Health Organization* (2011) e *American Diabetes Association* (2017). A HbA1c tem pouca variação interindividual, se não houver qualquer doença hematológica, maior reprodutibilidade e conveniência por não necessitar de jejum e preparação dietética, não sofre grandes flutuações, como na dosagem da glicose plasmática e está diretamente relacionada ao risco de complicações em pacientes com DM Tipo 1 e Tipo 2 (ALQAHTANI et al., 2013).

A cronicidade da doença e o controle glicêmico inadequado são responsáveis por várias complicações do DM, dessa forma, o acompanhamento do controle glicêmico e do perfil lipídico são importantes para prevenção das complicações (PASQUALOTTO; ALBERTON; FRIGERI, 2012). Há evidências que um controle metabólico eficaz tem papel importante na prevenção ou na progressão das complicações crônicas dessa doença, conforme evidencia o *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) para o DM1 e o *United Kingdom Prospective Diabete Study* (UKPDS) para o DM2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017).

As complicações do DM classificam-se em macrovasculares: aterosclerose, doença cardíaca e doença cerebrovascular (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017) e em microvasculares: nefropatias (KANWAR et al., 2011), retinopatias (LUTTY, 2013) e neuropatias (SMITH; SINGLETON, 2012). Além disso, evidências epidemiológicas mostram uma associação do DM com um risco aumentado para o desenvolvimento de cânceres, como de fígado, pâncreas e endométrio, devido à hiperglicemia (CHOWDHURY, 2010). Outras comorbidades associadas ao DM são os transtornos mentais, principalmente a ansiedade e a depressão (ROTELLA; MANNUCCI, 2013; PETRAK et al., 2015), podendo ser ainda fator de risco para doenças degenerativas relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC) e causar prejuízos cognitivos (SETO et al., 2015).

Devido a sua natureza crônica, gravidade das complicações e os meios necessários para controlá-las, o DM1 é uma doença incapacitante para os indivíduos afetados e suas famílias, além de requerer um tratamento oneroso ao sistema de saúde (FRANCIOSI et al., 2013). Os custos intangíveis também apresentam grande impacto na qualidade de vida destas pessoas e seus familiares, o que é difícil de quantificar. Sendo esta doença evolutiva, seus portadores precisam, ao longo do tempo, de diferentes combinações terapêuticas, além do controle adequado das outras doenças frequentemente associadas ao DM1 (BRASIL, 2015).

Neste sentido, medidas que previnam o avanço das complicações do DM1 podem representar uma importante estratégia para prevenção e controle dessa doença (WHO, 2016).

O manejo terapêutico e as modalidades de prevenção das complicações do DM têm evoluído evidentemente nos últimos anos. A base do tratamento para DM1 é a administração subcutânea de insulina e controle da glicemia, através da automonitorização com glicosímetro de 4 a 6 vezes por dia (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Além disso, a orientação alimentar e educacional para os pacientes e seus familiares e a preocupação com os fatores de risco, são de fundamental importância no acompanhamento destes indivíduos e no sucesso do tratamento da doença (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010; WU et al., 2013).

2.2 Modelo Experimental de DM1

Estudos envolvendo modelos animais de DM1 são relevantes devido às grandes semelhanças fisiológica, celular e molecular entre roedores e humanos, sendo assim, a utilização desses torna-se bastante útil. Os modelos em diabetes normalmente são divididos quanto ao modo de surgimento da doença: surgimento espontâneo por cruzamentos isogênicos, induzido por dieta ou por agentes químicos. Porém, o mais frequentemente utilizado é a indução química pela administração de substâncias citotóxicas (GRAHAM et al., 2011; SAKATA, et al., 2012).

Desde 1970 se estudam os modelos animais espontâneos do DM1, dos quais duas espécies têm sido bastante estudadas por partilharem muitas das características da doença humana: os camundongos diabéticos não obesos (NOD) e os ratos BB (*Biobreading*) (VON HERRATH; NEPOM, 2009). Nestes animais, sugere-se que as ilhotas sofrem ataque autoimune por células T, células β , macrófagos e células *natural killer*, resultando assim em hiperglicemia (SAKATA et al., 2012).

Embora estejam disponíveis vários modelos de DM, o mais usado é a indução química da doença. O diabetes induzido quimicamente é um modelo simples que pode ser usado em roedores e em animais maiores (LUIPPOLD et al., 2016). Nesse modelo, uma alta porcentagem das células β pancreáticas é destruída, e assim, há pouca produção de insulina endógena, levando a hiperglicemia e perda de peso, que são sinais clínicos característicos da doença (SOCARRÁS, 2014).

O DM induzido com agentes químicos em animais de experimentação tem sido amplamente empregado como modelo para estudos de agentes terapêuticos e preventivos da

doença e dos eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabético. Esses métodos são de fácil execução e permitem a utilização de um grande número de animais, podendo ser padronizados e reproduzidos a baixo custo, quando comparados com outros métodos (GRAHAM et al., 2011; LUIPPOLD et al., 2016).

Tais modelos foram desenvolvidos para testar novas terapias visando reduzir a glicemia independente de células β , novas formulações de insulina (SHESHALA; PEH; DARWIN, 2009), terapias de transplante de ilhotas (QUARANTA et al., 2014) e para melhor estudar e compreender o mecanismo das complicações crônicas microvasculares evidenciando o entendimento dos processos envolvidos na etiologia do DM1 (DEEDS et al., 2011).

Vários agentes químicos são citotóxicos para as células β , porém a estreptozotocina (STZ) e a aloxana (ALX) são as substâncias mais usadas e investigadas para induzir diabetes em animais de experimentação como ratos, camundongos, coelhos e macacos. Ambas são citotóxicas, análogas da glicose e, embora as suas citotoxicidades ocorram através de diferentes mecanismos (Figura 2), o modo de captação das duas substâncias pelas células β pancreáticas é o mesmo, ocorrendo através do transportador de glicose do tipo GLUT 2 (LENZEN, 2008).

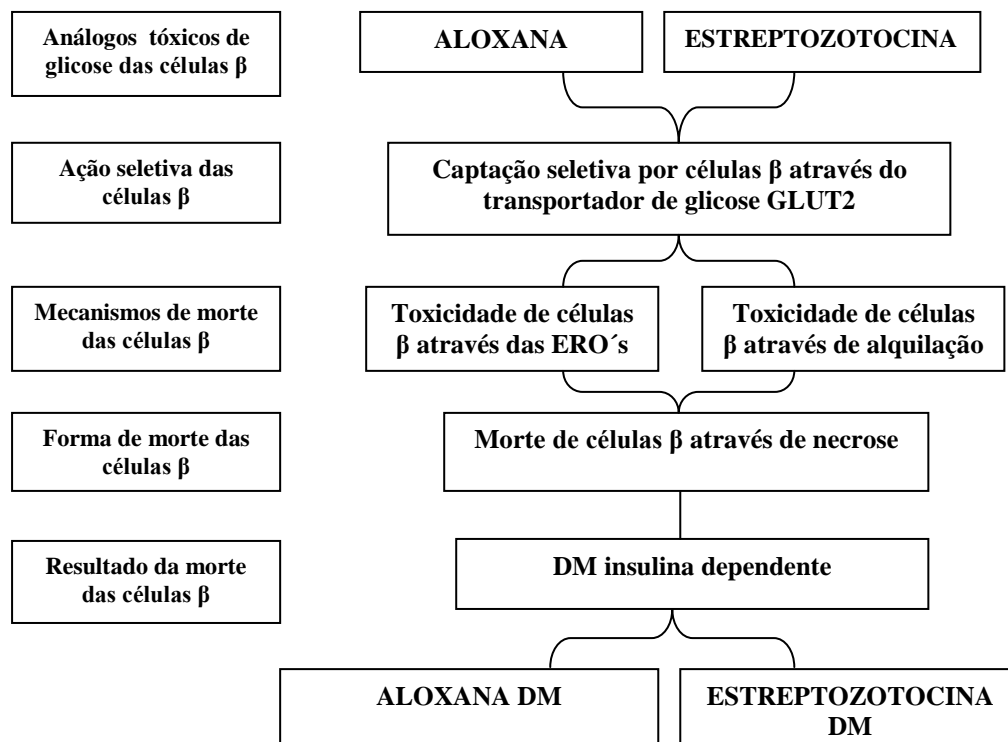


Figura 2. Representação esquemática dos efeitos tóxicos nas células β pelo uso de ALX e STZ. Adaptado de Lenzen (2008).

A STZ (2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)-1-D-glucopyranose) é um glicosídeo nitrosourea natural (Figura 3) isolado da bactéria *Streptomyces achromogenes*, é particularmente tóxico em mamíferos para as células β pancreáticas por ser um análogo citotóxico da glicose. Sua ação diabetogênica foi descrita inicialmente por Rakieten, Rakieten e Nadkarni (1963) e em seguida por Evans (1965), com aplicação de injeção intravenosa de STZ em ratos e cães e, a partir desses resultados, o diabetes passou a ser induzido com sucesso em diferentes modelos experimentais, podendo ser aplicado em camundongos, coelhos, ratos, hamsters, macacos e cobaias (ELEAZU et al., 2013).

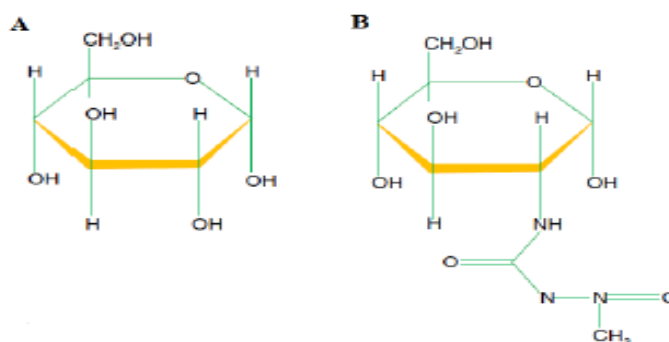


Figura 3. Estrutura de: A) Glicose; B) Estreptozotocina. Modificado de Eleazu et al. (2013).

O mecanismo de ação da STZ na depleção de células β tem sido amplamente estudado ao longo dos anos. É proposto que essa substância é absorvida através da membrana celular pelo transportador de glicose GLUT-2 das células β pancreáticas onde provoca a morte de células β por lesão no DNA, devido à porção nitrosourea da molécula (ELEAZU et al., 2013). A base bioquímica da citotoxicidade de STZ que resulta na morte celular está associada a três vias principais (Figura 4) que são:

1. Metilação do DNA, que consiste na adição de grupos metila ao DNA. A atividade de metilação do DNA da fração metilnitrosourea da STZ, conduz a danos no DNA que resultam na ativação da enzima nuclear poli-ADP-ribose-polimerase, como parte do mecanismo de reparo do DNA da célula e, conseqüentemente na depleção de NAD^+ , que resulta em inibição da biossíntese e secreção de insulina e necrose das células β pancreáticas;
2. A produção de óxido nítrico, a partir de um grupo nitroso presente na molécula de STZ, é outro possível mecanismo da ação diabetogênica atuando como agente alquilante de proteínas e doador de óxido nítrico que é citotóxico;

3. Geração de radicais livres, a STZ provoca um aumento significativo no malondialdeído (MDA), mas diminui as enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), glutatona peroxidase (GSPx), glutatona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD). A diminuição da atividade antioxidante associada ao aumento simultâneo do MDA indica a suscetibilidade do pâncreas à indução do estresse oxidativo por STZ. Devido ao fato de que este agente entra na célula através do transportador GLUT-2, a ação tóxica não é específica para β células e pode provocar danos a outros tecidos, incluindo fígado, rim e cérebro (LENZEN, 2008).

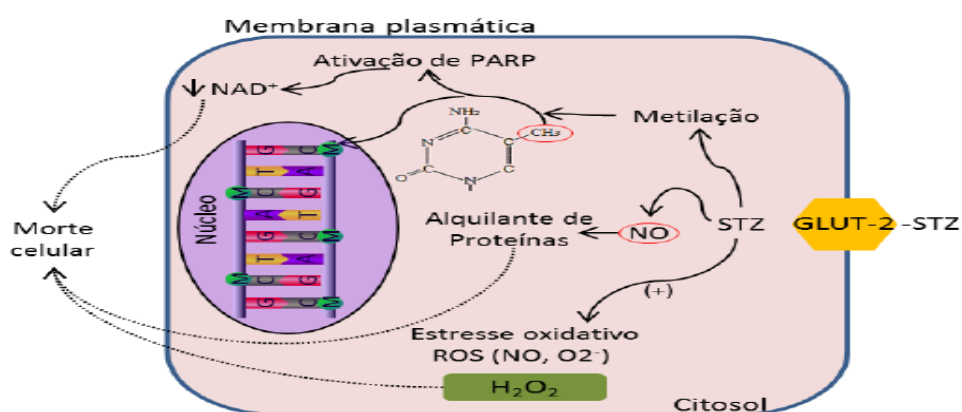


Figura 4. Principais vias de toxicidade da STZ. Adaptado de Lenzen (2008).

Legenda: NAD⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo; PARP: Poli-ADP-ribose-polimerase; NO: Óxido Nítrico; STZ: Streptozotocina; GLUT-2: Transportador de Glicose; ROS: Espécies Reativas de Oxigênio.

Ao ser administrada, a STZ possui um comportamento trifásico com relação ao nível de glicose: nas duas primeiras horas ocorre uma hiperglicemia acentuada devido à depleção do glicogênio hepático, em seguida, cerca de 6 horas após a administração, ocorre hipoglicemia relacionada à liberação de insulina através da ação de macrófagos nas células necrosadas, podendo ser fatal e, aproximadamente entre 24 a 72 horas ocorrem alterações estruturais nas células β pancreáticas, ocasionando hiperglicemia permanente (ELEAZU et al., 2013).

O modelo de DM1 induzido por STZ em ratos se justifica pela alta capacidade de mimetizar sinais e sintomas clínicos clássicos observados em pacientes diabéticos como poliúria, polidipsia, polifagia e hiperglicemia (SCRIDON et al., 2015), sendo também apropriado para realizar testes com novos fármacos ou outras terapias (KING, 2012). A STZ é comprovadamente um melhor agente diabetogênico que a ALX, por apresentar maior efetividade, maior reprodutibilidade, maior estabilidade e menor toxicidade (ELEAZU et al.,

2013), apresentando, ainda, vantagens como facilidade em induzir a doença e capacidade de manter os animais em condições adequadas, sendo dessa forma, amplamente utilizada, constituindo um modelo bem estabelecido (DEEDS et al., 2011; LUIPPOLD et al., 2016).

A dose da STZ necessária para a indução do diabetes depende da via de administração, massa corporal, espécie e estado nutricional do animal (KING, 2012). Existem na literatura várias doses e vias de administração desta substância, dependendo do protocolo experimental, entretanto, diversos estudos sugerem que uma dose única e moderada, variando entre 50 a 100 mg/kg de STZ, via intraperitoneal ou intravenosa, pode reproduzir com sucesso um modelo experimental do DM1 em ratos; para indução do DM2, a dose única pode variar entre 30 a 45 mg/kg de STZ (DEEDS et al., 2011; ELEAZU et al., 2013).

Em estudos com modelos animais induzidos ao DM1 que visam avaliar tratamentos adjuvantes, grupos tratados com insulina geralmente são adicionados ao experimento (ANARKOOLI; GANJI; POURHEIDAR, 2014; SANTOS et al., 2014), enquanto em estudos que visam observar os efeitos dos tratamentos adjuvantes frente as complicações do DM1, o desenho experimental, frequentemente, não insere grupos de animais tratados com insulina (ASRI-REZAEI et al., 2015; NAZARIZADEH; ASRI-REZAEI, 2016).

2.3 Diabetes Mellitus e Estresse Oxidativo

Radicais livres (RL) são átomos, íons ou moléculas altamente instáveis e reativas, que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica e tendem a ligar esse elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação (LOBO et al., 2010). A maior parte dos RL são derivados do metabolismo do oxigênio, usando-se o termo espécies reativas de oxigênio (EROs) para denominá-los; já os derivados do metabolismo de nitrogênio são chamados de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). A produção excessiva de espécies reativas associadas ou não a uma proteção antioxidante inadequada gera a condição conhecida como estresse oxidativo (BRITO et al., 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Estresse oxidativo é um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo da sinalização e no controle redox e/ou a um dano molecular. Esse desequilíbrio é devido a produção excessiva de EROs e de ERNs, pela perda de defesas antioxidantes, ou ambos, podendo causar danos à lipídios, proteínas e ao DNA, sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento e progressão do DM (AYEPOLA; BROOKS; OGUNTIBEJU, 2014).

As espécies reativas são fundamentais para sinalização de moléculas, reações de biossíntese, defesas químicas e reações de desintoxicação. Quando produzidas em condições fisiológicas adequadas desempenham importantes papéis em várias funções regulatórias e em processos celulares. Entretanto, quando produzidas em excesso, promovem a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (RUTTKAY-NEDECKY et al., 2013; SADI; KARTAL; GURAY, 2013).

O organismo sofre ação constante de EROs e de ERNs geradas em processos inflamatórios, por fatores ambientais (radiação, substâncias tóxicas), infecções ou falta de antioxidantes dietéticos. As principais EROs são os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxiperoxila (HO_2), hidroxila (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dentre as ERNs, tem-se o óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$). Os RL podem atacar todas as principais classes de biomoléculas, sendo os lipídios os mais suscetíveis. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) das membranas celulares são rapidamente atacados por radicais oxidantes, dessa forma, a destruição oxidativa dos PUFA, conhecida como peroxidação lipídica, é bastante lesiva por ser uma reação de autopropagação na membrana (DELMASTRO; PIGANELLI, 2011).

Estudos têm demonstrado que um controle metabólico ineficiente no DM1 está associado ao aumento do estresse oxidativo (NAUDI et al., 2011; MORAES et al., 2015), e sua importância na etiologia das complicações do diabetes baseia-se no fato que vias bioquímicas como a oxidação da glicose e a glicação protéica podem aumentar a formação de RL, fortemente relatada nos períodos de hiperglicemia (MATOUGH et al., 2012). As complicações macro e microvasculares são a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos. Existe um grande número de evidências clínicas correlacionando as complicações diabéticas com níveis hiperglicêmicos e duração da exposição à hiperglicemia, de forma que o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia é a força motriz dessas complicações (RAINS; JAIN, 2011; CERNEA; DOBREANU, 2013).

O mecanismo comum a todas as células lesadas, como consequência da hiperglicemia, é a produção aumentada de EROs, sendo essa hipótese capaz de unificar todas as vias (Figura 5). A hiperglicemia leva a aumento da PARP (poli ADP-ribose polimerase), enzima envolvida no reparo de danos ao DNA, e conseqüentemente, à diminuição da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), responsável pela metabolização final da glicose, ativando todas as vias: o aumento do fluxo de glicose e outros açúcares, através da via do poliol; o aumento da formação intracelular de produtos finais de glicação avançada (AGEs); o aumento da

expressão do receptor para produtos finais de glicação avançada e seus ligantes ativadores (RAGE); ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e aumento da atividade da via das hexosaminas (AYEPOLA; BROOKS; OGUNTIBEJU, 2014).

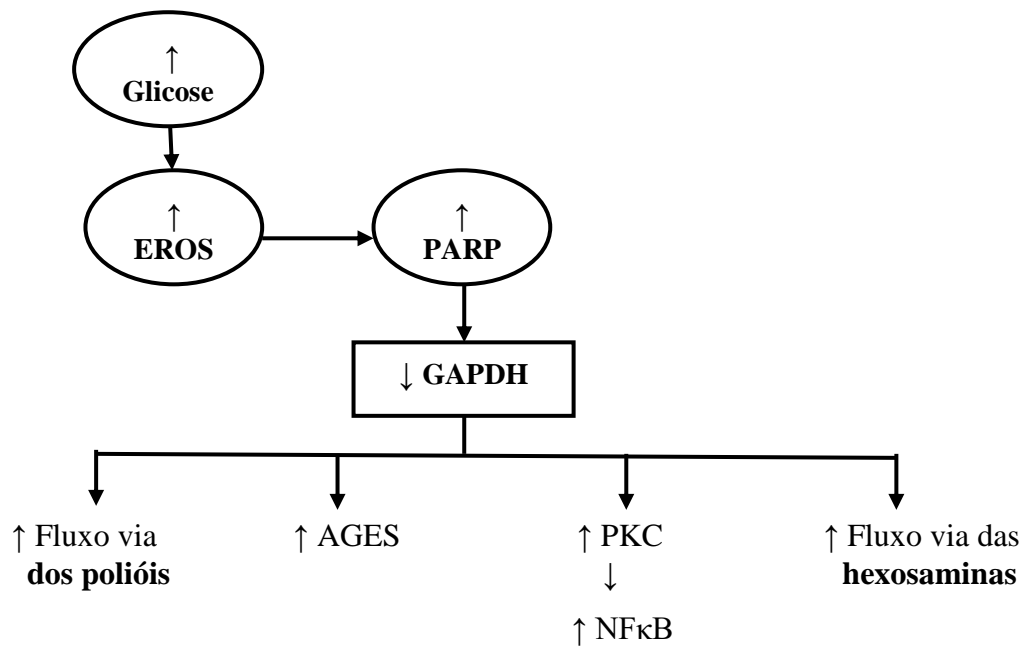


Figura 5. Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia. Adaptado de Reis et al. (2008).

Legenda: EROS = Espécies Reativas de Oxigênio; PARP = Poli ADP-Ribose Polimerase; GAPDH = Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase; AGES = Produtos Finais de Glicação Avançada; PKC = Proteína Quinase C; NFκB = Fator Nuclear κB.

Os AGEs são proteínas ou lipídios que se tornam glicados após a exposição a açúcares oxidados. Uma vez formadas, podem causar lesões teciduais por duas vias principais: (1) formação de ligações cruzadas que alteram a estrutura e função da proteína e (2) interação aos seus receptores RAGEs, que existem em células endoteliais, macrófagos, neurônios e células de músculo liso resultando na ativação da sinalização celular e expressão gênica que induz o estresse oxidativo e inflamação. Dessa forma, o estresse oxidativo pode acelerar a formação de AGEs enquanto que a sua formação pode amplificar a produção de mais EROs, resultando em um ciclo vicioso de formação de AGEs e estresse oxidativo (AYEPOLA; BROOKS; OGUNTIBEJU, 2014).

Com o objetivo de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos RL ou das EROs, as células e tecidos contam com um mecanismo, o sistema de defesa antioxidante. Antioxidantes são substâncias capazes de competir com outros substratos oxidáveis e, portanto, atrasar significativamente ou inibir a oxidação, possibilitando ao organismo a manutenção de seu estado redox; esse sistema é dividido em enzimático e não enzimático (AYEPOLA; BROOKS; OGUNTIBEJU, 2014). As ações do sistema antioxidante podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos: impedindo a formação dos RL; impedindo o ataque dos RL às células ou favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (RAINS; JAIN, 2011).

O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de RL e EROs, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (RAINS; JAIN, 2011). A SOD, uma enzima que contém Zn na sua estrutura, atua rapidamente sobre o radical superóxido (O_2^-), convertendo-o a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, por sua vez, sofre a ação da CAT e GPx, reduzindo-se à água. A ação da GPx depende da manutenção do ciclo redox da glutathione, por meio do controle da relação entre glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG). A atividade dessas enzimas, na maioria das vezes, depende da participação de cofatores enzimáticos, especialmente antioxidantes de origem dietética (REAL et al., 2010).

Em relação ao sistema antioxidante não enzimático, esse se subdivide em compostos produzidos *in vivo* (origem endógena) ou compostos obtidos diretamente da dieta (origem dietética), dos quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. A vitamina C, o β -caroteno e o α -tocoferol, precursores das vitaminas A e E, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes; entre os minerais destacam-se o Zn, o cobre, o selênio e o magnésio (MATOUGH et al., 2012).

Em busca de um aprimoramento da capacidade antioxidante do organismo frente a determinadas doenças, é importante o estudo de alimentos que são fonte de antioxidantes. Nesse sentido, na década de 90, Miller et al. (1993) criaram um novo teste para medir o estado total de antioxidantes, o qual foi denominado capacidade antioxidante total (CAOT). Sua principal vantagem é medir a capacidade antioxidante de todos os antioxidantes em uma amostra biológica e não apenas de um único composto (SOCHOR et al., 2010). Outra linha promissora é a utilização da CAOT como biomarcador do estresse oxidativo em diversas doenças, a exemplo do diabetes (FERRARI, 2010).

Estudos já associaram o aumento das concentrações de glicose com aumento da produção de EROs. Dessa forma, foi assumido que substâncias antioxidantes seriam eficazes na diminuição da lesão tecidual oriunda do estresse oxidativo (SHEIKH-ALI; CHEHADE; MOORADIAN, 2011; NAZARIZADEH; ASRI-REZAEI, 2016). Nesse contexto, a busca por tratamentos que se destinam a reduzir o estresse oxidativo continua e diversas pesquisas revelaram o potencial papel preventivo do Zn em doenças crônicas, tais como o DM.

2.4 Aspectos Metabólicos e Fisiológicos do Zinco

O Zn é o segundo mais abundante oligoelemento do organismo, encontrado principalmente nos músculos, ossos, fígado e pele, correspondendo a cerca de 2 a 4g do peso corporal (HAGMEYER; HADERSPECK; GRABRUCKER, 2015). As principais fontes dietéticas são os alimentos de origem animal, como ostras, fígado, carnes, queijos e ovos, sendo encontrado também em fontes vegetais, como hortaliças, grãos integrais, castanhas e cereais (Figura 6). Deve-se considerar que a simples presença do Zn na dieta não garante sua utilização pelo organismo, pois existem fatores que podem comprometer sua biodisponibilidade (COMINETTI; COZZOLINO, 2009).

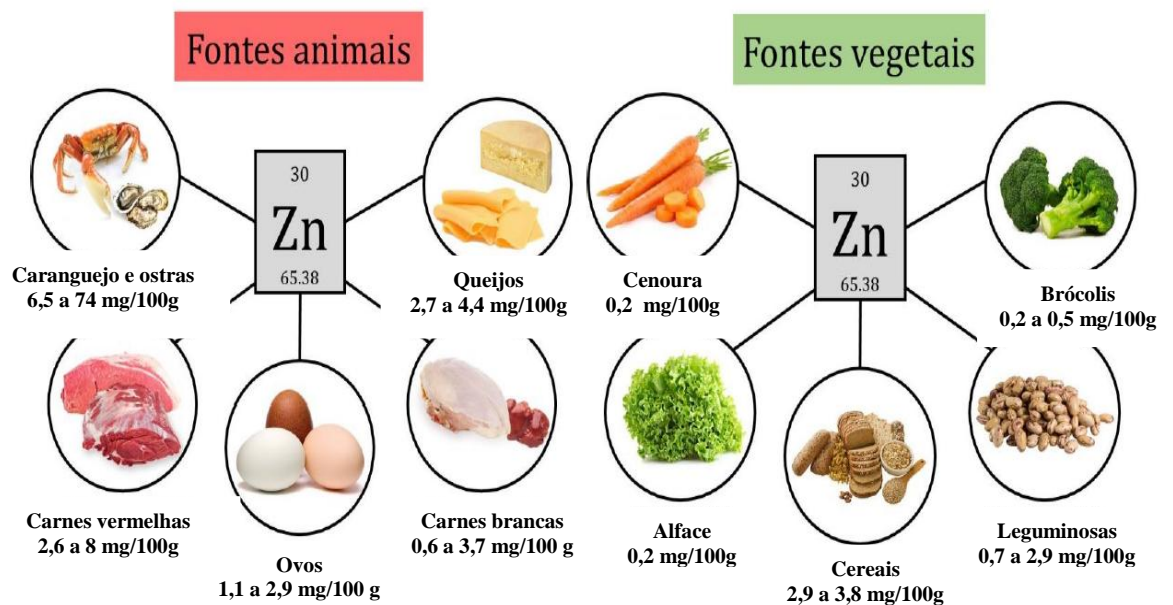


Figura 6. Fontes alimentares de Zn (quantidades estimadas de Zn elementar a cada 100 g).

Referência: TACO (2011).

Dentre os fatores que podem inibir a absorção do Zn, a presença de fitato e fibras merecem destaque. O ácido fítico, encontrado especialmente nos cereais e leguminosas, reduz a absorção de Zn devido à formação de um complexo insolúvel com esse elemento (RIBEIRO et al. 2013). Outros fatores que podem comprometer a absorção é a competição do Zn com os minerais cobre e ferro (LÖNNDERAL, 2000). Já os promotores da absorção de Zn incluem a vitamina A, a ingestão de proteínas e outros ácidos orgânicos. Possivelmente, o β -caroteno forma um complexo intestinal com o Zn, mantendo-o solúvel no lúmen intestinal e prevenindo os efeitos inibitórios do fitato (GAUTAM; PLATEL; SRINIVASAN, 2010).

Como os alimentos proteicos são fontes de Zn, o aumento da ingestão de proteínas promoveria uma maior ingestão do Zn dietético (LÖNNDERAL, 2000), além disso, a proteína animal pode diminuir os efeitos inibitórios da absorção de Zn, mantendo esse elemento em solução devido à liberação de aminoácidos, porém, proteínas específicas como a caseína tem efeito inibitório (COMINETTI; COZZOLINO, 2009).

O estudo da biodisponibilidade de nutrientes visa identificar e analisar os fatores que possam comprometer ou promover a absorção dos nutrientes, assim como o entendimento das rotas metabólicas específicas de cada substância e da influência dos mecanismos regulatórios para a manutenção da homeostase do organismo (CASGRAIN et al., 2010). A biodisponibilidade de Zn em indivíduos saudáveis pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a quantidade ingerida, o estado nutricional e idade do indivíduo, a concentração e a forma química presentes no alimento e presença de inibidores e promotores de absorção (COMINETTI; COZZOLINO, 2009).

Mediante a diversidade funcional do Zn no corpo humano, além da homeostase desse elemento, a recomendação diária para a população sadia é de 8 mg/dia para mulheres e 11 mg/dia para os homens e o limite superior tolerável (*Tolerable Upper Intake Level/UL*) para ambos os sexos é de 40 mg/dia (FOOD AND NUTRITION BOARD/INSTITUTE OF MEDICINE, 2002). A *National Academy of Sciences* (2001) recomenda para os roedores, como as diversas linhagens de ratos e camundongos, dietas com valores de 30 a 35 mg/dia de Zn elementar por quilograma de ração.

A obtenção de Zn por meio da ingestão de alimentos é considerada o principal meio de suprir as recomendações diárias, entretanto, em determinadas situações a suplementação é indicada. Dessa forma, a suplementação de Zn pode resultar em uma melhora na saúde em diferentes doenças crônicas, particularmente no DM (PRASAD, 2013; RUTTER et al., 2016). Porém, é necessário que haja uma padronização das doses utilizadas e da duração e frequência do tratamento, além da escolha do composto que apresente melhor eficácia (ROOHANI et al.,

2013), devendo também ser respeitado o limite superior tolerável de ingestão para evitar reações adversas e riscos à saúde (ABE-MATSUMOTO; SAMPAIO; BASTOS, 2015).

Dentre os compostos de Zn, destacam-se o Sulfato ($ZnSO_4$), o Gluconato ($C_{12}H_{22}O_{14}Zn$), o Acetato ($C_4H_6O_4Zn \cdot 2H_2O$), o Cloreto ($ZnCl_2$) e o Óxido (ZnO), muito abundantes na litosfera. A escolha do composto deve considerar fatores como solubilidade na água e intragástrica, sabor, custo, efeitos colaterais, segurança e biodisponibilidade, que é determinada pelo status de Zn no organismo, pelo teor total de Zn na dieta e pela solubilidade dos compostos de Zn usados na suplementação, que varia de acordo com a fórmula química (ROOHANI et al., 2013).

Desses, o sulfato e o gluconato são os compostos mais utilizados em estudos de suplementação, por serem compostos hidrossolúveis e facilitarem a absorção intestinal, além do baixo custo, maior solubilidade e por provocar menores efeitos colaterais (CAPDOR et al., 2013; ROOHANI et al., 2013). A desvantagem da suplementação com o sulfato de Zn é a interação desse composto com a matriz do alimento, modificando características sensoriais, tornando-o inaceitável; enquanto o gluconato de Zn estabilizado com glicina, tem demonstrado biodisponibilidade semelhante ao sulfato, com a vantagem de não alterar o sabor dos alimentos (WEGMÜLLER et al., 2014); entretanto, tais desvantagens podem ser suprimidas pela oferta do suplemento por meio de cápsulas.

O Zn alimentar não apresenta efeitos tóxicos e sua ingestão acima dos limites estabelecidos é incomum. Em casos de ingestão excessiva de suplementos, podem ocorrer sintomas como náuseas, vômitos, diarreia, febre e letargia (KAUR et al., 2014). A ingestão elevada por longos períodos pode interferir no metabolismo de outros nutrientes, como o cobre e o ferro (COMINETTI; COZZOLINO, 2009). Outros parâmetros afetados pelo consumo excessivo de suplementos de Zn são o estado imunológico e os níveis de lipídios séricos, ambos relacionados ao metabolismo do cobre (FAO/WHO, 2001).

A ingestão oral de Zn leva à sua absorção através do intestino delgado e, em seguida, a sua liberação no sangue, onde é distribuído e, finalmente, excretado. Não obstante, os mecanismos de absorção e excreção desse elemento obedecem a sistemas de autorregulação com alta sensibilidade, o que faz com que os reajustes nos estoques dependam da necessidade e da biodisponibilidade do íon no organismo. Dessa forma, pode-se supor que a absorção de Zn depende dos estoques corporais, sendo menor se houver quantidades razoáveis no organismo e maior nas deficiências (COMINETTI; COZZOLINO, 2009).

Os eventos principais na manutenção da homeostase do Zn no organismo são: (1) absorção, (2) distribuição, (3) armazenamento e (4) excreção (Figura 7). Em condições de

ingestão adequada, cerca de 40% do Zn alimentar é absorvido pelos enterócitos do intestino delgado. O transportador ZIP4, presente tanto em murinos quanto em seres humanos, é o principal responsável por transportar o Zn da membrana apical para o citoplasma dos enterócitos. Após sua entrada pela membrana plasmática, parte do Zn permanece no citoplasma das células intestinais, sendo redistribuído pelos compartimentos celulares por diferentes transportadores (WANG; ZHOU, 2010).

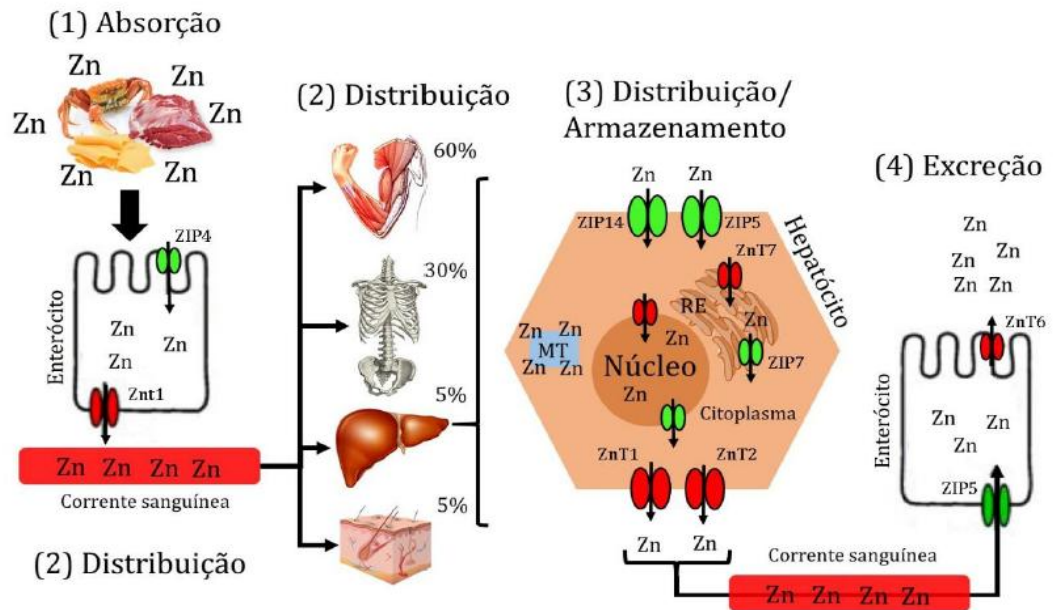


Figura 7. Homeostase do Zn. A manutenção de concentrações adequadas de Zn na célula envolve os processos de (1) absorção pelos enterócitos; (2,3) distribuição pelo organismo e pelos distintos compartimentos celulares do hepatócito; (3) armazenamento pelas metalotioneínas e (4) excreção pelos enterócitos. Adaptado de Wang e Zhou (2010).

Para que o Zn absorvido pelos enterócitos alcance a circulação e seja distribuído aos demais órgãos do corpo, sua saída ocorre pela membrana basolateral dos enterócitos, sendo o realizado pelo transportador ZnT1, alcançando a circulação sistêmica e sendo distribuído entre os diferentes órgãos. No fígado, especificamente, os transportadores ZIP5 e ZIP14 têm papel relevante na importação do Zn do meio extracelular para o citoplasma dos hepatócitos (SUN et al., 2014). Após o influxo do Zn para o meio intracelular, ocorre sua distribuição entre citoplasma, núcleo e membrana plasmática para que desempenhe suas principais funções (KAMBE; HASHIMOTO; FUJIMOTO, 2014). Sobretudo, os transportadores ZIP7 e ZnT7 estão presentes nas organelas do hepatócito, como o retículo endoplasmático e participam desse processo (SUN et al., 2014).

Parte do Zn citoplasmático liga-se às Metalotioneínas (MT). Especificamente, as MT parecem ser “reservatórios” de Zn, pois a expressão de tais proteínas é diretamente associada às alterações na concentração do Zn intracelular (KLOUBERT; RINK, 2015). Os transportadores ZnT1 e ZnT2 têm papel importante na redução da concentração desse elemento no fígado, visto que o aumento na quantidade de Zn aumenta a expressão de tais transportadores, podendo resultar no efluxo do Zn dos hepatócitos para a corrente sanguínea (LIUZZI; BLANCHARD; COUSINS, 2000).

Por fim, a excreção do Zn também é mediada pela ação dos transportadores e ocorre, principalmente, pelo intestino e em pequena parte pela urina via células epiteliais tubulares renais. O transportador ZIP5, presente na membrana basolateral dos enterócitos, media a reentrada do Zn circulante para citoplasma, já o transportador ZnT6, presente na membrana apical dos enterócitos, é o responsável pela excreção do Zn do citoplasma para o lúmen intestinal (GEISER; DE LISLE; ANDREWS, 2013).

A importância do Zn ao organismo é conhecida desde o século XIX. Grande parte do conhecimento das suas múltiplas funções, sobretudo em humanos e roedores, está relacionada à descoberta dos efeitos da deficiência desse elemento nos organismos (PRASAD, 2014). Estima-se que a deficiência de Zn acometa cerca de um terço da população mundial, podendo ser considerada potencialmente um problema de saúde pública em diversos países (WESSELLS; BROWN, 2012).

Existem várias causas da deficiência de Zn, incluindo ingestão dietética insuficiente, má absorção, aumento da excreção urinária (JUROWSKI et al., 2014) e doenças específicas como a acrodermatite enteropática, doença renal crônica e anemia falciforme (FERNANDO; ZHOU, 2015). Sua deficiência está associada com maior ocorrência de disfunções bioquímicas, imunológicas e clínicas, tais como retardo no crescimento, dermatites, anorexia, distúrbios de comportamento e aprendizado, inapetência, baixa imunidade, infertilidade e prejuízos no metabolismo da glicose (PRASAD, 2013).

Os parâmetros mais utilizados para avaliação do estado nutricional relativo ao Zn e, conseqüentemente, detecção de sua deficiência, são as medidas desse elemento no plasma, em componentes celulares do sangue (eritrócitos, monócitos, plaquetas, neutrófilos), no cabelo (a atividade de enzimas dependentes de Zn), bem como na excreção urinária. Normalmente, é utilizado mais de um biomarcador devido às baixas concentrações nos tecidos, e ao efetivo mecanismo homeostático para manutenção das concentrações plasmáticas e teciduais (SENA; PEDROSA, 2005).

O Zn é encontrado em mais de 300 enzimas necessárias em processos metabólicos essenciais, desempenhando funções estruturais, enzimáticas e reguladoras (PRASAD, 2014). Participa da síntese e degradação de carboidratos, lipídios e proteínas, na manutenção do crescimento e desenvolvimento normais, na função do sistema imune, na defesa antioxidante, além do envolvimento na atividade de enzimas que controlam processos de síntese de DNA (DESHPANDE; JOSHI; GIRI, 2013; PRASAD, 2013).

O Zn atua como cofator em processos antioxidantes, antiinflamatórios e antiapoptóticos (CRUZ; OLIVEIRA; MARREIRO, 2015), além de ser fundamental para a preservação da saúde e prevenção de doenças crônicas, incluindo o DM (RUTTKAY-NEDECKY et al., 2013). Estudos comprovaram que o Zn funciona como potente indutor da Metalotioneína (MT), uma proteína com potencial antioxidativo que também responsável pelo controle do conteúdo de Zn nos tecidos (CRUZ; OLIVEIRA; MARREIRO, 2015; NAZARIZADEH; ASRI-REZAEI, 2016).

Além disso, o Zn participa da estrutura da enzima SOD, que é a principal defesa antioxidante contra o radical superóxido e a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, sendo também fundamental para a função normal do sistema antioxidante endógeno, além de ser um potente estabilizador das membranas celulares, de proteínas estruturais e da sinalização celular (PRASAD, 2014). Mamíferos têm três isoformas desta enzima, mas apenas as isoformas CuZnSOD e SOD extracelular precisam de Zn como um cofator para sua atividade enzimática e para atuar, respectivamente, no espaço intracelular e nos fluidos extracelulares (CRUZ; OLIVEIRA; MARREIRO, 2015).

O Zn atua como antioxidante, por meio de mecanismos distintos: (1) inibição da atividade da NADPH oxidase, com consequente diminuição da geração de O_2^- ; (2) competição com o ferro e o cobre para ligação na membrana das células, diminuindo a produção de $\bullet OH$; (3) dismutação do O_2^- em H_2O_2 , catalizada pela SOD, enzima que apresenta o Zn como componente estrutural; (4) indução da produção da MT, que é rica em cisteína, portanto, um excelente sequestrador de $\bullet OH$ (OTEIZA, 2012; PRASAD, 2014).

Nessa perspectiva, pesquisas realizadas *in vivo* têm revelado que a deficiência de Zn favorece a manifestação de lesões oxidativas relacionadas à ação de EROs tanto em animais quanto em humanos (LIU et al., 2014; PRASAD, 2014). Dessa forma, a participação do Zn no sistema de defesa antioxidante tem sido amplamente investigada e pesquisas têm destacado o seu papel, prevenindo a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo (PRASAD, 2014; CRUZ; OLIVEIRA; MARREIRO, 2015).

2.5 Zinco e Diabetes Mellitus

Em 1934, foi descoberto que o Zn é um elemento integrante da estrutura cristalina da insulina, presente na fração microsomal das ilhotas de Langerhans, sugerindo sua importância na manutenção dos processos biológicos normais no corpo (SALGUEIRO et al., 2001). A propriedade da insulina em se complexar com o Zn foi demonstrada, *in vitro*, por Maske e Germany (1957), o que explicaria a influência desse mineral na solubilidade e armazenamento da insulina nos grânulos das células β pancreáticas.

Nesse sentido, Boquist et al. (1968) observaram uma redução na tolerância à glicose em ratos deficientes em Zn, sem alteração na produção de insulina. Outras pesquisas conduzidas por Quarterman, Mills e Humphries (1966) e Engelbart e Kief (1970) mostraram que a deficiência de Zn em animais estava associada à intolerância à glicose causada por prejuízos na secreção e na ação da insulina nos tecidos.

Simon e Taylor (2001) em modelo experimental com camundongos db/db fizeram um estudo comparativo entre uma dieta deficiente em Zn e outra suplementada. Os animais suplementados apresentaram diminuição da glicemia de jejum e maiores níveis plasmáticos de Zn. Os autores especularam sobre um possível envolvimento do Zn no controle glicêmico, mediado por efeitos nas células β pancreáticas e mecanismos de ação da insulina.

Outro importante aspecto investigado refere-se à influência do Zn na prevenção do diabetes. Tobia et al. (1998) constataram que o Zn pode ser efetivo na prevenção do início do DM em ratos propensos a desenvolver diabetes. Em estudos recentes com modelos animais, a suplementação de Zn apresentou efeito protetor contra a diabetes induzida (VARDATSIKOS; PANDEY; SRIVASTAVA, 2013; LIU et al., 2014; KAUR et al., 2014).

O Zn pode modular a transcrição do receptor de insulina por meio das proteínas (*zinc fingers protein*) necessárias para sua ligação. Essas estruturas possuem protusões que se assemelham a “dedos”, interagindo com a molécula de DNA e permitindo a transcrição gênica. Os sítios de ligação dessas proteínas são necessários para ativar a expressão do receptor de insulina, conforme demonstrado por Araki et al. (1991).

O Zn desempenha um papel fundamental na síntese, armazenamento e secreção de insulina, além de ser cofator da enzima carboxipeptidase H, a qual catalisa a conversão de pró-insulina (inativa) em insulina (ativa). No interior das células β pancreáticas, o Zn permanece ligado à insulina formando um complexo Zn^{2+} insulina, sendo secretado com esse hormônio. A remoção do Zn pode reduzir a atividade da insulina, devido a alterações na estrutura quaternária do hormônio; por outro lado, a adição de Zn favorece a fosforilação do

receptor de insulina tirosina-quinase e, dessa forma, potencializa o transporte de glicose para o interior das células (KAUR et al., 2014).

Tendo em vista o envolvimento do Zn no metabolismo da glicose, níveis adequados desse elemento podem prevenir ou atenuar as complicações associadas ao DM (JAYAWARDENA et al., 2012; KAUR et al., 2014). Uma revisão sistemática realizada por Ranasinghe et al. (2015b) concluiu que o Zn apresenta propriedades antioxidantes e que sua suplementação aumenta a atividade e os níveis das principais enzimas e proteínas antioxidantes, enquanto reduz significativamente a peroxidação lipídica, podendo dessa forma atrasar a progressão do DM, bem como retardar ou prevenir numerosas complicações micro e macrovasculares associadas com a doença.

Resultados provenientes de estudos com ratos sugerem que a suplementação de Zn melhora o nível de insulina e glicemia de jejum. Karmaker et al. (2009) e Yoshikawa et al. (2011) obtiveram melhora na tolerância à glicose com a suplementação de Zn em ratos diabéticos tipo 2. Okamoto et al. (2011) encontraram associação entre a oferta de ração com alta concentração de Zn a uma redução dos níveis plasmáticos de glicose em ratos diabéticos. Asri-Rezaei et al., (2015) estudando ratos diabéticos tipo 1 suplementados com Zn apresentaram melhora da hiperglicemia e da hipoinsulinemia.

Estudos com ratos KK-Ay, um modelo de diabetes tipo 2, administrando complexos de Zn obtiveram redução da HbA1c (ADACHI et al., 2007; FUJIMOTO; YASUI; YOSHIKAWA, 2013). A diminuição dos níveis de HbA1c em ratos diabéticos e suplementados com um complexo de Zn-diosmin pode ser devido à manutenção da homeostase normal da glicose, conforme resultados encontrados por Gopalakrishnan, Pillai e Subramanian (2015).

Em humanos, a suplementação de Zn tem sido investigada como uma terapêutica coadjuvante no tratamento do DM, no entanto, os resultados dessas intervenções são conflitantes (CAPDOR et al., 2013; TOMA; MAKONNEM; YIMER, 2013), principalmente porque foram utilizados diferentes compostos e doses de Zn, sem haver uma padronização (CHIMIANTI, 2013). Especialmente, no DM1 foi relatado um efeito negativo na homeostase da glicose em pacientes suplementados com Zn (CUNNINGHAM et al., 1994; De SENA et al., 2005). No Quadro 1 estão demonstrados alguns estudos com diferentes compostos de Zn.

Quadro 1. Tipos de estudos com diferentes compostos e doses de Zn.

Referência	Composto de Zn	Dose	Duração	Humanos/ Ratos
Cunningham et al., 1994	Sulfato	50 mg/dia	28 dias	Humanos DM1
Faure et al., 1995	Gluconato	30 mg/dia	3 meses	Humanos DM1
De Sena et al., 2005	Quelato	7,5-15 mg/dia	4 meses	Humanos DM1
Shidfar et al., 2010	Sulfato	10 mg/dia	12 semanas	Humanos DM1
Özcelik et al., 2012	Sulfato	30 mg/kg/dia	42 dias	Ratos DM1
Karatug, 2013	Sulfato	100 mg/kg/dia	60 dias	Ratos DM1
Asri-Rezaei et al., 2015	Cloreto	1,2-5mg/kg/dia	1 mês	Ratos DM1
Nazarizadeh; Asri-Rezaei, 2016	Sulfato	30 mg/kg/dia	56 dias	Ratos DM1

Embora os mecanismos exatos pelos quais a suplementação do Zn previna as complicações diabéticas não estejam bem esclarecidos, algumas possibilidades, incluindo efeito semelhante à insulina e papel antioxidante têm sido implicadas (MIAO et al., 2013; KAUR et al., 2014). Estudos com animais que avaliaram o efeito da suplementação de Zn em marcadores de estresse oxidativo e de inflamação apontam um papel favorável na defesa antioxidante (VIJAYARAGHAVAN et al., 2013; LIU et al., 2014).

Um estudo realizado por Li et al. (2011) verificou que a suplementação de Zn em ratos diabéticos aumentou a atividade de SOD, diminuindo a peroxidação lipídica, protegendo o fígado contra danos oxidativos. Zhu et al. (2013) mostrou que ratos diabéticos suplementados com Zn tiveram um aumento na atividade de SOD e redução no MDA, concluindo que concentrações baixas de Zn no organismo prejudica o sistema de defesa antioxidante.

Os parâmetros bioquímicos mais utilizados na dosagem de Zn em pacientes diabéticos têm sido as medidas no plasma, soro, eritrócitos e urina. De uma maneira geral, esses resultados devem ser interpretados considerando-se o tempo de duração da doença, o controle metabólico e as complicações quando existentes (SALGUEIRO et al., 2001). Nessa abordagem, diversas pesquisas têm evidenciado alterações nos parâmetros bioquímicos de avaliação do Zn em pacientes diabéticos. Esses estudos mostram concentrações plasmáticas, eritrocitárias e séricas desse mineral reduzidas, normalmente associadas à disfunção no sistema de defesa antioxidante enzimático (JANSEN; KARGES; RINK, 2009; CRUZ; OLIVEIRA; MARREIRO, 2015).

Em pacientes diabéticos, têm-se evidenciado o risco aumentado para a deficiência sérica do Zn, atribuída às perdas excessivas na urina, diminuição na capacidade intestinal de absorção ou baixa ingestão dietética, sendo reportados hipozincemia e hiperzincúria em pacientes portadores de DM (CHIMIANTI, 2013; FERNANDO; ZHOU, 2015). Especula-se que a hiperglicemia desencadeia um aumento das perdas urinárias de Zn, diminuindo os níveis desse elemento no plasma, afetando a capacidade das células β pancreáticas de produzir e secretar insulina. Nesse sentido, a perda excessiva do Zn na urina pode ser a principal causa de níveis deficientes desse elemento em diabéticos (MIAO et al., 2013; JUROWSKI et al., 2014) e devido ao risco para desenvolver a deficiência nesses indivíduos, estudos sugerem a necessidade de suplementação de Zn (RANASINGUE et al., 2015a; PIAO et al., 2016).

Duas revisões sistemáticas com pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2 concluíram que a suplementação com diferentes compostos de Zn melhorou o controle glicêmico nos diabéticos tipo 2, evidenciada por menores valores de glicemia de jejum e pós-prandial e redução da HbA1c, entretanto, não foram reportados resultados semelhantes quanto a HbA1c em diabéticos tipo 1 (JAYAWARDENA et al., 2012; CAPDOR et al., 2013). Além disso, outras revisões sistemáticas concluíram que a suplementação de Zn apresentou efeitos favoráveis sobre o perfil lipídico, com diminuição nos níveis de CT (Colesterol Total), *Low Density Lipoprotein-C* (C-LDL) e Triglicerídeo (TG), além do aumento do *High Density Lipoprotein-C* (C-HDL), confirmando o efeito hipolipemiante do Zn no DM2 (JAYAWARDENA et al., 2012; RANASINGHE et al., 2015b).

Entretanto, analisando uma revisão sistemática, a suplementação de Zn não apresentou efeitos benéficos no perfil lipídico dos indivíduos, sendo relatado um efeito adverso com diminuição dos níveis de C-HDL nos indivíduos saudáveis e suplementados (FOSTER; PETOCZ; SAMMAN, 2010). Outro estudo conduzido por Kasai et al. (2012), observou que a suplementação excessiva de Zn reduziu a função renal em ratos. Além dessas reações adversas, doses elevadas de Zn, acima do recomendado, podem induzir deficiência de cobre e reduzir enzimas antioxidantes (CAPDOR et al., 2013).

Considerando tais resultados, ressalta-se a importância das padronizações das quantidades de Zn administradas, considerando as necessidades desse mineral, que variam segundo o estado de saúde ou doença, além do limite superior tolerável permitido (SENA; PEDROSA, 2005). Também é importante ressaltar que os efeitos benéficos da suplementação de Zn só são obtidos em situações de deficiência (DRISKELL; WOLINSKY, 2006), bem como algumas das reações adversas citadas na literatura ocorreram em indivíduos sadios

suplementados sem deficiência, de modo que, tal observação serve de alerta para o uso indiscriminado da suplementação de Zn.

2.6 Diabetes Mellitus, Zinco e Transtornos Comportamentais

Estudos apontam que o diabetes está relacionado a uma prevalência aumentada de transtornos psiquiátricos, dentre os quais se destacam a depressão e a ansiedade (ROTELLA; MANNUCCI, 2013; PETRAK et al., 2015). A depressão tem sido postulada por desempenhar um papel causal na emergência do diabetes, sendo relatado um risco aumentado de 60% de indivíduos depressivos em desenvolver diabetes (BALHARA, 2011). Da mesma forma, a prevalência de transtornos de ansiedade entre pacientes diabéticos é consideravelmente maior em comparação com a população em geral (HUANG et al., 2012). Entretanto, a maioria dos estudos têm se concentrado na depressão e poucos estudos associam a ansiedade ao risco de desenvolver diabetes (BALHARA, 2011).

Além das complicações custos diretos e indiretos, o diabetes acarreta custos intangíveis, como dor, ansiedade e alguns estados emocionais que contribuem para uma diminuição da qualidade de vida dos seus portadores. A ansiedade está predominantemente relacionada ao medo e à preocupação ligados a diversos eventos ou atividades do dia a dia. Esse quadro, ao dificultar os cuidados do paciente com o diabetes, prejudica sua vida em outros aspectos, levando a complicações da doença (MOTA et al., 2016). Em contraste, a depressão está fortemente relacionada a um estado anedônico, no qual um indivíduo é marcadamente afetado por sentimentos de tristeza e desesperança (STRANDBERG et al., 2014).

Observações experimentais e clínicas sugeriram que o Zn está envolvido na fisiopatologia da depressão e ansiedade (SZEWCZYK et al., 2008; MLYNIEC et al., 2014). Estudos pré-clínicos demonstraram um comportamento do tipo depressivo mais expressivo em animais diabéticos induzidos (WAYHS et al., 2013; DE MORAIS et al., 2014). Animais deficientes em Zn apresentaram comportamentos depressivos e, além disso, a deficiência prejudicou a eficácia de antidepressivos, indicando que esse elemento apresenta uma relação importante no desenvolvimento da depressão e da ansiedade e a restauração dos níveis normais do Zn pode reverter esses sintomas em modelos animais (TASSABEHJI et al., 2008; WHITTLE; LUBEC; SINGEWALD, 2009).

Diferentes compostos de Zn, tais como o Sulfato e o Cloreto foram utilizados para testar as propriedades antidepressivas em vários testes comportamentais. Os resultados encontrados sugerem que o Zn pode potencializar a ação dos antidepressivos, além de reduzir

seus efeitos colaterais, de forma que sua suplementação apresenta efeito terapêutico (CUNHA et al., 2008; SZEWCZYK et al., 2009). Dados de estudos pré-clínicos relacionam a deficiência de Zn a possível causa de comportamento do tipo ansiogênico, que foi observado em animais submetidos a testes comportamentais (TAKEDA et al., 2007; WHITTLE; LUBEC; SINGEWALD, 2009). Dessa forma, estudos vêm elucidando se o baixo teor de Zn contribui para o desenvolvimento de sintomas depressivos ou se os baixos níveis desse elemento são uma consequência dos mecanismos que levam à depressão (BALHARA, 2011).

Um estudo com pacientes depressivos e suplementados com Sulfato de Zn, associados a medicamentos, observou que a suplementação de Zn em conjunto com drogas antidepressivas reduziu os sintomas depressivos (RANJBAR et al., 2014). A diminuição do Zn sérico associado à depressão tem sido observado (SIWEK et al., 2013) e foi demonstrado através de uma meta-análise (SWARDFAGER et al., 2013). Contudo, existem estudos clínicos contrários a esses resultados. Nguyen et al. (2009) observaram em seu estudo com mulheres que não há correlação entre a presença de sintomas depressivos e os níveis de Zn. De modo semelhante, os resultados obtidos por Grønli, Soulé e Bramham (2013), em pacientes idosos, com diferentes diagnósticos psiquiátricos, mostraram que os pacientes sem depressão apresentaram maior déficit de Zn. Também alguns outros grupos de pacientes deprimidos não apresentaram alterações nos níveis de Zn sérico (IRMISCH; SCHLAEFKE; RICHTER, 2010).

Comparado a outros órgãos, o cérebro presumivelmente contém os mais altos níveis de Zn no corpo, embora a distribuição do Zn não seja uniforme, sendo mais abundante no hipocampo, amígdala, córtex cerebral e bulbos olfatórios (PAOLETTI et al., 2009). Há indícios de que a deficiência de Zn leva a alterações no funcionamento do SNC, especialmente na transmissão glutamatérgica no sistema límbico e no córtex cerebral, que desempenham um papel importante na etiopatogenia da depressão (MLYNIEC et al., 2014). Alguns autores supõem que a deficiência de Zn e a depressão possam compartilhar uma fisiopatologia comum (SZEWCZYK et al., 2009; MLYNIEC et al., 2014).

Os compostos de Zn podem modular um número de ligações iônicas, tais como o ácido gama-aminobutírico (GABAA), N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e cainato (KA), e podem também afetar os receptores de serotonina (VERAN et al., 2012; SATAŁA et al., 2015). Ao influenciar esses receptores nas áreas específicas do cérebro, o Zn modula indiretamente a plasticidade sináptica, regulando a transdução de sinais neuronais e outros processos, como a memória e o aprendizado (PAOLETTI et al., 2009). Além disso, o Zn afeta a labilidade

emocional, funções psicomotoras, irritabilidade e outras funções emocionais e cognitivas (SWARDFAGER et al., 2013).

Estudos clínicos relataram que pacientes depressivos apresentaram níveis de glicose em jejum elevada (KAHN et al., 2011) e tolerância à glicose prejudicada (HENNINGSS et al., 2010) quando comparados a outros pacientes, indicando que a depressão também é um fator de risco para desencadear algum tipo de diabetes (GOLDEN et al., 2008). Entretanto, um estudo conduzido por Strandberg et al. (2014) demonstrou que entre adultos com diabetes tipo 1, a depressão, ansiedade e bem-estar geral não estavam significativamente relacionados com o controle glicêmico.

Nesse sentido, estudos comportamentais vêm sendo desenvolvidos em modelos animais, devido à facilidade de controle das variáveis e para avaliação de aspectos específicos do comportamento por meio de testes e protocolos experimentais. Tais modelos são utilizados com a finalidade de provocar nos animais um estado semelhante à ansiedade humana, sendo medida por sinais exteriores, como a atividade exploratória, locomotora e social que podem ser avaliados através de testes específicos (LANDEIRA-FERNANDEZ; CRUZ, 2007).

A maior parte dos testes comportamentais em modelos animais existentes até o momento possui boa validade preditiva, ou seja, são especificamente sensíveis a substâncias ansiolíticas já comprovadamente eficazes. Dentre esses, está o Teste do Nado Forçado (TNF) baseado no modelo ou paradigma de “desespero comportamental” (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977). Esse teste é amplamente empregado na investigação de novos fármacos ou substâncias com potencial atividade antidepressiva e para avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na fisiopatologia ou tratamento da depressão (MLYNIEC et al., 2014).

No TNF, ratos ou camundongos são expostos a uma situação supostamente aversiva chamada de nado forçado: nadar em um tanque cilíndrico com uma quantidade de água que impeça o apoio das patas no fundo do cilindro e que impeça a fuga pela borda superior. No início do teste, os animais nadam e fazem movimentos de escalar as paredes internas do cilindro e com o passar do tempo adotam uma postura de imobilidade. A imobilidade, também chamado inibição comportamental, que é tido como comportamento do tipo depressivo (MLYNIEC et al., 2014), é diminuída pelo tratamento com antidepressivos de diferentes classes farmacológicas (SUGIMOTO et al., 2011).

Estudos pré-clínicos demonstraram que o tratamento agudo e crônico com Zn produz efeito antidepressivo em roedores no TNF (NOWAK et al., 1999; NOWAK et al., 2003). O tratamento combinado de Sulfato de Zn associado com medicamentos antidepressivos reduziu significativamente o tempo de imobilidade de ratos no TNF, sugerindo que o Zn pode

umentar o potencial de ação dos antidepressivos, além de reduzir seus efeitos colaterais (SZEWCZYK et al., 2009). Devido a facilidade de uso, confiabilidade e especificidade, esse teste é o mais utilizado para avaliação de atividade antidepressiva em ratos (SLATTERY; CRYAN, 2012).

Segundo Nunes e Hallak (2014), para investigar modelos animais de ansiedade, são utilizados testes etológicos que se baseiam em combinações de um comportamento não condicionado, naturalmente motivado, com um estímulo aversivo para criar um conflito ou ansiedade no animal, sendo amplamente utilizados o Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e o Teste de Campo Aberto (CA). Dentre os comportamentos mais observados nos testes comportamentais estão o medo, a defecação, o congelamento (*freezing*), a autolimpeza (*grooming*) e a aversão a ambientes abertos e expostos, que caracterizam ambientes desprotegidos e por isso, menos explorados pelos animais, como por exemplo, os braços abertos do LCE e o centro do CA (PELLOW et al., 1985).

O LCE é um teste pré-clínico comumente utilizado para o estudo do comportamento de ansiedade em ratos, proposto pela primeira vez por Handley e Mithani (1984). Pela sua simplicidade, validade etológica e sensibilidade bidirecional (utilizado para drogas ansiolíticas e ansiogênicas), esse modelo apresenta inúmeras vantagens no estudo da ansiedade, sendo um modelo animal validado do ponto de vista farmacológico, bioquímico e comportamental como teste de ansiedade em ratos (PELLOW et al., 1985).

O LCE consiste em um labirinto em forma de cruz com dois braços abertos e dois braços fechados, dispostos perpendicularmente uns aos outros, formando uma cruz e elevados do solo. O arranjo dos braços permite que os animais percebam simultaneamente o precipício e o espaço aberto (FUNCHAL; DANI, 2014). O LCE permite detectar a atividade ansiolítica/ansiofênica de uma variedade de substâncias. Estímulos ansiofênicos reduzem a proporção de tempo de exploração dos braços abertos em relação ao tempo total de exploração, enquanto estímulos ansiolíticos aumentam esta proporção (LAPIZ-BLUHM et al., 2008). A suplementação de Cloreto de Zn em ratos promoveu efeitos ansiolíticos, evidenciado pelo aumento do tempo de permanência e maior número de entradas nos braços abertos no Teste do Labirinto em Cruz Elevado (JOSHI et al., 2012).

No Teste de Campo Aberto (CA) descrito por Candland e Campbell (1962), são avaliados vários efeitos de substâncias, dentre as quais a atividade locomotora e a expressão de emoções como medo e ansiedade. A ambulação nesse aparato pode ser avaliada para verificar se o tempo de imobilidade no TNF é decorrente de alterações na locomoção do animal causadas pela dose dos tratamentos aplicados. O teste de CA é considerado como um

bom modelo animal de ansiedade, por sua sensibilidade bidirecional a tratamentos farmacológicos, podendo avaliar o comportamento semelhante à ansiedade em várias espécies de animais (NESTLER et al., 2010).

O Teste do CA é realizado em uma arena circular ou quadrada cercada por paredes transparentes, com o assoalho marcado com pequenos quadrados, permitindo a quantificação da atividade locomotora do animal. Os animais são colocados nessa arena e seu comportamento é analisado para que se possam identificar mudanças após a administração de alguma substância (FUNCHAL; DANI, 2014). Nesse teste, segundo Archer (1973), avalia-se a emoção e a atividade exploratória: número de levantamentos e autolimpezas, tempo na periferia como na área central e número de quadrados percorridos.

No CA, em seu comportamento normal, os roedores tendem a evitar a área central desprotegida e concentrar sua deambulação perto das paredes. Segundo Prut e Belzung (2003) um aumento no número de linhas cruzadas indica aumento na locomoção e exploração e/ou um menor nível de ansiedade. A alta frequência do número de entradas nos quadrantes centrais e do tempo gasto na área central indica alto comportamento exploratório e baixos níveis de ansiedade (STANFORD, 2007; RAMOS et al., 2008). Takeda et al. (2007) observaram o aumento do comportamento ansioso em ratos deficientes em Zn, através da menor ambulação e da menor imobilidade no Teste de Campo Aberto.

Nesse sentido, a realização de estudos experimentais envolvendo a suplementação de Zn em ratos diabéticos contribui substancialmente para uma melhor compreensão dos transtornos comportamentais, especificamente a depressão e a ansiedade, além de serem essenciais para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas de tratamento. Dessa forma, a escolha dos testes utilizados para avaliação dessas alterações deve considerar a confiabilidade, sensibilidade, especificidade e a validação em modelo animal, de modo a contribuir para o entendimento dessas alterações comportamentais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Trata-se de uma pesquisa de caráter experimental *in vivo*, ensaio não clínico, realizada mediante a suplementação de Zn em modelo animal com DM1 induzido.

3.2 Aspectos Éticos

Os cuidados com os animais foram conduzidos de forma a minimizar o sofrimento e limitar o número de espécimes necessário às investigações, de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011).

Todos os procedimentos adotados estão em concordância com os princípios preconizados pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA, de acordo com a Resolução Normativa nº 30/2016, e o presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob o nº 045/2015 (Anexo A).

3.3 Animais

Foram utilizados 64 ratos machos, com 90 dias de vida, massa corporal entre 250 ± 30 g, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), procedentes do biotério Thomas George (UFPB). Considerando-se uma mortalidade de 20% dos animais devido à indução química do DM1, foi necessário um reajuste quanto ao número dos animais diabéticos (SANTOS, 2015).

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX) e os animais foram alocados individualmente em gaiolas metabólicas de aço inoxidável e mantidos em condições padrões de iluminação (ciclo claro/escuro, 12/12 horas) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), de acordo com as recomendações para roedores (MERUSSE; LAPICHICK, 1996). Foram ofertadas ração comercial (Presence, Paulínea, São Paulo) e água filtrada *ad libitum*. Após uma semana de aclimação, os animais foram randomizados em dois grupos e estes subdivididos em três grupos, conforme a Figura 8.

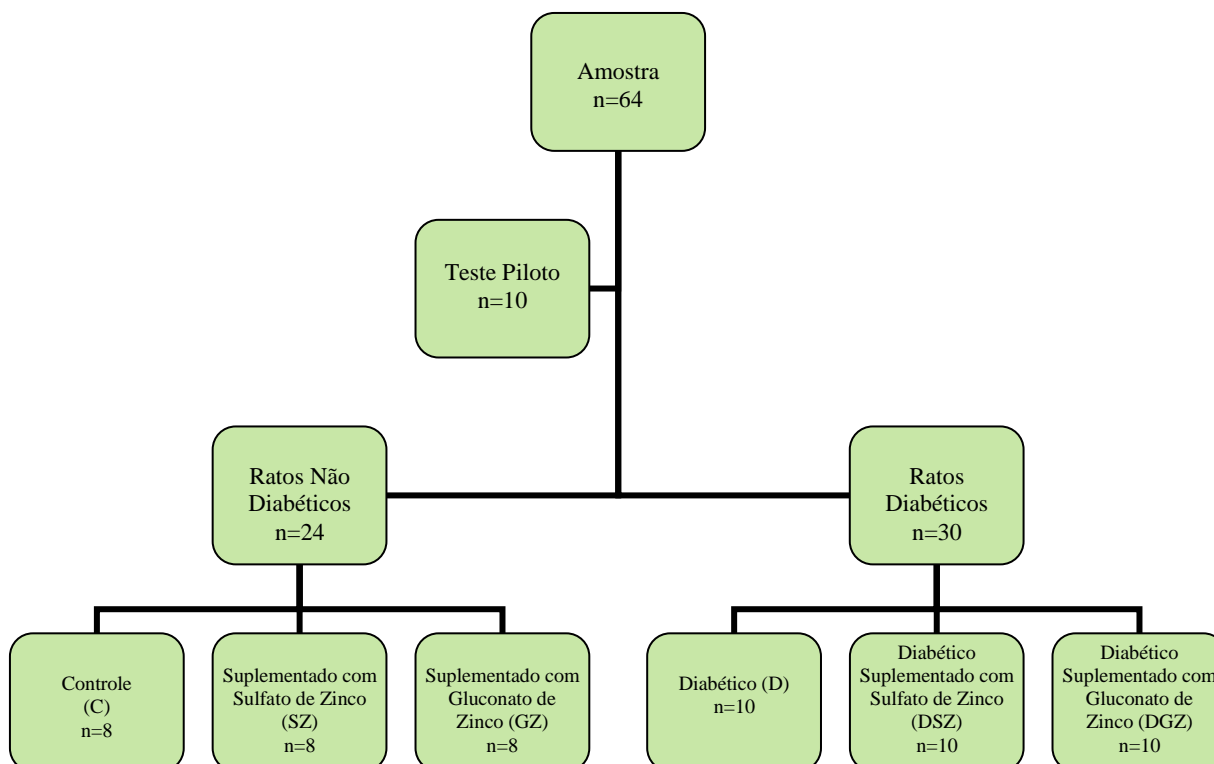


Figura 8. Fluxograma das divisões e subdivisões dos grupos experimentais.

3.4 Protocolo para Indução do DM1 por STZ

- **Teste Piloto**

Inicialmente, foi realizado um teste piloto para acompanhamento da sobrevivência dos animais, após a indução do DM1, e ajustes do protocolo, utilizando 10 ratos. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e água disponível *ad libitum* (VIEIRA, 2015). Após este período, foi administrada uma solução de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), dissolvida em tampão citrato (0,1 M, pH=4,5), na dose única de 65 mg/kg de massa corporal, via intraperitoneal (ANARKOOLLI; GANJI; POURHEIDAR, 2014).

Três dias após a indução, os animais que obtiverem glicemia superior a 250 mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos nos grupos experimentais (SANTOS et al., 2014). Foi observado que, após a indução, metade dos animais diabéticos não sobreviveram as quatro semanas necessárias a realização do experimento, sendo necessário um reajuste para a diminuição da dose de STZ de 65 mg/kg para 50 mg/kg de massa corporal (SANTOS et al., 2014).

- **Ensaio Biológico**

Após reajuste da dose e definição do novo protocolo, foi realizado o procedimento para indução química do DM nos animais dos grupos D, DSZ e DGZ. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e água disponível *ad libitum* (VIEIRA, 2015). Após este período, foi administrada uma solução de estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), dissolvida em tampão citrato (0,1 M, pH=4,5), na dose única de 50 mg/kg de massa corporal, via intraperitoneal (SANTOS et al., 2014). Os grupos C, SZ e GZ receberam doses equivalentes do tampão citrato (0,1 M, pH=4,5) via intraperitoneal, sem a STZ (Figura 9).

Os animais receberam solução de glicose 5% como única fonte hídrica (bebedouros), durante as 48 horas seguintes, conforme descrito por Vieira (2015). Três dias após a indução, os animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos nos grupos experimentais (SANTOS et al., 2014). Os animais que apresentaram glicemia inferior a 200 mg/dL foram reinduzidos, uma semana depois, seguindo o mesmo protocolo (SCRIDON et al., 2015).

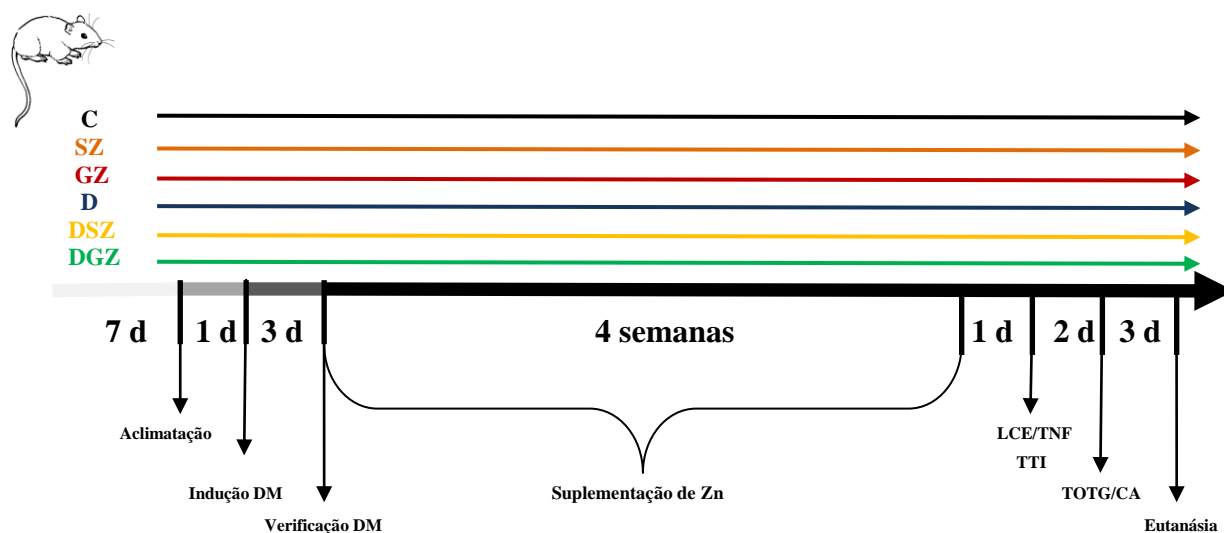


Figura 9. Delineamento do ensaio biológico.

Legenda: LCE: Labirinto em Cruz Elevado; TNF: Teste do Nado Forçado; TTI: Teste de Tolerância à Insulina; TOTG: Teste Oral de Tolerância à Glicose; Teste do Campo Aberto.

3.5 Protocolo para Suplementação de Zinco

Os animais dos grupos SZ e DSZ receberam a suplementação de Sulfato de Zn e os animais dos grupos GZ e DGZ receberam a suplementação de Gluconato de Zn, ambas administradas no período da manhã, na dose de 15 mg/kg de massa corporal/dia, via gavagem, uma vez ao dia, durante 4 semanas (SAPOTA et al., 2014). A escolha da dose utilizada respeitou o limite máximo preconizado para roedores (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2001), bem como foi baseada em estudo prévio que preconizou a mesma dose para os dois compostos (SAPOTA et al., 2014). Os animais dos grupos C e D passaram pelo estresse da gavagem com 2 mL de água filtrada, conforme metodologia proposta por Rodrigues (2012), durante o mesmo período dos demais grupos.

3.6 Avaliação dos Parâmetros

3.6.1 Sintomas Clássicos do DM1

O estado geral dos animais foi observado diariamente, para detectar sinais de dor ou desconforto, incluindo desidratação, perda de massa corporal superior a 10% do peso inicial, postura anormal, espasmos ou tremores (GRAHAM et al., 2011).

Os sintomas clássicos do diabetes (perda de massa corporal, polifagia, polidipsia e poliúria), além do acompanhamento da glicemia de jejum, foram monitorados semanalmente, no mesmo período da manhã. A aferição da massa corporal foi feita em balança eletrônica digital (Marca Toledo, modelo 8217, São Bernardo do Campo, São Paulo), capacidade máxima 15 kg e precisão de 0,005 kg. A aferição da glicemia de jejum foi realizada, após jejum de 8 horas. Coletou-se uma amostra de sangue, após incisão na ponta da cauda e foi feita a verificação da glicemia utilizando glicosímetro Accu Check Active® (Roche Diagnóstica Ltda., São Paulo, Brasil) conforme instruções descritas no equipamento.

O consumo alimentar foi calculado pela diferença, em gramas, entre o alimento oferecido e o residual. Para essa determinação utilizou-se a fórmula: consumo = quota oferecida – (rejeito sujo + rejeito limpo). Foi considerado rejeito sujo o alimento que não foi ingerido e ficou na tela da gaiola metabólica (área externa) e rejeito limpo o alimento que não foi ingerido e permaneceu na área interna da gaiola (VADIVEL; PUGALENTI, 2010).

A ingestão hídrica (mL/24h) foi calculada subtraindo a quantidade ingerida da quantidade ofertada nos bebedouros individuais e a diurese (mL/24h) foi calculada medindo a

quantidade de urina contida no becker individual, ambas verificadas utilizando provetas com capacidade volumétrica de 100 mL (PEREIRA et al., 2011).

3.6.2 Parâmetros Comportamentais

Após o período da suplementação, foram realizados os testes comportamentais. Para tal, foram mantidas as condições ideais: atenuação dos níveis de ruído, baixa intensidade de iluminação e temperatura controlada ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Meia hora antes dos experimentos, os animais foram conduzidos, em gaiolas de polietileno, à sala de teste para aclimatação e adaptação. O Teste do LCE foi realizado no período da manhã, no Laboratório de Psicofarmacologia, e o Teste do NF foi realizado no período da tarde, no LANEX da UFPB; enquanto o Teste do CA foi realizado no dia seguinte, no período da manhã, no Laboratório de Psicofarmacologia da UFPB.

- Avaliação do comportamento ansioso

A atividade ansiolítica foi avaliada pelo Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), no qual o conflito comportamental é baseado na necessidade do animal em explorar o ambiente e o potencial perigo que ele oferece (PELLOW et al., 1985). O LCE permite detectar a atividade ansiolítica/ansio gênica de uma variedade de substâncias, já que estímulos ansio gênicos reduzem a proporção de tempo de exploração dos braços abertos em relação ao tempo total de exploração, enquanto estímulos ansiolíticos aumentam esta proporção (LAPIZ-BLUHM et al., 2008).

O aparato (marca Insight, Madeira, EP 151, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) consiste numa plataforma com dois braços abertos (50 x 10 cm) perpendiculares a dois braços fechados (50 x 10 x 50 cm), formando uma cruz e elevados 50 cm do solo. Circundando os braços abertos há uma borda de acrílico de 1 cm de altura com a finalidade de evitar quedas nos animais (Figura 10).

Cada animal foi posicionado no centro do equipamento, com a face voltada para um dos braços fechados e foi permitida a exploração do equipamento durante 5 minutos. Um observador realizou as anotações referentes ao número de entradas e tempo de permanência dos animais nos braços abertos (EBA e TBA) e outro observador realizou as anotações referentes ao número de entradas e tempo de permanência nos braços fechados (EBF e TBF).

Antes e depois da exposição de cada animal, foi realizada a limpeza do aparato com álcool etílico à 10% e toalhas de papel, deixando-o secar naturalmente.



Figura 10. Aparato Labirinto em Cruz Elevado, Laboratório de Psicofarmacologia da UFPB. Fonte própria.

- Avaliação do comportamento depressivo

A atividade antidepressiva foi avaliada pelo Teste do Nado Forçado (TNF), através da observação do comportamento animal diante de uma situação de estresse incondicionado (PORSOLT et al., 1979). Os parâmetros observados são a mobilidade e a imobilidade, este último também chamado de inibição comportamental, caracteriza um comportamento do tipo depressivo (MLYNIEC et al., 2014).

Foi utilizado um cilindro (30 cm de diâmetro e 50 cm de altura), com água na profundidade de 30 cm e temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), (Figura 11). Os animais foram conduzidos para a antessala do LANEX, nas gaiolas metabólicas, onde permaneceram por 30 min. Após esse tempo, os animais foram colocados individualmente no cilindro com água e submetidos ao teste durante 5 minutos, em uma única sessão, sendo avaliados o comportamento ativo (nado e escalada) e comportamento passivo (imobilidade), segundo Slattery e Cryan (2012). As avaliações foram realizadas por dois observadores e filmadas, transferidas posteriormente para o computador e analisadas detalhadamente. Ao término do teste, os animais foram secos com toalhas de pano. Antes e depois da exposição de cada animal, foi realizada a troca da água e a limpeza do aparato com álcool etílico à 10%, deixando-o secar naturalmente.



Figura 11. Aparato do Nado Forçado, Laboratório de Nutrição Experimental da UFPB. Fonte própria.

- Avaliação da capacidade exploratória

A atividade exploratória foi avaliada pelo Teste de Campo Aberto (CA) descrito por Candland e Campbell (1962), utilizado para avaliação de compostos estimulantes ou depressores do SNC. Os parâmetros indicativos de um alto comportamento exploratório e baixos níveis de ansiedade estão relacionados com um maior número de ambulação nos quadrantes (STANFORD, 2007; RAMOS et al., 2008).

O aparato (marca Insight, EP 154, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), consiste em uma caixa circular, de acrílico transparente, medindo 50 cm de altura e 60 cm de diâmetro. O piso, de acrílico branco (100 cm x 80 cm), é dividido em círculos concêntricos (15, 34 e 55 cm de raio) e linhas radiais, na cor preta, formando 12 quadrantes de áreas semelhantes (Figura 12).

Os animais foram colocados, individualmente, no centro do aparelho e durante 5 minutos foram observados os seguintes comportamentos: para o registro da ambulação foi utilizado um contador manual (número de entradas do animal com as quatro patas em qualquer um dos quadrados), *rearing* (número de vezes que o animal se levanta sobre as patas traseiras, ficando perpendicular ao solo), *grooming* (número de vezes que o animal realiza a autolimpeza), tempo de imobilidade (completa imobilidade do animal) e número de bolos fecais. Para cada comportamento avaliado, havia um observador específico, totalizando quatro observadores, devidamente treinados. Antes e depois da exposição de cada animal, foi

realizada a limpeza do aparato com álcool etílico à 10% e toalhas de papel, deixando-o secar naturalmente.

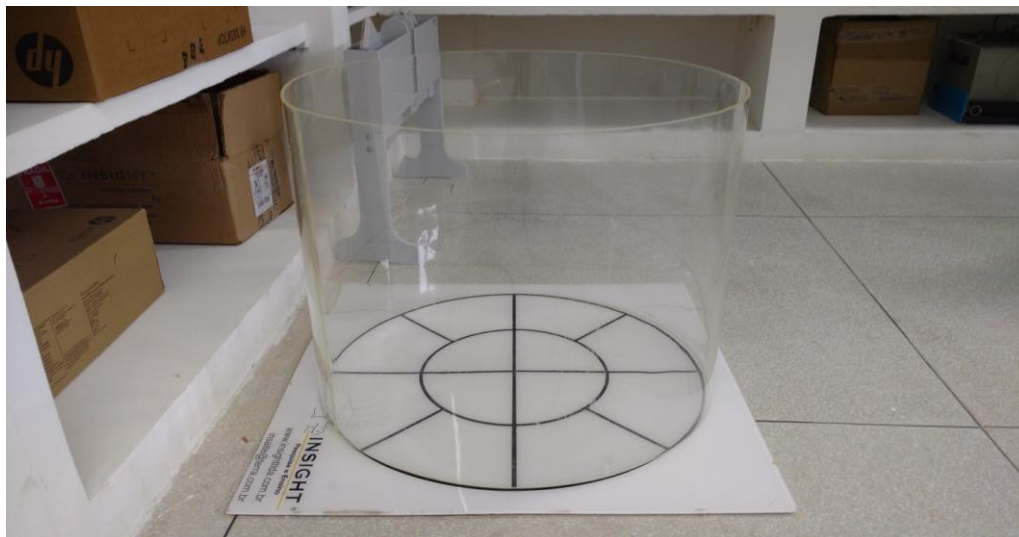


Figura 12. Aparato de Campo Aberto, Laboratório de Psicofarmacologia da UFPB. Fonte própria.

3.6.3 Teste de Tolerância à Insulina (TTI)

Após as quatro semanas de suplementação, foi realizado o TTI, com os animais aos 120 dias de idade. O TTI foi realizado pela manhã, com os animais alimentados normalmente. Foi administrada 0,75 UI de insulina/kg, diluída em solução salina 0,9% estéril, via intraperitoneal. Após incisão na ponta da cauda, coletou-se uma amostra de sangue e foi feita a verificação da glicemia utilizando glicosímetro Accu Check Active® (Roche Diagnóstica Ltda., São Paulo, Brasil), nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos.

3.6.4 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

No dia seguinte a realização do TTI, foi realizado o TOTG, com os animais aos 120 dias de idade. O TOTG foi realizado pela manhã, após jejum de 8 horas. Foi administrada uma solução de 25% de glicose, na dose de 2 g de glicose/kg, via gavagem. Após incisão na ponta da cauda, coletou-se uma amostra de sangue e foi feita a verificação da glicemia utilizando glicosímetro Accu Check Active® (Roche Diagnóstica Ltda., São Paulo, Brasil), nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos.

3.6.5 Eutanásia e Medidas Murinométricas

As medidas murinométricas foram aferidas imediatamente, antes da eutanásia, de acordo com Novelli et al. (2007). Após jejum de 8 horas, os animais foram anestesiados com quetamina (25 mg/kg) associado com xilazina (25 mg/kg) por via intraperitoneal. Após anestesia, a profundidade anestésica foi verificada pela ausência de reflexo de pinçamento plantar e da cauda.

Utilizando fita antropométrica inelástica (Sanny, São Paulo, Brasil) foram aferidas a circunferência abdominal (imediatamente anterior à pata traseira), a circunferência torácica (imediatamente posterior à pata dianteira) e o comprimento nasoanal (medido do nariz até a base da cauda). Com base nessas medidas, foram calculados os seguintes índices:

- **Índice de massa corporal (IMC)** - Calculado a partir da relação entre massa corporal (g)/comprimento nasoanal (cm²), de acordo com Novelli et al. (2007).
- **Índice de Lee** – Calculado a partir da relação entre a raiz cúbica da massa corporal e o comprimento nasoanal do animal [$\sqrt[3]{\text{Massa (g)/comprimento nasoanal (cm)}}$], de acordo com Bernardis e Patterson (1968).

Confirmada a ausência de reflexos, foi realizada a laparotomia para coleta de sangue por punção cardíaca direta, retirando aproximadamente 4 mL de sangue para a realização das análises bioquímicas e foi feita a retirada dos órgãos de interesse para as análises histológicas. As amostras de sangue foram centrifugadas a 805 x g, por 20 minutos, para a separação do plasma, o qual foi armazenado a -80°C para a realização das análises bioquímicas.

3.6.6 Parâmetros Bioquímicos

A realização das análises bioquímicas e de estresse oxidativo, foram feitas no Laboratório de Estudos Aplicado ao Desempenho e Saúde (LEADS) da UFPB. Os parâmetros bioquímicos dos animais saudáveis foram baseados no estudo de Castelo Branco et al. (2011).

- **Enzimas hepáticas e renais**

As atividades da Alanina Amino Transferase (ALT) e da Aspartato Amino Transferase (AST) foram quantificadas em modo cinético referente ao Institute for Reference Materials and Measurements, por meio dos kits comerciais ALT Liquiform e AST Liquiform

(Labtest®, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. As concentrações foram determinadas no analisador automático Labmax 240 premium (Minas Gerais, Brasil), no comprimento de onda 340nm.

As concentrações de creatinina foram quantificadas por meio do kit comercial Creatinina K, conforme instruções do fabricante (Labtest®, Minas Gerais, Brasil), no comprimento de onda 510nm. As concentrações de ácido úrico foram quantificadas pelo método Enzimático-Trinder, por meio do kit comercial Ácido Úrico Liquiform, conforme instruções do fabricante (Labtest®, Minas Gerais, Brasil). A absorbância foi obtida no comprimento de onda 520 nm. As concentrações de uréia foram quantificadas por meio do kit comercial Uréia UV Liquiform, conforme instruções do fabricante (Labtest®, Minas Gerais, Brasil). A absorbância foi obtida no comprimento de onda 340nm.

- **Glicose Sanguínea**

As concentrações de glicose sanguínea foram determinadas através do método enzimático colorimétrico da glicose oxidase (GOD-Trinder), através do kit comercial Glicose PAP Liquiform (Labtest®, Minas Gerais, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. A absorbância foi obtida no analisador automático Labmax 240 premium (Minas Gerais, Brasil), no comprimento de onda 505nm.

- **Hemoglobina Glicada (HbA1c)**

As concentrações de HbA1c foram determinadas através do método enzimático colorimétrico da hemoglobina glicada no sangue total, através do kit comercial Hemoglobina Glicada (Laborclin®, Paraná, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 604 *x g*, por 5 minutos, a 20°C e o sobrenadante e a hemoglobina total foram utilizados para a realização da leitura em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Curitiba, Brasil) a um comprimento de onda de 415 nm.

- **Triglicerídios, Colesterol Total e frações**

As concentrações plasmáticas de Colesterol Total e HDL foram determinadas através dos métodos Enzimático-Trinder e Colorimétrico-acelerador detergente seletivo, por meio dos

kits comerciais específicos Colesterol Liquiform e HDL LE (Labtest®, Minas Gerais, Brasil), respectivamente. Seguindo as instruções do fabricante, a absorbância foi obtida no analisador automático Labmax 240 premium (Minas Gerais, Brasil) no comprimento de onda 500 e 600nm, respectivamente.

Os valores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-C) foram estimados pelas equações de Friedewald, Levy e Fredrickson (1972): [LDL-C= (CT – HDL-C) – (TG/5)] e [VLDL-C= TG /5]

Os valores de triglicerídios foram determinados através do método Enzimático-Trinder, por meio do kit comercial Triglicerídios Liquiform (Labtest®, Minas Gerais, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. A absorbância foi obtida no analisador automático Labmax 240 premium (Minas Gerais, Brasil), no comprimento de onda 505nm.

- **Capacidade Antioxidante Total (CAOT)**

Para a preparação do homogenato do fígado e do rim, partes de cada órgão foram pesadas e picotadas com tesoura, homogeneizadas em 4 mL de KCL a 10% (1:4), centrifugada a 5433 *xg*, por 20 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram usados para as análises.

Imediatamente após a coleta, as amostras de plasma foram colocadas em microtubos protegidos da luminosidade. A análise foi baseada no método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) no qual uma alíquota de 1,25 mg de 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) foi diluída em 100 mL de etanol (álcool etílico absoluto 99,5%), mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram adicionados 3,9 mL da solução de DPPH a 100 µL de plasma em tubos, que em seguida foram agitados em vórtex e deixados em repouso por 30 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 6708 *xg*, por 15 minutos, a 20°C e o sobrenadante utilizado para a realização da leitura em espectrofotômetro (Biospectro SP-22, Curitiba, Brasil) a um comprimento de onda de 515 nm. Os resultados foram expressos como percentual da atividade antioxidante (AOA), de acordo com a fórmula:

$$AOA = 100 \cdot [DPPH.R]_t / [DPPH.R]_B \cdot 100$$

onde, [DPPH.R]_t e [DPPH.R]_B correspondem as concentrações de DPPH remanescentes após 30 minutos, avaliadas na amostra (t) e no branco (B) preparado com água destilada.

- **MDA**

Para a preparação do homogenato do fígado e do rim, partes de cada órgão foram pesadas e picotadas com tesoura, homogeneizadas em 4 mL de KCL a 10% (1:4), centrifugadas a $5433 \times g$, por 20 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram usados para as análises.

Os níveis de peroxidação foram quantificados por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, conforme método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Para isso, amostras de 250 µl do plasma, 250 µl do fígado e 250 µl do rim foram incubadas em banho maria a 37°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram precipitadas com ácido perclórico AA 35% e centrifugadas a $13148 \times g$, por 20 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos onde se adicionou 400µl de ácido tiobarbitúrico a 0,6% e incubados a 100°C por 60 minutos. Após resfriamento, os materiais foram lidos em espectrofotômetro ultravioleta (Bioespectro, modelo SP 22, Brasil) a um comprimento de onda de 532nm, em temperatura ambiente.

3.6.7 Avaliação do Estresse Oxidativo em Músculo Esquelético

O músculo esquelético de sóleo e EDL foram homogeneizados em tampão frio (50 mM-TRIS e 1 mM-EDT, contendo 1 mM de ortovanadato de sódio e 1,1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonilo-PMSF) usando um homogeneizador de amostras. Os homogenatos foram centrifugados a $1.180 \times g$ por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes tiveram seu teor de proteína avaliado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Os níveis de peroxidação foram quantificados por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, conforme método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979). Trezentos µg de proteína foram misturados sequencialmente a 30% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e tampão Tris 10 mM, pH 7,4. Esta mistura foi centrifugada a $2.500 \times g$ durante 10 min e o sobrenadante foi fervido durante 15 min com 0,73% (p/v) de ácido tiobarbitúrico. O pigmento rosa produzido foi medido a RT de absorção a 535 nm e os resultados expressos em mmol/mg de proteína.

A determinação da SOD foi realizada de acordo com Misra e Fridovich (1972). Resumidamente, trezentos µg de proteína foram adicionados a tampão de Carbonato a 0,05 M com EDTA a 0,1 mM, pH 10,2. A reação foi iniciada com epinefrina 150 mM e a atividade da SOD determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina a 30°C. A diminuição da

absorvância foi seguida durante 1,5 min a 480 nm e os resultados expressos como U/mg de proteína (HUANG et al. 2012).

A atividade da GST foi medida conforme descrito anteriormente por Habig e Pabst (1974). Trezentos µg de proteína foram incubados num tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 contendo EDTA 1 mM a 30°C e o ensaio foi iniciado com 1 mM de 1 cloro-2,4-dinitrobenzeno e 1 mM de GSH. A formação de 2,4-dinitrofenil-S-glutathiona foi monitorada a absorvância de 340 nm, e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de proteína necessária para catalisar a formação de 1 µmol de 2,4-dinitrofenil-S-glutathiona (BORTOLIN et al., 2015).

3.6.8 Análises Histológicas

O fígado, rim e cérebro de cada animal foram pesados e imediatamente fixados em formol tamponado a 10%, armazenados em recipientes codificados e acondicionados em refrigeração. Após 72 horas, as amostras foram enviadas para a realização das análises histológicas, efetuadas no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os órgãos foram processados e incluídos em parafina. A partir de então, foram submetidos a microtomia para obtenção de cortes semi seriados de 3µm de espessura. As lâminas obtidas foram coradas pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Gomori, sendo esta última coloração utilizada apenas para as lâminas renais com a finalidade de classificar possíveis glomerulonefrites e observar possíveis alterações da matriz extracelular. Em seguida, realizou-se a montagem das lâminas para análise em microscópio óptico comum (Motic, BA200). Na análise hepática e renal, as lesões de interesse foram especialmente as inflamatórias e as degenerativas; na análise cerebral, avaliou-se a presença de neurônios isquêmicos, hemorragia e vasos dilatados. Todas as lâminas foram avaliadas duplo cego, por dois patologistas, de forma independente para a emissão do resultado histológico.

3.7 Controle de Biossegurança

Antes da execução do projeto, todos os membros estavam com as vacinas atualizadas (Antitetânica e Hepatite A e B) e durante a execução do estudo a equipe utilizou diariamente os EPI's (Equipamentos de Proteção Individual) conforme procedimento padrão exigido pelo LANEX. O descarte das carcaças dos animais, dos resíduos biológicos e dos materiais

perifurocortantes foi realizado em conformidade com a Resolução n° 358/05 da CONAMA e na RDC 306/04 da ANVISA.

3.8 Análise dos Dados

Os resultados foram analisados no software Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Os dados foram testados quanto à normalidade mediante o Teste de Kruskal-Wallis. Os dados obtidos nos testes comportamentais foram analisados pelo Teste de Mann-Whitney. Os dados de ingestão alimentar, massa corporal, TTI e TOTG foram submetidos ao teste ANOVA *Two Way*. Os demais dados foram analisados pelo teste ANOVA *One Way* seguido do *post-hoc* de Tukey. O nível de significância aceito foi de $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

ABE-MATSUMOTO, L. T.; SAMPAIO, G. R.; BASTOS, D. H. M. Suplementos vitamínicos e/ou minerais: regulamentação, consumo e implicações à saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v.31, n.7, p.1371-1380, 2015.

ADACHI, Y. et al. Antidiabetic zinc (II)-N-acetyl-L-cysteine complex: evaluations of in vitro insulinomimetic and in vivo blood glucose-lowering activities. **BioFactors**, v.29, n.4, p.213-223, 2007.

ALQAHTANI, N. et al. Use of glycated hemoglobin in the diagnosis of diabetes mellitus and pre-diabetes and role of fasting plasma glucose, oral glucose tolerance test. **International Journal of Preventive Medicine**, v.4, n.9, p.1025-1029, 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v.40, Suppl1, p.S1-S135, 2017.

ANARKOOLI, J.; GANJI, I. B.; POURHEIDAR, H. M. The protective effects of insulin and natural honey against hippocampal cell death in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Diabetes Research**, v. 2014, article ID 491571, 8 pages, 2014.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v.21, n.2, p.205-235, 1973.

ARAKI, E. et al. A cluster of four Sp1 binding sites required for efficient expression of the human insulin receptor gene. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.6, p.3944-3948, 1991.

ASRI-REZAEI, S. et al. Effects of crocin and zinc chloride on blood levels of zinc and metabolic and oxidative parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v.5, n.5, p.403-412, 2015.

ATKINSON, M. A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.2, n.11, p.1-18, 2012.

AYEPOLA, O. R.; BROOKS, N. L.; OGUNTIBEJU, O. O. **Oxidative Stress and Diabetic Complications: The Role of Antioxidant Vitamins and Flavonoids, Antioxidant-Antidiabetic Agents and Human Health**, Prof. Oluwafemi Oguntibeju (Ed.), InTech, 2014.

BALHARA, Y. S. Diabetes and psychiatric disorders. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.15, n.4, p.274-283, 2011.

BAO, B. et al. Zinc decreases C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammatory cytokines in elderly subjects: a potential implication of zinc as an atheroprotective agent. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, n.6, p.1634-1641, 2010.

BEGIN-HEICK, N. et al. Zinc supplementation attenuates insulin secretory activity in pancreatic islets of the ob/ob mouse. **Diabetes**, v.34, n.2, p.179-84, 1985.

BELLE, T. L. et al. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiological Reviews**, v.91, n.1, p.79-118, 2011.

BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v.1, n.9, p.1-14, 2011.

BENDING, D.; ZACCONE, P.; COOKE, A. Inflammation and type one diabetes. **International Immunology**, v.24, n.6, p.339-346, 2012.

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

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**, v.464, n.7293, p.1293-1300, 2010.

BOUTIST, L. et al. Insulin biosynthesis, storage and secretion: pancreatic islet cells and islet cells. *Lakartidningen*. v.65, p.3603-3607, 1968. Apud: Chausmer, A.B. Zinc, insulin and diabetes. **Journal of the American College of Nutrition**, v.17, p.109-115, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, Issue1-2, p.248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRASIL. **Resolução ANVISA - RDC 306, de 7 de dezembro de 2004**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

BRASIL. **Resolução COMANA 358, de 29 de abril de 2005**. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigitel Brasil 2014. **Saúde Suplementar: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde Suplementar. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 165 p.:il.

BRITO, V. B. et al. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the aminolevulinic acid dehydratase activity in mice. **Nutrition**, v.23, p.818-826, 2007.

BORTOLIN, R. H. et al. Protection against T1DM-induced bone loss by zinc supplementation: biomechanical, histomorphometric, and molecular analyses in STZ-induced diabetic rats. **PLoS One**, v.10, n.5, p.1-18, 2015.

CASGRAIN, A. et al. Micronutrient bioavailability research priorities. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, n.5, p.1423-1429, 2010.

CANDLAND, D. K.; CAMPBELL, B. A. Development of fear in the rat as measured by behavior in the open field. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, v.55, n.4, p.593-596, 1962.

CASTELO BRANCO, A. C. S. et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.15, n.2, p.209-214, 2011.

CAPDOR, J. et al. Zinc and glycemic control: a meta-analysis of randomised placebo controlled supplementation trials in humans. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.27, n.2, p.137-142, 2013.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25, 2013.

CERNEA, S.; DOBREANU, M. Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. **Biochemical Medicine**, v.23, n.3, p.266-280, 2013.

CHIMIANTI, F. Zinc, pancreatic islet cell function and diabetes: new insights into an old story. **Nutrition Research Reviews**, v.26, n.1, p.1-11, 2013.

CHOWDHURY, T. A. Diabetes and cancer. **Quartely Journal of Medicine**, v.103, n.12, p.905-915, 2010.

COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. Parte 1: recomendações de nutrientes. In: Cozzolino SMF, organizadora. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3^a ed. São Paulo: Manole; 2009. p.12-45.

COPPIETERS, K. T. et al. Immunology in the clinic review series: focus on type 1 diabetes and viruses: the role of viruses in type 1 diabetes: a difficult dilemma. **Clinical & Experimental Immunology**, v.168, n.1, p.5-11, 2012.

CRUZ; K. J. C.; OLIVEIRA, A. R. S.; MARREIRO, D. N. Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v.6, n.2, p.333-337, 2015.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.23, Issue5, p.238-245, 2002.

CUNHA, M. P. et al. Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. **Progress in Neuro-Psychopharmacol & Biological Psychiatry**, v.32, n.8, p.1913-20, 2008.

CUNNINGHAM, J. J. et al. Hyperzincuria in individuals with insulin-dependent diabetes mellitus: concurrent zinc status and the effect of high-dose zinc supplementation. **Metabolism**, v.43, n.12, p.1558-1562, 1994.

DCCT RESEARCH GROUP. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v.329, p.977-86, 1993.

DEEDS, M. C. et al. Single dose streptozotocin induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratory Animals**, v.45, n.3, p.131-140, 2011.

DELMASTRO, M. M.; PIGANELLI, J. D. Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. **Clinical and Developmental Immunology**, v.2011, p.1-15, 2011.

DE MORAIS, H. et al. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. **Behavioural Brain Research**, v.1, n.258, p.52-64, 2014.

DE SENA, K. C. M. et al. Effects of zinc supplementation in patients with type 1 diabetes. **Biological Trace Element Research**, v.105, n.1, p.1-9, 2005.

DESHPANDE, J. D.; JOSHI, M. M.; GIRI, P. A. Zinc: the trace element of major importance in human nutrition and health. **International Journal of Medical Science and Public Health**, v.2, n.1, p.1-6, 2013.

DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA – DBCA. Brasília – DF, 2016.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES/SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. (2017-2018) / Organização José Egidio Paulo de Oliveira, Renam Magalhães Monteiro Júnior, Sérgio Vencio - São Paulo: Editora Clannad, 2017.

DRISKELL, A.; WOLINSKY, I. **Sports Nutrition: vitamins and trace elements**. 2^a ed. Flórida: Taylor & Francis Group LLC, 2006. 360p.

ELEAZU, C. O. et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v.12, n.60, p.1-7, 2013.

ENGELBART, K.; KIEF, H. The functional behavior of zinc and insulin contained in the pancreatic beta-cells of rats. **Virchow's Archives of Cell Pathology**, v.4, n.4, p.294-302, 1970.

EVANS, D. A. P. Conjoint clinic on drugs and genes. **Journal of Chronic Diseases**, v.18, 1Suppl, p.59-76, 1965.

FERNANDO, J.; ZHOU, S. The role of zinc in renal pathological changes in diabetic status. **Journal of Nutritional Disorders & Therapy**, v.5, n.3, p.1-8, 2015.

FERRARI, C. K. B. Total antioxidant capacity (TAC) in clinical, experimental and nutritional studies. **Journal of the Health Sciences Institute**, v.28, n.4, p.307-310, 2010.

FILE, S. E.; MABBUTT, P. S.; HITCHCOTT, P. K. Characterisation of the phenomenon of “one-trial tolerance” to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v.102, n.1, p.98-101, 1990.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, World Health Organization. **Human vitamin and mineral requirements**. Rome: Food and nutrition division FAO, 2001.

FOOD AND NUTRITION BOARD/INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes of Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon and Zinc**. Washington DC: National Academy Press; 2002.

FORGA, L.; GOÑI, M. J. Luces y sombras en la epidemiología de la diabetes de tipo 1. **Avances en Diabetología**, v.82, n.2, p.1-7, 2014.

FORLENZA, G. P.; REWERS, M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v.18, n.4, p.248-251, 2011.

FOSTER, M.; PETOCZ, P.; SAMMAN, S. Effects of zinc on plasma lipoprotein cholesterol concentrations in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Atherosclerosis**, v.210, n.2, p.344-352, 2010.

FRANCIOSI, M. et al. Costs of treatment and complications of adult type 1 diabetes. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v.23, n.7, p.606-611, 2013.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, n.6, p.499-502, 1972.

FUJIMOTO, S.; YASUI, H.; YOSHIKAWA, Y. Development of a novel antidiabetic zinc complex with an organoselenium ligand at the lowest dosage in KK-Ay mice. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.121, p.10-15, 2013.

FUNCHAL, C.; DANI, C. **Neurociências: modelos experimentais em animais**. Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA: EDIPUCRS, 2014. 280p.

GAUTAM, S.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of B-carotene-rich vegetables on the bioaccessibility of zinc and iron from food grains. **Food Chemistry**, v.122, n.3, p.668-672, 2010.

GEISER, J.; DE LISLE, R. C.; ANDREWS, G. K. The zinc transporter zip5 (Slc39a5) regulates intestinal zinc excretion and protects the pancreas against zinc toxicity. **PLoS ONE**, v.8, n.11, p.1-11, 2013.

GOLDEN, S. H. et al. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. **Journal of the American Medical Association**, v.299, n.23, p.2751-2759, 2008.

GOPALAKRISHNAN, V.; PILLAI, S. I.; SUBRAMANIAN, S. P. Synthesis, spectral characterization, and biochemical evaluation of antidiabetic properties of a new zinc-diosmin complex studied in high fat diet fed-low dose streptozotocin induced experimental type 2 diabetes in rats. **Biochemistry Research International**, v.2015, Article ID 350829, 11 pages, 2015.

GRAHAM, M. L. et al. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. **Comparative Medicine**, v.61, n.4, p.356-360, 2011.

GRØNLI, J.; SOULÉ, J.; BRAMHAM, C.R. Sleep and protein synthesis-dependent synaptic plasticity: impacts of sleep loss and stress. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.7, n.224, p.1-18, 2013.

GROOP, L.; POCIOT, F.; Genetics of diabetes. Are we missing the genes or the disease? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.382, n.1, p.726-739, 2014.

GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. **Institute of Laboratory Animal Resources**. National Academy of Sciences, Washington, D.C., Estados Unidos, 2011. 246p.

GUNASEKARA, P. et al. Effects of zinc and multiminer vitamin supplementation on glycemic and lipid control in adult diabetes. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, v.26, n.4, p.53-60, 2011.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.249, n.22, p.7130-7139, 1974.

HAGMEYER, S.; HADERSPECK, J. C.; GRABRUCKER, A. M. Behavioral impairments in animal models for zinc deficiency. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v.8, n.443, p.1-16, 2015.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.327, Issue1, p.1-5, 1984.

HENNINGS, J. M. et al. Glucose tolerance in depressed inpatients, under treatment with mirtazapine and in healthy controls. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v.118, n.2, p.98-100, 2010.

HUANG, M. et al. Abnormalities in the brain of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats revealed by diffusion tensor imaging. **Neuroimage Clinical**, v.1, n.1, p.57-65, 2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas** [Internet]. 7 ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2015.

INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care** v.32, p.1327-1334, 2009.

IRMISCH, G.; SCHLAEFKE, D.; RICHTER, J. Zinc and fatty acids in depression. **Neurochemical Research**, v.35, n.9, p.1376-1338, 2010.

ISLAM, M. R. et al. Is serum zinc level associated with prediabetes and diabetes?: A cross-sectional study from Bangladesh. **PLoS ONE**, v.8, n.4, p.1-9, 2013.

JANSEN, J.; KARGES, W.; RINK, L. Zinc and diabetes-clinical links and molecular mechanisms. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.20, n.6, p.399-417, 2009.

JAYAWARDENA, R. et al. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.4, n.13, p.1-11, 2012.

JONIETZ, E. Pathology: cause and effect. **Nature**, v.485, p.S10–S11, 2012.

JUROWSKI, K. et al. Biological consequences of zinc deficiency in the pathomechanisms of selected diseases. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.19, n.7, p.1069-1079, 2014.

JOSHI, M. et al. Effect of zinc in animal models of anxiety, depression and psychosis. **Human and Experimental Toxicology**, v.31, n.2, p.1237-1243, 2012.

KAHN, L. S. et al. Fasting blood glucose and depressive mood among patients with mental illness in a medicaid managed care program. **Depression Research and Treatment**, v.2011, p.1-4, 2011.

KAMBE, T.; HASHIMOTO, A.; FUJIMOTO, S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.71, n.17, p.3281-3295, 2014.

KANWAR, Y. S. et al. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. **Annual Review of Pathology**, v.6, p.395-423, 2011.

KARMAKER, S. et al. A zinc (II)/poly(γ -glutamic acid) complex as an oral therapeutic for the treatment of type-2 diabetic KK-Ay mice. **Macromolecular Bioscience**, v.9, n.3, p.279-286, 2009.

KASAI, M. et al. Excessive zinc intake increases systemic blood pressure and reduces renal blood flow via kidney angiotensin II in rats. **Biological Trace Element Research**, v.150, n.1, p.285-290, 2012.

KAUR, K. et al. Zinc: the metal of life. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, n.14, p.358-376, 2014.

KELLEHER, S. L. et al. Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. **American Society for Nutrition**, v.2, p.101-111, 2011.

KHARROUBI, A. T.; DARWISH, H. M. Diabetes mellitus: the epidemic of the century. **World Journal of Diabetes**, v.6, n.6, p.850-867, 2015.

KING, A. J. The use of animal models in diabetes research. **British Journal of Pharmacology**, v.166, n.3, p.877-894, 2012.

KLOUBERT, V.; RINK, L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. **Food & Function**, v.6, n.10, p.3195-3204, 2015.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; CRUZ, A. P. M. Medo e dor e a origem da ansiedade e do pânico. **Intersecções entre Neurociência e Psicologia**, p.217-239, 2007.

LAPIZ-BLUHM, M. D. S. et al. Behavioural assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v.20, n.10, p.1115-1137, 2008.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin induced diabetes. **Diabetologia**, v.51, n.2, p.216-226, 2008.

LI, Y. et al. Exposure to the chinese famine in early life and the risk of metabolic syndrome in adulthood. **Diabetes Care**, v.34, n.4, p.1014-1018, 2011.

LI, B. et al. The role of zinc in the prevention of diabetic cardiomyopathy and nephropathy. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v.23, n.1, p.27-33, 2013.

LIU, F. et al. Zinc supplementation alleviates diabetic peripheral neuropathy by inhibiting oxidative stress and upregulating metallothionein in peripheral nerves of diabetic rats. **Biological Trace Element Research**, v.158, n.2, p.211-218, 2014.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v.4, n.8, p.118-126, 2010.

LÖNNERDAL, B. Dietary factors influencing zinc absorption. **Journal of Nutrition**, v.130, n.5, p.1378s-83s, 2000.

LUIPPOLD, G. et al. Short- and longterm glycemic control of streptozotocin-induced diabetic rats using different insulin preparations. **PLoS ONE**, v.11, n.6, p.1-12, 2016.

LIUZZI, J.; BLANCHARD, R.; COUSINS, R. Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. **Journal of Nutrition**, v.131, n.1, p.46-52, 2000.

LUTTY, G. A. Effects of diabetes on the eye. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.54, n.14, p.81-87, 2013.

MASKE, H.; GERMANY, M. Interaction between insulin and zinc in the islets of Langerhans. **Diabetes**, v.6, n.4, p.335-341, 1957.

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.5-18, 2012.

MERUSSE, J. L. B.; LAPICHICK, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: COMISSÃO DE ENSINO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: EPM, p.15-25, 1996.

MIAO, X. et al. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. **Frontiers in Medicine**, v.7, n.1, p.31-52, 2013.

MLYNIEC, K. et al. Essential elements in depression and anxiety. Part I. **Pharmacological Reports**, v.66, n.4, p.534-544, 2014.

MORAES, I. B. et al. Polyploidy analysis and attenuation of oxidative stress in hepatic tissue of STZ-induced diabetic rats treated with an aqueous extract of *vochysia rufa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, Article ID 316017, 8 pages, 2015.

MOTA, J. M. S. et al. Redução de ansiedade com grupo de diabéticos: interfaces físicas e psicológicas de uma intervenção. **Gerai, Revista Interinstitucional de Psicologia**, v. 9, n. 2, p.312-323, 2016.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (U.S.). Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc**. Washington, DC: National Academy Press, 2001. National Research Council (U.S.). Washington, DC, 11-79.

NAUDI, A. et al. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. **Experimental Diabetes Research**, v.2012, p.1-14, 2011.

NAZARIZADEH, A.; ASRI-REZAEI, S. Comparative study of antidiabetic activity and oxidative stress induced by zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate in diabetic rats. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.17, v.4, p.834-843, 2016.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v.13, n.10, p.1161-1169, 2010.

NGUYEN, P. et al. Micronutrient supplementation may reduce symptoms of depression in Guatemalan women. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.59, n.3, p.278-286, 2009.

NOKOFF, N.; REWERS, M. Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. **Annals of the New York Academy of Science**, v.1281, n.1, p.1-15, 2013.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animal**, v.41, n.1, p.111-119, 2007.

NOWAK, G.; SCHLEGEL-ZAWADZKA, M. Alterations in serum and brain trace element levels after antidepressant treatment: part I. Zinc. **Biological Trace Element Research**, v.67, Issue1, p.85-92, 1999.

NOWAK, G. et al. Effect of zinc supplementation on antidepressant therapy in unipolar depression: a preliminary placebo-controlled study. **Polish Journal of Pharmacology Impact & Description**, v.55, n.6, p.1143–1147, 2003.

NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v.17, n.3, p.528-543, 2014.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, n.2, p.351-358, 1979.

OKAMOTO, T. et al. Effect of zinc in early graft failure following intraportal islet transplantation in rat recipients. **Annals of Transplantation**, v.16, n.3, p.114-120, 2011.

OTEIZA, P. I. Zinc and the modulation of redox homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.53, n.9, p.1748-1759, 2012.

ÖZCELİK, D. et al. Zinc supplementation attenuates metallothionein and oxidative stress changes in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biological Trace Element Research**, v.150, n.1, p.342-349, 2012.

OWU, D. U. et al. Comparative effect of type 1 and type 2 diabetes mellitus on vascular responses of rat thoracic aorta to potassium ion channel openers. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v.3, n.3, p.748-759, 2013.

PAOLETTI, P. et al. Zinc at glutamatergic synapses. **Neuroscience**, v.158, n.1, p.126-136, 2009.

PASQUALOTTO, K. R.; ALBERTON, D.; FRIGERI, H. R. Diabetes mellitus and complications. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p.134-145, 2012.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, n.3, p.149–167, 1985.

PETRAK, F. et al. Depression and diabetes: treatment and health-care delivery. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v.3, n.6, p.472-485, 2015.

PEREIRA, S. C. L. et al. Desenvolvimento de um biscoito tipo cookie a base de soja/aveia e avaliação de seus efeitos metabólicos em ratos diabéticos. **Revista do Médico Residente**, v.13, n.2, p.97-107, 2011.

PIAO, M. et al. Zinc supplementation ameliorates ER stress and autophagy in liver in a rat model of type 2 diabetes mellitus. **Biomedical Research**, v.27, n.4, p.1075-1081, 2016.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et the Thérapie**, v.229, n.2, p.327-336, 1977.

PORSOLT, R. D. Animal model of depression. **Biomedicine**, v.30, p.139-140, 1979.

PRASAD, A. S. Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. **Advances in Nutrition**, v.4, n.2, p.176-190, 2013.

PRASAD, A. S. Zinc is an antioxidant and anti-inflammatory agent: its role in human health. **Frontiers in Nutrition**, v.1, p.14, 2014.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v.463, n.1, p.3-33, 2003.

QUARANTA, P. et al. Co-Transplantation of endothelial progenitor cells and pancreatic islets to induce long-lasting normoglycemia in streptozotocin-treated diabetic rats. **PLoS ONE**, v.9, n.4, e94783, 2014.

QUARTERMAN, J.; MILLS, C.; HUMPHRIES, W. The reduced of and sensitivity to insulin in Zn deficient rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.25, n.3, p.354-358, 1966.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.50, n.5, p.567-575, 2011.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARNI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemotherapy Reports**, v.29, p.91-98, 1963.

RAMOS, A. et al. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. **Behavioural Brain Research**, v.193, n.2, p.277-288, 2008.

RANASINGHE, P. et al. Effects of zinc supplementation on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. **Nutrition & Metabolism**, v.12, n.26, p.1-16, 2015a.

RANASINGHE, P. et al. Zinc and diabetes mellitus: understanding molecular mechanisms and clinical implications. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, n.1, p.1-23, 2015b.

REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v.22, n.4, p.359-370, 2005.

REAL, J.T. et al. Increased oxidative stress levels and normal antioxidant enzyme activity in circulating mononuclear cells from patients of familial hypercholesterolemia. **Metabolism**, v.59, n.2, p. 293-298, 2010.

REGNÉLL, S. E.; LERNMARK, A. The environment and the origins of islet Autoimmunity and Type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, v.30, n.2, p.155-160, 2012.

REIS, J. S. et al. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.7, p.1096-1105, 2008.

RIBEIRO, M. A. et al. Zinc absorption in Brazilian subjects fed a healthy meal. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v.27, n.2, p.313-320, 2013.

- RODRIGUES, A. F. **Efeito da suplementação de zinco e do treinamento físico sobre o controle de peso e o metabolismo glicêmico em ratas ovariectomizadas.** 2012. 78 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências da Nutrição) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.
- RONCAROLO, M. G.; BATTAGLIA, M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. **Nature Reviews Immunology**, v.7, n.8, p.585-598, 2007.
- ROOHANI, N. et al. Zinc and its importance for human health: an integrative review. **Journal of Research in Medical Sciences**, v.18, n.2, p.144-157, 2013.
- ROTELLA, F.; MANNUCCI, E. Depression as a risk factor for diabetes: a metaanalysis of longitudinal studies. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.74, n.1, p.31-37, 2013.
- RUTTER, G. A. et al. Intracellular zinc in insulin secretion and action: a determinant of diabetes risk? **Proceedings of the Nutrition Society**, v.75, n.1, p.61-72, 2016.
- RUTTKAY-NEDECKY, B. et al. The role of metallothionein in oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n.13, p.6044-6066, 2013.
- SADI, G.; KARTAL, D. I.; GURAY, T. Regulation of glutathione S-Transferase Mu with type 1 diabetes and its regulation with antioxidants. **Turkish Journal of Biochemistry**, v.38, n.1, p.92-100, 2013.
- SAKATA, N. et al. Animal models of diabetes for islet transplantation. **Experimental Diabetes Research**, v.11, n.2012, p.1-11, 2012.
- SALGUEIRO, M. J. et al. Zinc and diabetes mellitus: is there a need of zinc supplementation in diabetes mellitus patients? **Biological Trace Element Research**, v.81, n.3, p.215-228, 2001.
- SANTOS, R. X, et al. Insulin therapy modulates mitochondrial dynamics and biogenesis, autophagy and tau protein phosphorylation in the brain of type 1 diabetic rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease**, v.1842, n.7, p.1154-1166, 2014.
- SANTOS, M. A. B. **Efeito do tratamento com antioxidantes sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas observadas em um modelo animal de diabetes.** 2015. 94p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2015.
- SAPOTA, A. et al. The bioavailability of different zinc compounds used as human dietary supplements in rat prostate: a comparative study. **BioMetals**, v.27, n.3, p.495-505, 2014.
- SCRIDON, A. et al. Aortic rings of wistar rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus display time-dependent changes in contractility, endothelium-dependent and - independent relaxation. **Acta Endocrinologica-Bucharest**, v.9, n.3, p.276-283, 2015.

SENA, K. M. C.; PEDROSA, L. F. C. Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. **Revista de Nutrição**, v.18, n.2, p.251-259, 2005.

SETO, S. W. et al. Diabetes mellitus, cognitive impairment, and traditional chinese medicine. **International Journal of Endocrinology**, v.2015, p.1-14, 2015.

SHEIKH-ALI, M.; CHEHADE, J. M.; MOORADIAN, A. D. The antioxidant paradox in diabetes mellitus. **American Journal of Therapeutics**, v.18, n.3, p.266-278, 2011.

SHESHALA, R.; PEH, K.K.; DARWIS, Y. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of insulin-loaded PLA-PEG microspheres for controlled parenteral drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.35, n.11, p.1364-1374, 2009.

SIMON, S. F.; TAYLOR, C. G. Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/db mice. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.1, p.43-51, 2001.

SIWEK, M. et al. Zinc as a marker of affective disorders. **Pharmacological Reports**, v.65, n.13, p.1512-1518, 2013.

SKYLER, J. S. Immunomodulation for type 1 diabetes mellitus. **International Journal of Clinical Practice**, v.1, n.166, p.59-63, 2010.

SLATTERY, D.A; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v.7, n.6, p.1009-1014, 2012.

SMITH, A. G.; SINGLETON, J. R. Diabetic neuropathy, **Continuum** (Minneapolis Minn), v.18, n.1, p.60-84, 2012.

SOCARRÁS, T. J. O. **Influência do diabetes tipo 1 no reparo de lesões produzidas por implantes intraperitoneais e subcutâneos em ratos Wistar**. 2014. 101f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Patologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

SOCHOR, J. et al. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. **Molecules**, v.15, n.12, p.8618-8640, 2010.

STANFORD, S. C. The open field test: reinventing the wheel. **Journal of Psychopharmacology**, v.21, n.2, p.134-135, 2007.

STECK, A. K.; REWERS, M. J. Genetics of type 1 diabetes. **Clinical Chemistry**, v.57, n.2, p.176-185, 2011.

STRANDBERG, R. B. et al. Relationships of diabetes-specific emotional distress, depression, anxiety, and overall well-being with HbA1c in adult persons with type 1 diabetes. **Journal of Psychosomatic Research**, v.77, n.3, p.174-179, 2014.

SUGIMOTO, Y. et al. Differences between mice strain in response to paroxetine in the forced swimming test: Involvement of serotonergic or noradrenergic system. **European Journal of Pharmacology**, v.15, n.672, p.1-3, 2011.

- SUN, Q. et al. Dysregulation of hepatic zinc transporters in a mouse model of alcoholic liver disease. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.307, n.3, p.313-322, 2014.
- SWARDFAGER, W. et al. Zinc in depression: a meta-analysis. **Biological Psychiatry**, v.74, n.12, p.872-878, 2013.
- SZEWCZYK, B. et al. Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. **Pharmacology Reports**, v.60, n.5, p.588-599, 2008.
- SZEWCZYK, B. et al. The involvement of serotonergic system in the antidepressant effect of zinc in the forced swim test. **Progress in Neuro-psychopharmacol & Biological Psychiatry**, v.33, n.2, p.323-329, 2009.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO). NEPAUNICAMP, 2011. 4ª edição, 161p.
- TAKEDA, A. et al. Anxiety-like behavior of young rats after 2-week zinc deprivation. **Behavioural Brain Research**, v.177, n.1, p.1-6, 2007.
- TASSABEHJI, N. M. et al. Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats. **Physiology & Behavior**, v.95, n.3, p.365-369, 2008.
- TOBIA, M. H. et al. A. The role of dietary zinc in modifying the onset and severity of spontaneous diabetes in the BB wistar rat. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.63, n.3, p.205-213, 1998.
- TOMA, A.; MAKONNEN, E.; YIMER, G. Role of zinc in diabetes mellitus, oxidative stress and other human healthy: a review article. **American Journal of Research Communication**, v.1, n.11, p.441-426, 2013.
- UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**, v.352, p.837-853, 1998.
- VADIVEL, V.; PUGALENTHI, M. Studies on the incorporation of velvet bean (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) as an alternative protein source in poultry feed and its effect on growth performance of broiler chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v.42, n.7, p.1367-1376, 2010.
- VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiological Reviews**, v.91, n.1, p.79-118, 2011.
- VARDATSIKOS, G.; PANDEY, N.; SRIVASTAVA, A. Insulin-mimetic and anti-diabetic effects of zinc. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.120, p.8-17, 2013.
- VEHIK, K. et al. Study Group. Methods, quality control and specimen management in an international multicentre investigation of type 1 diabetes: TEDDY. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v.29, n.7, p.557-567, 2013.

VERAN, J. et al. Zinc potentiates GluK3 glutamate receptor function by stabilizing the ligand binding domain dimer interface. **Neuron**, v.76, n.3, p.565-578, 2012.

VIEIRA, L. L. **Neuroadaptação induzida pelo exercício aeróbico em camundongos diabéticos: Alterações neuroquímicas e comportamentais em áreas relacionadas ao aprendizado e à memória**. 2015. 109 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.

VIJAYARAGHAVAN, K.; IYYAMPILLAI, S.; SUBRAMANIAN, S. P. Antioxidant potential of zinc-flavonol complex studied in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Diabetes**, v.5, n.2, p.149-156, 2013.

VON HERRATH, M.; NEPOM, G. T. Remodeling rodent models to mimic human type 1 diabetes. **European Journal of Immunology**, v.39, n.8, p.2049-2054, 2009.

WALLBERG, M.; COOKE, A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. **Trends in Immunology**, v.34, n.12, p.583-591, 2013.

WANG, X.; ZHOU, B. Dietary zinc absorption: a play of zips and ZnTs in the gut. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v.62, n.3, p.176-182, 2010.

WAYHS, C. A. et al. Brain effect of insulin and clonazepam in diabetic rats under depressive-like behavior. **Metabolic Brain Disease**, v.28, n.4, p.563-70, 2013.

WEGMÜLLER, R. et al. Zinc absorption by young adults from supplemental zinc citrate is comparable with that from zinc gluconate and higher than from zinc oxide. **The Journal of Nutrition**, v.144, n.2, p. 132-136, 2014.

WESSELLS, K. R.; BROWN, K. H. Estimating the global prevalence of zinc deficiency : results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. **PLoS One**, v.7, n.11, p.1-11, 2012.

WHITTLE, N.; LUBEC, G.; SINGEWALD, N. Zinc deficiency induces enhanced depression-like behaviour and altered limbic activation reversed by antidepressant treatment in mice. **Amino Acids**, v.36, n.1, p.147-158, 2009.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Use of glycated haemoglobin (HbA1C) in the diagnosis of diabetes mellitus abbreviated report of a WHO consultation. 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global report on diabetes. 2016.

WIJESEKARA, N.; CHIMIANTI, F.; WHEELER, M. B. Zinc, a regulator of islet function and glucose homeostasis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.11, n.4, p.111-114, 2009.

WU, Y. L. et al. Risk factors and primary prevention trials for type I diabetes. **International journal of Biological Sciences**, v.9, n.7, p.666-679, 2013.

YOSHIKAWA, Y. et al. Oral administration of Bis(aspirinato) zinc(II) complex ameliorates hyperglycemia and metabolic syndrome-like disorders in spontaneously diabetic KK-Ay mice: structure-activity relationship on zinc-salicylate complexes. **The Journal Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.59, n.8, p.972-977, 2011.

YOU, W.; HENNEBERG, M. Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth. **BMJ Open Diabetes Research and Care**, v.4, p.1-7, 2016.

ZHU, K. et al. Antidiabetic and pancreas-protective effects of zinc threoninate chelate in diabetic rats may be associated with its antioxidative stress ability. **Biological Trace Element Research**, v.153, Supl.1, p.291-298, 2013.

ANEXOS

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

**CERTIDÃO**

João Pessoa, 03 de agosto de 2015.
CEUA nº **045/2015**.

Ilmo(a): **Profa. Dra. Liana Clébia de Morais Pordeus**
Departamento de Fisiologia e Patologia – CCS – UFPB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **03/08/2015** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, CLÍNICOS, COMPORTAMENTAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR DIABÉTICOS**.

Com previsão de empregar **70 ratos Wistar**;
Animais do **Biotério Prof. Thomas George**;
Para serem utilizados no período de **agosto/2015 a agosto/2017**.

Atenciosamente,

Islania Giselia Albuquerque Gonçalves

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB

Prof.^a Dr.^a Islania G. A. Gonçalves
Coordenadora CEUA/UFPB
SIAPE 3366301
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Universidade Federal da Paraíba
www.ufpb.br/ceua/ - ceua@ufpb.br

APÊNDICES

ARTIGO 1**EFFECTS OF TWO ZINC COMPOUNDS SUPPLEMENTATION ON GLUCOSE METABOLISM AND OXIDATIVE STATUS IN EXPERIMENTAL-INDUCED DIABETIC RAT****ABSTRACT**

Zinc (Zn) supplementation has been used in the adjuvant treatment of diabetes mellitus and oxidative disruption, however, there is no consensus regarding the most effective compound. Thus the present study aims at investigating the role of two zinc compounds on glucose metabolism and oxidative status in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat. Male rats were randomly into four groups: control group (C); diabetic non treated group (D); diabetic + Zn sulfate (DZS) and diabetic + Zn gluconate (DZG). Diabetic rats treated for 4 weeks with Zn sulfate or gluconate 15 mg/kg, orally once daily. The results showed that the DSZ group presented increased of total antioxidant capacity compared to D; better glycemic control and improvement of hepatic and renal functions with attenuation of histological alterations compared to D and DGZ. The DGZ group showed increased of total antioxidant capacity and improved renal function compared to D, and greater protection in renal tissues compared to D and DSZ. In the skeletal muscle, no further disturbs were triggered by STZ-induced diabetes, however Zn sulfate offsets the peroxide production, and thereby, GST activity. The results indicate a better therapeutic effect of Zn sulfate in comparison to gluconate.

Keywords: Diabetes. Zinc. Nutrition Supplementation, Treatment.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a complex metabolic disorder characterized by increased blood glucose levels due to an absolute deficiency in insulin production or from insulin resistance. There is increasing evidence that oxidative stress (OS) at systemic levels or into important tissues involved in glucose metabolism, such as skeletal muscle, liver and kidney, plays a major role in the pathogenesis of diabetes mellitus (DM) and the development of its complications (Zhang et al. 2012; Di Meo et al. 2017; Barman et al. 2018). Despite the advances done for controlling blood glucose and diabetic complications, interventional strategies helping to reduce glucose levels and improve oxidative stress remain one of the great problems to be developed.

Recent findings from animal studies and randomized double-blind placebo-controlled clinical trials have demonstrated that zinc supplementation improves glucose homeostasis in diabetic condition (Aziz et al. 2018; Barman et al. 2018; Ranasinghe et al. 2018). This mineral may play its hypoglycemic role by different protection mechanisms, particularly favoring the phosphorylation of the insulin receptor and thus boosting glucose transport into the cells (Kaur et al. 2014), facilitating insulin secretion and action processes and acting as a cofactor in antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic processes (Cruz et al. 2015).

In this case, zinc is an essential cofactor for more than 300 enzymes, such as superoxide dismutase (Cruz et al. 2015). Among the compounds used in Zn supplementation, sulfate and gluconate show the most differences in results. Nevertheless, they are the most used in supplementation studies, since they present advantages such as low cost, better bioavailability and greater solubility (Capdor et al. 2013; Wegmüller et al. 2014); however, it is necessary that there is an evaluation of the most effective compound (Roohani et al. 2013).

Therefore, our study was performed 1) to investigate whether zinc sulfate or zinc gluconate supplementation could alleviate glucose homeostasis dysregulation in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats; 2) if this was the case, evaluate their association to oxidative status in serum, skeletal muscle, liver and kidney tissues.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design

All animal experiments and protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Paraíba (UFPB) under n° 045/2015, and are in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011).

The research was carried out in the Laboratory of Experimental Nutrition (LANEX) of the UFPB, and the animals were allocated into individual metabolic cages and kept under standard lighting conditions (light/dark cycle, 12/12 hours) and temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). Commercial ration (Presence, Paulínea, São Paulo) and filtered water were offered *ad libitum*. After one week of acclimatization, 38 adults male Wistar rats (*Rattus norvegicus*, variety *albinus*) weighing $250\pm 30\text{g}$ from Thomas George (UFPB) were randomly divided into four groups: Control group (C; n = 8); Diabetic non-treated group (D; n = 10); Diabetic + Zn sulfate (DZS; n = 10) and Zn gluconate (DZG; n = 10).

Streptozotocin (STZ)-induced diabetic protocol

The diabetes was induced by streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in citrate buffer (0.1 M, pH=4.5), which was administered intraperitoneally in a single dose (50 mg/kg body weight) after 8 hours of fasting (Santos et al. 2014). Three days after chemical administration, the animals that displayed glycemia greater than 250 mg/dL were considered diabetic and distributed across D, DZS and DZG groups (Santos et al. 2014).

Zinc compounds supplementation

Zn sulfate or gluconate were administered daily (15 mg/kg body weight/day) via gavage during 4 weeks, whilst the C and D groups received only filtered water (Sapota et al. 2014). The implemented dose complied with the recommended maximum limit for rodents (National Academy of Sciences, 2015).

Measurement of food intake and body composition

The general state of the animals was observed daily for signs of pain or discomfort, including dehydration, loss of body mass greater than 10% of the initial mass, abnormal posture, spasms or tremors (Graham et al. 2011).

The classic symptoms of diabetes (loss of body mass, polyphagia, polydipsia and polyuria) were monitored weekly at the same time in the morning (10:00 a.m.). Body mass was measured in a digital electronic scale (Toledo, model 8217, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil), maximum capacity 15 kg and precision of 0.005 kg. Individual food intake was calculated by the difference in grams between the food offered and what was leftover, considering average food intake (g/24h); water intake and diuresis were calculated by the mean (mL/24h), both verified using test tubes with volumetric capacity of 100 mL.

Glucose and insulin tolerance tests

At the end of the supplementation period, ITT was performed in the morning with normally fed animals using 0.75 IU insulin/kg diluted in sterile 0.9% saline administered intraperitoneally. After a tail tip incision, a blood sample was collected and the blood glucose was verified using an Accu Check Active® kit (Roche Diagnóstica Ltda., São Paulo, Brazil) at 0, 30, 60 and 90 minutes. 24 hours after the ITT, OGTT was performed in the morning, after a 12-hour fast. A solution of 25% glucose was administered at the dose of 2g glucose/kg via gavage. After a tail tip incision, a blood sample was collected and the blood glucose was verified using an Accu Check Active® kit (Roche Diagnóstica Ltda., São Paulo, Brazil) at 0, 30, 60 and 90 minutes.

Euthanasia

After 8 hours fasting, the animals were intraperitoneally anesthetized with ketamine (25 mg/kg) associated with xylazine (25 mg/kg). Then murinometric parameters were evaluated with the anesthetized animals using an inelastic anthropometric tape (Sanny, São Paulo, Brazil) to measure: abdominal circumference (AC) immediately anterior to the hind paw; and thoracic circumference (TC) immediately posterior to the front paw and nasoanal length (measured from the nose to the base of the tail). Body Mass Index (BMI) was calculated from the relationship between body mass (g)/nasoanal length (cm²), according to Novelli et al. (2007). The Lee Index was calculated from the relationship between the cubic root of the body mass (g) divided by the nasoanal length (cm), according to Bernardis and

Patterson (1968). After anesthesia and an absence of reflexes was confirmed, the laparotomy was performed to collect blood by direct cardiac puncture, removing approximately 4 mL of blood for biochemical analysis and removing skeletal muscle, liver and kidney.

Biochemistry parameters and serum oxidative stress assay

The concentrations of HbA1c were quantified by the colorimetric enzymatic method of glycated hemoglobin in whole blood using a commercial Hemoglobin Glicada kit (Laborclin, Paraná, Brazil) and following the manufacturer's instructions. In addition, creatinine, urea, ALT and AST were measured in serum using commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil).

The analysis for Total Antioxidant Capacity (TAOC) determination was based on the method described by Brand-Williams et al. (1995). The levels of peroxidation were quantified by means of thiobarbituric acid (TBARS) reaction with the decomposition products of the hydroperoxides, according to the method described by Ohkawa et al. (1979).

Skeletal muscle analysis

Soleus and EDL skeletal muscle were homogenized in cold buffer (50mM-TRIS and 1mM-EDT, containing 1mM of sodium orthovanadate and 1.1 mM of phenylmethanesulfonyl fluoride-PMSF) using a sampling homogenizer. Homogenates were centrifuged at 1,180 g for 10 minutes at 4°C and the supernatants had their protein content assessed by Bradford's method (Bradford, 1976).

Lipid peroxidation was analyzed by using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as previously published Buege and Aust (1978). Three hundred µg protein was sequentially mixed to 30% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) and 10 mM TRIS buffer, pH 7.4. This mixture was centrifuged at 2,500 g for 10 min and the supernatant was boiled for 15 min with 0.73% (w/v) thiobarbituric acid. The pink pigment produced was measured at 535 nm absorption RT and the results expressed as mmol/mg protein. SOD determination was performed in accordance with Misra and Fridovich (1972). In brief, 300 µg of protein were added to 0.05 M Carbonate buffer with 0.1 mM EDTA, pH 10.2. The reaction was started with 150 mM epinephrine and the SOD activity determined by adrenaline auto-oxidation inhibition at 30°C. The decrease in absorbance was followed for 1.5 min at 480 nm and the results expressed as U/mg protein (Huang et al. 2012).

GST activity was measured as described previously by Habig and Pabst (1974). Three hundred μg of protein was incubated in a 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 containing 1mM EDTA at 30°C and the assay initiated with 1 mM 1 chloro-2,4- dinitrobenzene and 1 mM GSH. The formation of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione was monitored at 340 nm absorbance, and, one unit of enzymatic activity was defined as the amount of protein required to catalyze the formation of 1 μmol 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione (Bortolin et al. 2015).

Hepatic and kidney analysis

TAOC and TBARS measurements were performed in liver and kidney tissues (Ohkawa et al. 1979; Brand-Williams et al. 1995). In addition, semi-serial cuts of 3 μm thickness were obtained from the paraffin embedded material following the same cross-sectional plane as the analyzed organ of each animal. The obtained slides were stained using Hematoxylin and Eosin (H & E) technique, and the assembly was performed between lamina and laminula with synthetic resin (Entellan-Merck) for analysis in increasing lenses, then photographed under total magnification of 100x using an optical microscope (Motic, BA200). Finally, the structure of the organs and the presence of inflammatory and degenerative lesions were evaluated in these analyzes.

Statistical Analysis

Data sets were tested for normality and homogeneity using tests of variance. The ANOVA test followed by the Tukey *post-hoc* test was used for data analysis. The accepted level of significance was $p < 0.05$. The results were expressed as mean and standard error of the mean by using the Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Murinometric parameters and classic symptoms

The diabetic animals presented a reduction of the murinometric measurements ($p<0.05$) in comparison with the other groups (Table 1), while both supplementations (sulfate and gluconate Zn) avoided BMI and Lee Index reduction.

Table 1. Murinometric parameters of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.

Murinometric Parameters	GROUPS			
	C	D	DZS	DZG
BMI (g/cm ²)	0.55±0.01	0.40±0.01	0.47±0.02 ^a	0.46±0.00 ^b
Lee Index (g/cm)	0.28±0.00	0.25±0.00	0.27±0.00 ^a	0.27±0.00 ^b
Length (cm)	22.75±0.42	22.20±0.26	21.80±0.40	22.00±0.39
Abdominal Circumference (cm)	15.75±0.38	13.05±0.20	13.90±0.48	13.90±0.34 ^d
Thoracic Circumference (cm)	13.75±0.29	12.00±0.44	12.11±0.58	12.00±0.39 ^d
AC/TC Ratio	1.14±0.03	1.09±0.03	1.15±0.02	1.15±0.02

Legend: C: Control; D: Diabetic; DSZ: Diabetic Zn sulfate supplemented and DGZ: Diabetic Zn gluconate supplemented. BMI: body mass index; AC: abdominal circumference; TC: thoracic circumference. ANOVA test followed by Tukey *post-hoc* ($p<0.05$). ^aDZS versus D; ^bDZG versus D.

Regarding the classic symptoms of the disease (Figure 1), diabetic group exhibited progressed reduction in body mass over the weeks, higher food intake in the 1st week, and higher water intake and diuresis ($p<0.05$) across the weeks. The diabetic groups supplemented with Zn (DZS and DZG) did not present significant loss in body mass, although there was a higher food intake from week two and higher water intake and diuresis throughout the experiment (Figure 1, $p<0.05$).

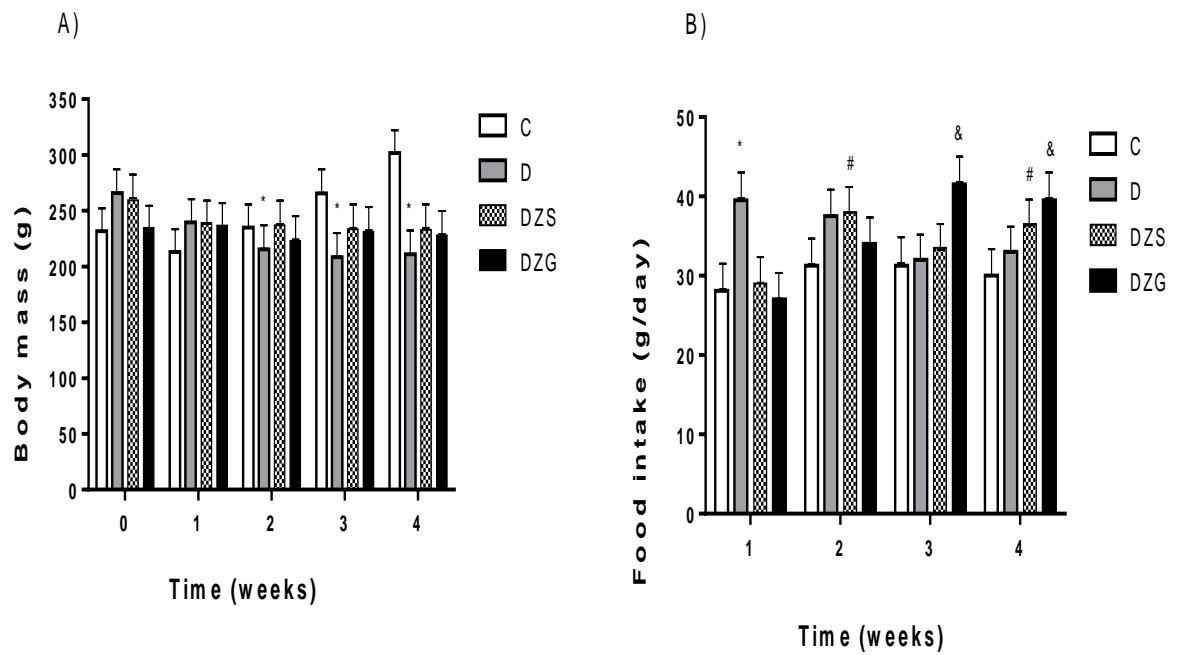
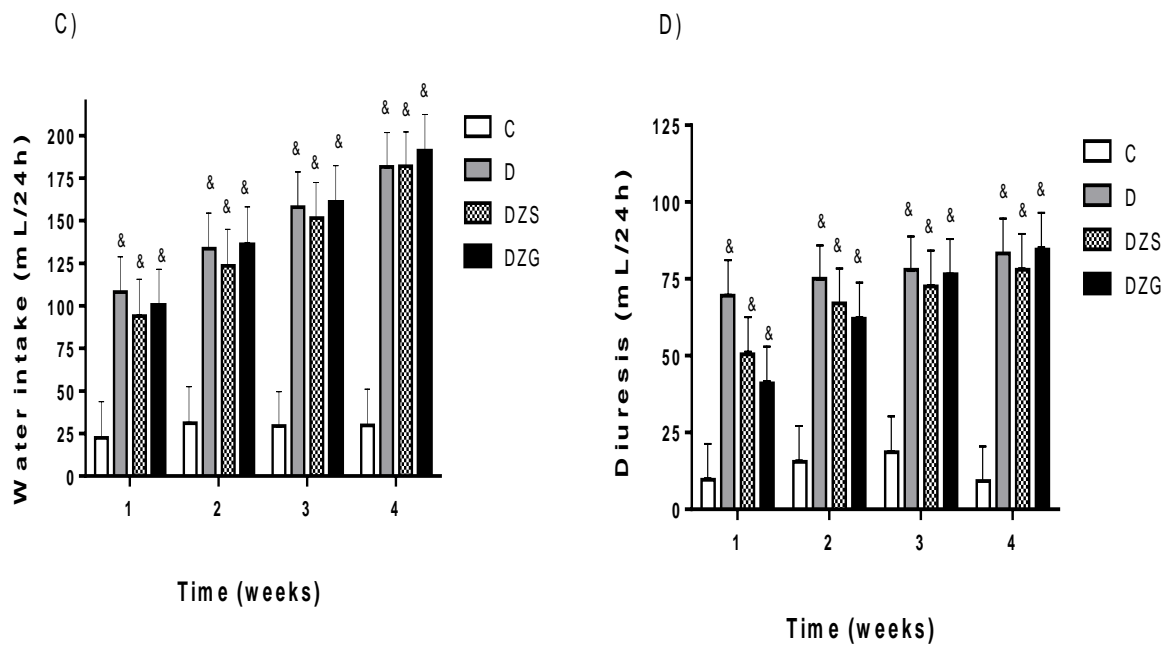


Figure 1. A) Body mass and B) Food intake C) Water intake and D) Diuresis of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.

Legend: C: Control; D: Diabetic; DZS: Diabetic Zn sulfate supplemented and DZG: Diabetic Zn gluconate supplemented. ANOVA test followed by Tukey *post-hoc* ($p < 0.05$). *D versus C, DZS and DZG; #DZS versus C; &DZG versus C, D and DZS; & D, DZS and DZG versus C.



Glucose and insulin tolerance tests

Regarding glycaemia values in ITT (Figure 2 A) and OGTT (Figure 2 B), only the DZS group had lower ITT values at 90 minutes (390.20 ± 42.62 mg/dL *versus* 527 ± 45.86 mg/dL, $p < 0.05$) compared with D group. Regarding the OGTT, the DZS and DZG groups had lower blood glucose values at 90 minutes (368.80 ± 41.71 mg/dL *versus* 476.8 ± 19.22 mg/dL, $p < 0.05$) and (416.20 ± 20.92 mg/dL *versus* 476.8 ± 19.22 mg/dL, $p < 0.05$), respectively, when compared with D group.

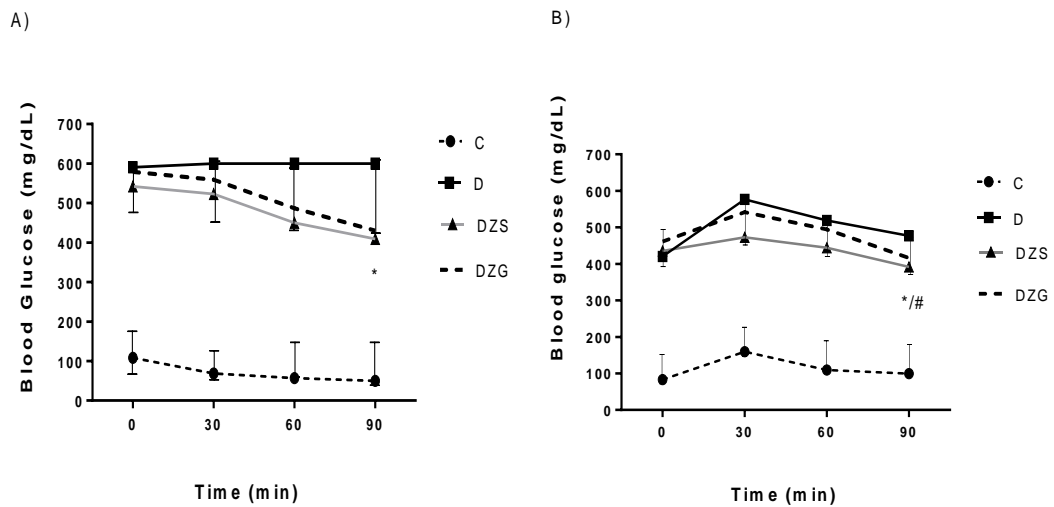


Figure 2. A) Blood glucose in the ITT and B) Blood glucose in the OGTT of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.

Legend: C: Control; D: Diabetic; DZS: Diabetic Zn sulfate supplemented and DZG: Diabetic Zn gluconate supplemented. ITT: Insulin Tolerance Test. OGTT: Oral Glucose Tolerance Testing. ANOVA test followed by Tukey *post-hoc* ($p < 0.05$). *DZS *versus* D; #DZG *versus* D.

Biochemistry parameters and serum oxidative stress assay

Regarding the biochemical parameters (Table 2), Zn sulfate supplementation normalized the HbA1c and improved both hepatic as well as renal functions ($p < 0.05$), while Zn gluconate only decreased creatinine levels ($p < 0.05$). In addition, both zinc supplementations increased the TAOC in plasma without change TBARS concentrations (Table 3).

Table 2. Biochemical parameters of healthy and diabetic rats supplemented or not with Zn.

Biochemical Parameters	GROUPS			
	C	D	DZS	DZG
HbA1c (%)	5.38±0.18	9.96±1.47	5.61±0.83 ^a	7.51±0.13
Total cholesterol (mg/dL)	47.37±3.63	48.6±3.51	64.12±4.46 ^b	98.25±1.70 ^d
HDL cholesterol (mg/dL)	23.25±1.35	25.0±1.04	27.40±0.40	29.66±2.43
LDL cholesterol (mg/dL)	18.25±2.15	18.58±3.28	22.84±4.03	52.94±9.34 ^d
Cholesterol VLDL (mg/dL)	5.87±1.00	5.02±0.54	13.88±3.96 ^b	15.65±2.62 ^d
Triglycerides (mg/dL)	29.37±4.93	25.12±2.72	69.40±23.25 ^b	78.28±13.15 ^d
AST (U/L)	165.88±26.37	300±28.60	193.17±14.75 ^a	218.43±23.36
ALT (U/L)	16.33±3.02	159.60±21.46	67.25±19.43 ^a	110.67±26.25
Uric Acid (mg/dL)	1.68±0.11	3.23±0.43	1.74±0.39 ^c	2.72±0.51
Creatinine (mg/dL)	0.41±0.19	0.56±0.44	0.45±0.18 ^c	0.46±0.00 ^e
Urea (mg/dL)	29±2.24	61.33±3.11	48.33±2.92 ^c	58.57±4.54

Legend: C: Control; D: Diabetic; DSZ: Diabetic Zn sulfate supplemented and DGZ: Diabetic Zn gluconate supplemented. AST: Aspartate Aminotransferase. ALT: Alanine Aminotransferase. ANOVA test followed by Tukey *post-hoc* ($p < 0.05$). ^aDZS versus D and DZG; ^bDZS versus C and D; ^cDZS versus D; ^dDZG versus C and D and DGZ; ^eDZG versus D.

Table 3. Oxidative parameters of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.

Oxidative Parameters	GROUPS			
	C	D	DSZ	DGZ
TAOC Plasma (mmol/L)	6.40±0.50	9.40±1.74	21.20±3.81 ^a	25.33±3.34 ^b
TAOC Liver (mmol/L)	79.40±3.47	58.60±4.42	76.40±2.27 ^a	85±1.84 ^b
TAOC Kidney (mmol/L)	33.20±1.88	32.66±4.34	49.83±1.37 ^a	58.4±5.71 ^b
MDA Plasma (nmol/mg ptn)	5.37±0.25	6.04±0.77	5.32±0.21	5.15±0.27
MDA Liver (nmol/mg ptn)	8.53±0.89	8.87±0.66	8.39±0.47	8.90±0.39
MDA Kidney (nmol/mg ptn)	11.09±0.35	14.11±0.29	12.84±1.65	13.16±0.69

Legend: C: Control; D: Diabetic; DSZ: Diabetic Zn sulfate supplemented and DGZ: Diabetic Zn gluconate supplemented. TAOC: Total Antioxidant Capacity. MDA: Malondialdehyde. ANOVA test followed by Tukey *post-hoc* ($p < 0.05$). ^aDSZ versus D; ^bDGZ versus D.

Skeletal muscle analysis

Analyzing oxidative status in skeletal muscle, no changes were observed in SOD activity, total thiols and TBARS content (Figure 3). The GST had its activity increased in the diabetic rats, however, only Zn sulfate supplementation reestablished its activity (Figure 3).

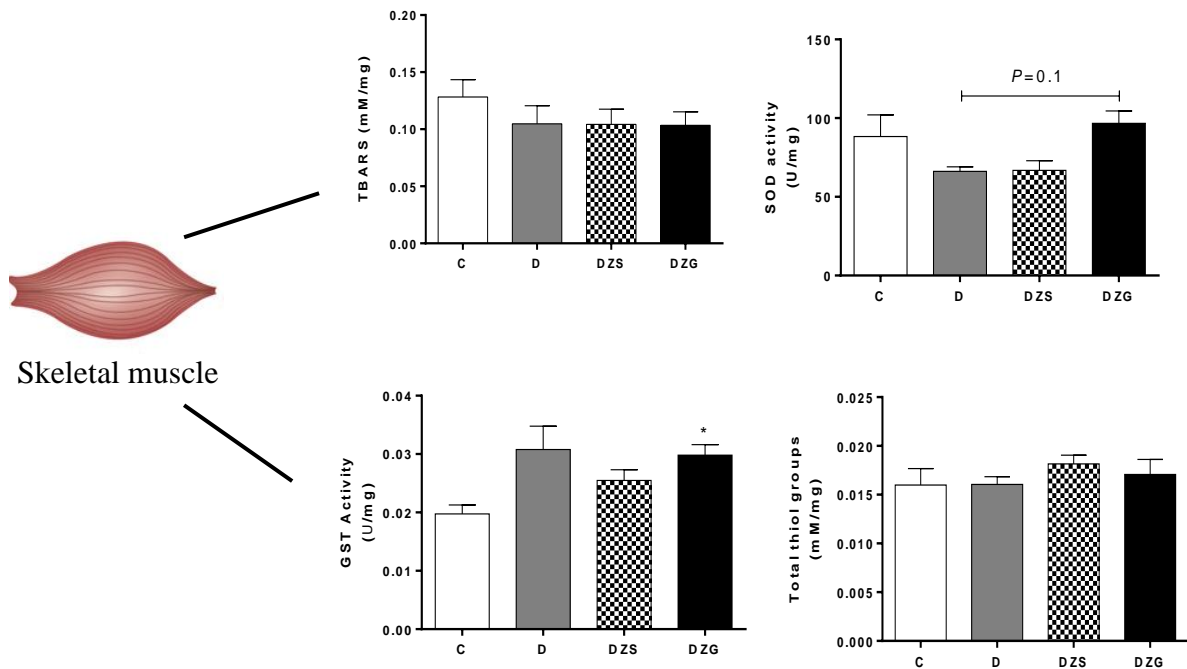


Figure 3. Oxidative status in skeletal muscle of healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.

Legend: C: Control; D: Diabetic; DZS: Diabetic Zn sulfate supplemented and DZG: Diabetic Zn gluconate supplemented. TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances. SOD: Superoxide dismutase. GST: Glutathione S-transferases. ANOVA test followed by Tukey *post-hoc* ($p < 0.05$). *DZG versus D.

Hepatic and kidney analysis

In hepatic tissue, Zn sulfate and gluconate supplementations increased TAOC and alleviated portal inflammation (Figure 4). In kidney, both Zn supplementations augmented TAOC levels and attenuated mesangioproliferative glomerulonephritis in renal parenchyma (Figure 5).

Figure 4. A) Histology (H & E, x 100) and B) hepatic oxidative parameters in healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.

Hepatic slides. C: Control liver; D: Diabetic liver, arrow points to accentuated portal inflammation; DSZ: Diabetic Zn sulfate supplemented liver, the arrow points to light portal inflammation; DGZ: Diabetic Zn gluconate supplemented liver, the arrow points to congestion. TAOC: Total Antioxidant Capacity. TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances. ANOVA test followed by Tukey *post-hoc* ($p < 0.05$). *D versus C; DZS and DZG.; #DZS and DZG versus D.

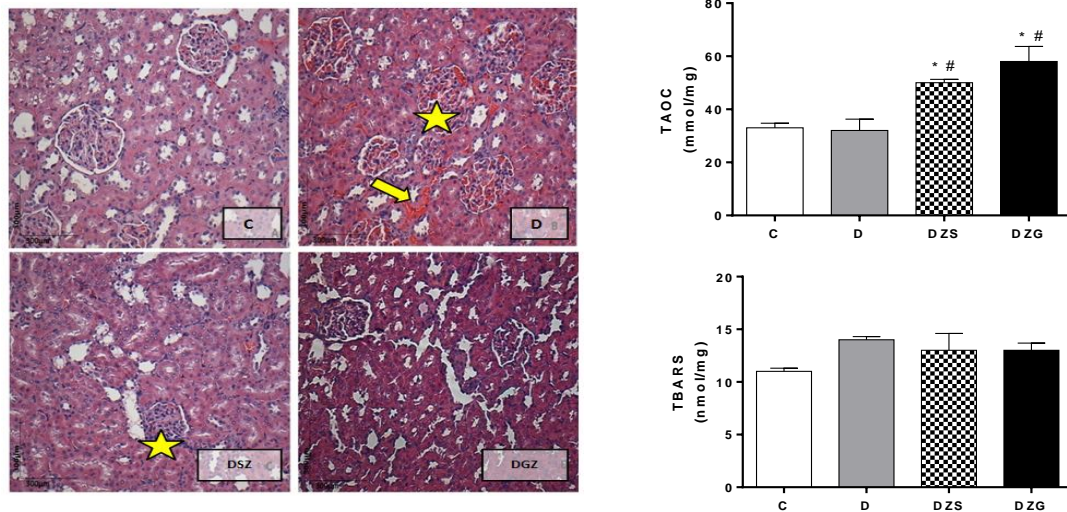
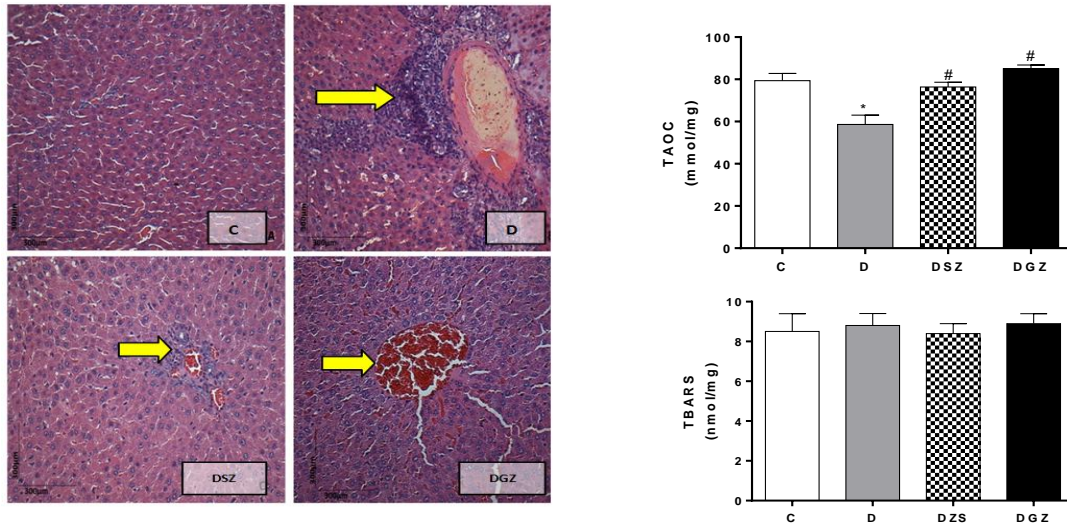


Figure 5. Histology (H & E, x 100) and kidney oxidative parameters in healthy and diabetic rats supplemented or not supplemented with Zn.

C: Control kidney; D: Diabetic kidney, the star points to membranoproliferative glomerulonephritis and the arrow points to hyperemia/stasis; DZS: Diabetic Zn sulfate supplemented kidney, the star points to mild and focal mesangioproliferative glomerulonephritis; DZG: Diabetic Zn gluconate supplemented kidney. TAOC: Total Antioxidant Capacity. TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances. ANOVA test followed by Tukey *post-hoc* ($p < 0.05$). *#DZS and DZG versus D.

DISCUSSION

Diabetic groups altered the murinometric parameters, especially in D group, with a decrease in BMI, Lee Index and Abdominal and Thoracic Circumferences. Regarding body mass, group D presented a significant decrease, similar to the results reported by Huang et al. (2012) and Ávila et al. (2013). However, diabetic animals treated with Zn compounds (sulfate or gluconate) preserved their body mass through the study, suggesting that supplementation with the two Zn compounds improved glucose uptake, attenuating the catabolic state of the disease and helping to maintain mass body. Similarly, Fatmi et al. (2013) demonstrated that adequate levels of Zn in the diet improved control of body mass in diabetic rats. Regarding symptom evolution, all diabetic groups presented increased food intake, water intake and diuresis, confirming STZ's ability to induce diabetes in rats with a very similar symptomatology to DM1 seen in humans (Bortolin et al. 2015; Scridon et al. 2015).

Regarding ITT, only the DZS group showed a reduction in blood glucose levels over 90 minutes compared with D group. This reduction confirms the role of this trace element in insulin sensitivity, improving cellular uptake of glucose and normalizing glycaemia (Capdor et al. 2013). Similarly to our findings, improvements in hyperglycemia, glucose tolerance and insulin resistance were obtained in type 2 diabetic rats supplemented with a complex of Zn (N-acetyl-L-cysteinate) Zn (II) at a dose of 3 to 5 mg/kg for 4 weeks (Adachi et al. 2007).

Regarding the OGTT, both the DZS and DZG groups showed a reduction in blood glucose levels over 90 minutes compared with D group, thereby, the supplementation with the two Zn compounds improved glucose homeostasis in diabetic animals. Similar results were found in type 2 diabetic animals supplemented with a Zn (γ -pga) complex at a dose of 7 to 20 mg/kg for 30 days by Karmaker et al. (2009), and Zn-aspirin complex at a dose of 1.5 to 15 mg/kg for 24 days by Yoshikawa et al. (2011). Our findings indicate that supplementation with both compounds improve glucose tolerance in diabetic rats.

Concerning glycaemic control, the supplementation with zinc sulfate normalized the of HbA1c levels. In a study of diabetic rats, supplementation at different doses of a Zn-flavonoid complex at a dose of 5 mg/kg for 30 days decreased HbA1c to near normal levels (Vijayaraghavan et al. 2013). It should be noted that two systematic reviews with diabetic patients concluded that supplementation with several Zn compounds, including sulfate and gluconate in varied doses, showed improvement in glycaemic control in type 2 diabetic patients, as evidenced by lower levels of fasting glycaemia postprandial and reduction of HbA1c; however, no similar results were reported for HbA1c in DM1 patients supplemented

with sulfate and Zn gluconate (Jayawardena et al. 2012; Capdor et al. 2013), confirming the hypoglycemic role of the Zn sulfate in diabetic rats.

Besides, both DZS and DZG groups increased their TAOC in plasma, liver and kidney compared to D group, thus demonstrating the functional recovery of the antioxidant system due to supplementation in the diabetic groups. Similar results were found in animal studies supplemented with Zn chloride at a dose of 5 mg/kg for 30 days (Asri-Rezaei et al. 2015), and with diabetic pregnant women supplemented with Zn gluconate at a dose of 30 mg/kg for 6 weeks (Karamali et al. 2016). It is known that Zn is an important component of the antioxidant system, contributing to redox maintenance through different mechanisms such as: inhibiting NADPH oxidase activity; competing with iron and copper for binding in the cell membrane; as a cofactor of superoxide dismutase; and inducing metallothionein production (Oteiza 2012; Prasad et al. 2014).

In our study, supplementation with the two Zn compounds did not significantly alter plasma, liver and kidney TBARS levels, possibly indicating that the STZ-induced diabetes (50 mg / kg) was not able to cause lipid peroxidation in rats, since in a previous study there was a decrease in the levels of this marker in STZ- induced diabetes (60 mg / kg) and supplemented with twice the dose of zinc for a longer time (Özcelik et al. 2012) than in our study.

Considering that adequate glycemic control helps in the prevention of macro and microvascular complications of DM, it is interesting to analyze the role of Zn supplementation in important organs, such as the liver and kidney, so that histological analysis is an essential step for clarify this relationship. The D group animals presented increased oxidative stress due to the induction of DM by STZ, causing a decrease in the liver and kidney functions, with consequent histological changes in the liver and kidneys. Regarding hepatic function, the DZS group animals had lower levels of the AST and ALT enzymes compared to the D and DZG groups, suggesting that Zn sulfate supplementation improved liver function even in the presence of diabetes, and therefore indicating the hepatoprotective nature of this compound. Similar results were described by Piao et al. (2016), in which hepatic function was improved in diabetic type 2 rats supplemented with Zn sulfate at a dose of 15 mg/kg for 53 days.

These data correlate the histological results with attenuation of hepatic portal inflammation, suggesting the role of Zn sulfate as an inducer of hepatic metallothionein, contributing to reduce oxidative damage in hepatic tissue. Additionally, Liang et al. (2015) described that Zn sulfate at a dose of 5 mg/kg for 12 weeks reduced fibrous tissue in the livers

of diabetic rats. However, supplementation with Zn gluconate in the DZG group did not significantly alter hepatic enzymes or the presence of hepatic congestion, indicating that this compound had no antioxidant or hepatoprotective effect.

Both the DZS and DZG group animals showed improvement in renal function compared to D group. These data correlate the histological results where reduced mesangioproliferative glomerulonephritis was observed, suggesting the protective effect of Zn sulfate on the cellular lesions of renal tissues. Similar results with reduced renal inflammation in diabetic animals were reported by Tang et al. (2010) in using Zn sulfate supplementation at a dose of 5 mg/kg for 30 days, and by Karatug et al. (2013) using Zn sulfate supplementation at a dose of 100 mg/kg for 60 days.

Several Zn compounds were used and showed similar effects. In our study, the choice of Zn sulfate and Zn gluconate occurred because of increased use of these two compounds in animal and human supplementation studies, respectively, and were also based on other proprietary studies whose supplementation results showed neuroprotective effects in animals with DM1. The better glycemic control evidenced by the reduction of HbA1c in the DZS group reduced oxidative stress, attenuating the hepatic and renal complications of diabetic animals, evidenced by the reduction of the biochemical markers related to the functions of these organs, evidencing the role of Zn as an important adjuvant in the treatment complications of DM1.

Despite the impairments verified in the hepatic and renal tissues, in the skeletal muscle, no further disturbs were triggered by STZ-induced diabetes. Here, the increase in GST activity following diabetes induction suggests a compensatory mechanism to deal with peroxides, which could damage a plenty of cellular components, culminating in the tissue dysfunction (Ramirez-Sanchez et al., 2013). Comparing the treatments, our results suggest that Zn sulfate offsets the peroxide production, and thereby, GST activity become similar to the control group. Moreover, GST is a glutathione family member, and its modulations might be further related with the redox status and the non-enzymatic antioxidant capacity (Appenzeller-Herzog, 2011; Circu and Aw, 2012), which, unfortunately, have not been evaluated.

A limitation of our study is related to the lack of plasma Zn dosage for the verification of deficiency in animals, so a safe dose was used and below the recommended maximum limit for rodents. However, in view of the results obtained in diabetic animals and supplemented with the two Zn compounds, it can be suggested that the benefits occurred due to the Zn

deficiency in these animals, confirming the relationship attributed between DM and Zn deficiency.

CONCLUSIONS

In our DM1 animal model, supplementation with Zn sulfate given at the recommended dose for rodents improved glycemic control, increased antioxidant activity and minimized alterations in hepatic and renal function. Zn gluconate supplementation was shown to only be more effective in renal tissue protection. Considering the set of beneficial effects, Zn sulfate presented a better therapeutic effect than Zn gluconate. These results provide important information on the judicious use of Zn supplementation as an adjuvant therapy in in experimental-induced diabetic rat.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CLC, MCRG, JLBA and JSA designed the study and the experiments. CLC carried out the experiments. CLC and JSA analyzed the data. CLC, ASS, LTT, AFA, AAP, CJL and DJSF implemented the reagents/materials/analysis tools. CLC, JLBA and JSA wrote the article.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FINANCIAL SUPPORT

The Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) granted a scholarship to CLC.

REFERENCES

Adachi, Y., Yoshikawa, Y., Sakurai, H. 2007. Antidiabetic zinc (II)-N-acetyl-L-cysteine complex: evaluations of in vitro insulinomimetic and in vivo blood glucose-lowering activities. *BioFactors*. **29**:213-223. doi:10.1002/biof.5520290405.

Appenzeller-Herzog, C. 2011. Glutathione and non-glutathione based oxidant control in the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Sci.* **124**:847-855. doi:10.1242/jcs.080895.

Asri-Rezaei, S., Tamaddonfard, E., Gasemsoltani-Momtaz, B., Erfanparast, A., Gholamalipiur, S. 2015. Effects of crocin and zinc chloride on blood levels of zinc and metabolic and oxidative parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Avicenna J. Phytomed.* **5**:403-412. PMID: 26468459.

Ávila, D.L., Araújo, G.R., Silva, M., Miranda, P.H., Diniz, M.F., Pedrosa, M.L. et al. 2013. Vildagliptin ameliorates oxidative stress and pancreatic beta cell destruction in type 1 diabetic rats. *Arch. Med. Res.* **44**:194-202. doi:10.1111/dom.12005.

Aziz, N.M., Kamel, M.Y., Mohamed, M., Ahmed, S. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of zinc supplementation in experimental-induced diabetic rats testes. 2018. *Appl. Physiol. Nutr. Meta.* **4**. doi:10.1139/apnm-2018-0070.

Barman, S., Pradeep, S.R., Srinivasan, K. 2018. Zinc supplementation alleviates the progression of diabetic nephropathy by inhibiting the overexpression of oxidative-stress-mediated molecular markers ins streptozotocin-induced experimental rats. *J. Nutr. Biochem.* **54**:113-129. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.11.008.

Bernardis, L.L. and Patterson, B.D. 1968. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J. Endocrinol.* **40**:527-528. PMID:4868415.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **28**:25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

Bortolin, R.H, Abreu, B.J.G.A., Ururahy, M.A.G., Costa, S.K.S., Bezerra, J.F., Loureiro, M.B. et al. 2015. Protection against T1DM-induced bone loss by zinc supplementation: biomechanical, histomorphometric, and molecular analyses in STZ-induced diabetic rats. *PLoS One.* **10**:1-18. doi:10.1371/journal.pone.0125349.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Buege, J. A., Aust, D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **52**: 302-310. doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6.

Capdor, J., Foster, M., Petocz, P., Samman, S. 2013. Zinc and glycemic control: a meta-analysis of randomized placebo controlled supplementation trials in humans. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* **27**:137-142. doi:10.1016/j.jtemb.2012.08.001.

Circu, M.L., Aw, T.Y. 2012. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **10**:1767-1777. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.019.

Cruz, K.J.C., Oliveira, A.R.S., Marreiro, D.N. 2015. Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. *World J. Diabetes* **6**:333-336. doi:10.4239/wjd.v6.i2.333.

Fatmi, W., Kechrid, Z., Nazıroğlu, M., Flores-Arce, M. 2013. Selenium supplementation modulates zinc levels and antioxidant values in blood and tissues of diabetic rats fed zinc-deficient diet. *Biol. Trace. Elem. Res.* **152**:243-250. doi:10.1007/s12011-013-9613-z.

Graham, M.L., Janecek, J.L., Kittredge, J.A., Hering, B.J., Schuurman, H.J. 2011. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp. Med.* **61**:356-360. PMID:22330251.

Guide for the care and use of laboratory animals. 2011. Institute of Laboratory Animal Resources. Washington DC: National Academy of Sciences.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**:7130-7139. PMID:4436300.

Huang, M., Gao, L., Yang, L., Lin, F., Lei, H. 2012. Abnormalities in the brain of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats revealed by diffusion tensor imaging. *Neuroimage Clin.* **1**:57-65. doi:10.1016/j.nicl.2012.09.004.

Jayawardena, R., Ranasinghe, P., Galappathy, P., Malkanthi, R., Constantine, G., Katulanda, P. 2012. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and metaanalysis. *Diabetol. Metab. Syndr.* **4**:1-13. doi:10.1186/1758-5996-4-13.

Karamali, M., Heidarzadeh, Z., Seifati, S.M., Samimi, M., Tabassi, Z., Talaei, N. et al. 2016. Zinc supplementation and the effects on pregnancy outcomes in gestational diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* **124**:28-33. doi:10.1055/s-0035-1564146.

Karatug, A., Kaptan, E., Bolkent, S., Mutlu, O., Yanardag, R. 2013. Alterations in kidney tissue following zinc supplementation to STZ-induced diabetic rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **27**:52-57. doi:10.1016/j.jtemb.2012.07.006.

Karmaker, S., Saha, T.K., Yoshikawa, Y., Sakurai, H. 2009. A zinc (II)/poly (γ -glutamic acid) complex as an oral therapeutic for the treatment of type-2 diabetic KK-Ay mice. *Macromol. Biosci.* **9**:279-286. doi:10.1002/mabi.200800190.

Kaur, K., Gupta, R., Saraf, S.A., Saraf, S.K. 2014. Zinc: the metal of life. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **13**:358-376. doi:10.1111/1541-4337.12067.

Liang, T., Zhang, Q., Sun, W., Xin, Y., Zhang, Z., Tan, Y. et al. 2015. Zinc treatment prevents type 1 diabetes-induced hepatic oxidative damage, endoplasmic reticulum stress, and cell death, and even prevents possible steatohepatitis in the OVE26 mouse model: important role of metallothionein. *Toxicol. Lett.* **233**:114-124. doi:10.1016/j.toxlet.2015.01.010.

Meo, S.D., Iossa, S. Venditti, P. 2017. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. *J. Endocrinol.* **233**:R15-R42. doi:10.1530/JOE-16-0598.

Misra, H.P., Fridovich, I. 1972. The role of superoxid anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**:3170-3175. PMID:4623845.

National Academy of Sciences (U.S.) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition/Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. 2001. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington DC: National Academy Press. ISBN-10: 0-309-07279-4. ISBN-10: 0-309-07290-5.

Novelli, E.L.B., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M., Rodrigues, H.G., Mani, F. et al. 2007. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab. Anim.* **41**:111-119. doi:10.1258/002367707779399518.

Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**:351-358. PMID:36810.

Oteiza, P.I. 2012. Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radic. Bio. Med.* **53**:1748-1759. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.568.

Özcelik, D., Nazıroglu, M., Tunçdemir, M., Çelik, Ö., Öztürk, M., Flores-Arce, M.F. 2012. Zinc supplementation attenuates metallothionein and oxidative stress changes in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol. Trace. Elem. Res.* **150**:342-349. doi: 10.1007/s12011-012-9508-4.

Prasad, A.S. 2014. Zinc is an antioxidant and anti-inflammatory agent: its role in human health. *Front. Nutr.* **1**:14. doi:10.3389/fnut.2014.00014.

Piao, M., Liu, Y., Yu, T., Lu, Y. 2016. Zinc supplementation ameliorates ER stress and autophagy in liver in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *Biomed. Res.* **27**:1-7. ISSN 0970-938X.

Ranasinghe, P., Wathurapatha, W.S., Galappathy, P., Katulanda, P., Jayawardena, R., Constantine, G.R. 2018. Zinc supplementation in prediabetes: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *J. Diabetes.* **10**:386-397. doi:10.1111/1753-0407.12621.

Ramirez-Sanches, I., Taub, P.R., Ciaraldi, T.P., Nogueira, L., Coe, T., Perkins, G. et al. 2013. Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. *Int. J. Cardiol.* **168**:3982-3990. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.06.089.

Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R., Schulin, R. 2013. Zinc and its importance for human health: an integrative review. *J. Res. Med. Sci.* **18**:144-157. PMID:23914218. PMCID: PMC3724376.

Santos, R.X., Correia, S.C., Alves, M.G., Oliveira, P.F., Cardoso, S. Carvalho, C. et al. 2014. Insulin therapy modulates mitochondrial dynamics and biogenesis, autophagy and tau protein phosphorylation in the brain of type 1 diabetic rats. *Biochim. Biophys. Acta.* **1842**:1154-1166. doi:10.1016/j.bbadis.2014.04.011.

Sapota, A., Daragó, A., Skrzypińska-Gawrysiak, M., Nasiadek, M., Klimczak, M., Kilanowicz, A. 2014. The bioavailability of different zinc compounds used as human dietary supplements in rat prostate: a comparative study. *BioMetals.* **27**:495-505. doi: 10.1007/s10534-014-9724-9.

Scridon, A., Perian, M., Vântu, A., Ghertescu, D., Fisca, C., Serban, R.C. 2015. Aortic rings of wistar rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus display time-dependent changes in contractility, endothelium-dependent and - independent relaxation. *Acta. Endo.* **11**:276-283. doi:10.4183/aeb.2015.276.

Tang, Y., Yang, Q., Lu, J., Zhang, X., Suen, D., Tan, Y. et al. 2010. Zinc supplementation partially prevents renal pathological changes in diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* **21**:237–246. doi:10.1016/j.jnutbio.2008.12.010.

Vijayaraghavan, K., Iyyampillai, S., Subramanian, S.P. 2013. Antioxidant potential of zinc-flavonol complex studied in streptozotocin-diabetic rats. *J. Diabetes*. **5**:149-156.

doi:10.1111/j.1753-0407.2012.00226.x.

Wegmüller, R., Tay, F., Zeder, C., Brnic, M., Hurrell, R.F. 2014. Zinc absorption by young adults from supplemental zinc citrate is comparable with that from zinc gluconate and higher than from zinc oxide. *J. Nutr.* **144**:132-136. doi:10.3945/jn.113.181487.

Zhang, C., Lu, X., Tan, Y., Li, B., Miao, X., Jin, L. et al. 2012. Diabetes-Induced hepatic pathogenic damage, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance was exacerbated in zinc deficient mouse model. *PLoS ONE*. **7**:e49257. doi:10.1371/journal.pone.0049257.

ARTIGO 2

COMPARATIVE STUDY OF THE ANTIDEPRESSIVE, ANSIOLITIC AND NEUROPROTETIC ACTIVITY OF ZINC SUPPLEMENTATION IN AN ANIMAL MODEL OF DIABETES MELLITUS TYPE 1

ABSTRACT

Behavioral disorders affect most diabetic patients and Zinc (Zn) has been used among adjuvant therapies for involvement in the etiology of depression and anxiety, however the results are still controversial. The objective of this study was to compare the antidepressant, anxiolytic and neuroprotective activity of the supplementation of two Zn compounds in an animal model of Diabetes Mellitus type 1 (DM1). Thirty-eight (38) adult rats were randomized into four groups: Control (C; n = 8); Diabetic (D; n = 10); Diabetic Zn Sulfate Supplement (DSZ; n = 10) and Diabetic Zn Gluconate Supplement (DGZ; n = 10). The DSZ group received Zn sulfate supplementation and the DGZ group received Zn gluconate supplementation at a dose of 15 mg/kg for 4 weeks. Data (mean \pm SEM) were analyzed through the Mann-Whitney test with a significance level of $p < 0.05$. The results indicate that Zn gluconate supplementation in diabetic animals presented an antidepressant effect demonstrated through the results obtained in the Forced Swim Test, and neuroprotective effect by attenuating alterations in the cerebral cortex; while Zn sulfate supplementation in diabetic animals showed an anxiolytic effect demonstrated by the results obtained in the Open Field Test and the Elevated Cross Labyrinth Test. Considering the set of results the two compounds presented beneficial effects, thus contributing to better understanding to the role of Zn as a safe therapeutic alternative for supplementation in diabetic patients and patients with behavioral disorders such as depression and anxiety.

Keywords: Nutrition Supplementation, Zinc, Depression, Anxiety.

1. INTRODUCTION

Diabetes Mellitus (DM) is a public health problem due to the large number of people affected and the consequences of the disease, such as pain, anxiety and some emotional states that contribute to decreasing the quality of life of patients [3]. Studies have shown that DM is related to an increased prevalence of psychiatric disorders, among which depression and anxiety [32, 26] are noteworthy. The prevalence rate of depression and anxiety disorders is more than three-times higher in people with type 1 diabetes than that reported in the general population [4].

Depression is a common, chronic, and disabling disorder, strongly related to an anonymous state [41] resulting in social and economic burden, as well as enormous personal suffering and increased risk of mortality [18]. This disorder has been postulated to play a causal role in DM, and an increased risk has been reported in 50% of depressive individuals in developing this pathology [4].

Similarly, the prevalence of anxiety disorders among diabetic patients is considerably higher compared to the general population [14]. Anxiety is related to fear and concern related to various events or day-to-day activities. Thus, by hindering the care of the diabetic patient, this situation harms their lives in other aspects, leading to complications of the disease [38]. Relation of anxiety disorders and diabetes has not been explored as systematically and extensively as that of depression and diabetes. Anxiety in the context of diabetes has been studied mostly in association with depression [4].

In this context, it is imperative to seek adjuvants in treating diabetes and in preventing these disorders. Zinc (Zn) is a trace element which is essential for the optimal function of the human body, especially in the brain, with higher concentrations being found in the hippocampus and amygdala regions [11]. Moreover, 300 enzymes are dependent on this trace element, many of them expressed in the central nervous system [12].

Zn deprivation affects brain homeostasis, leading to behavioral, cognitive and mental changes [43, 24]. In this sense, experimental and clinical observations have suggested that Zn is involved in the pathophysiology of depression and anxiety [42, 19]. Some studies with animals have shown that Zn deficiency increases symptoms which are similar to those of depression [48, 21], while others have shown that Zn deficiency-like symptoms similar to depression appear to be reversed by antidepressant treatment [55, 20].

Other preclinical studies have demonstrated a more expressive type of behavior in animals with induced diabetes [54, 8]. Different Zn compounds were used to test

antidepressant properties in several behavioral tests, suggesting that Zn may potentiate the action of antidepressants, in addition to reducing their side effects so that their supplementation has a therapeutic effect [39, 30].

In fact, some studies suggest Zn as a protective agent against brain damage [45], although its excess may produce cytotoxic effects [37, 27]. However, there are clinical studies against these results such an observational study with women, who observed that there is no correlation between the presence of depressive symptoms and Zn levels [23]. Other groups of depressed patients did not show changes in serum Zn levels [15]. Similarly, the results obtained in elderly patients with different psychiatric diagnoses showed that patients without depression presented higher Zn deficiency [11].

In this context, experimental studies involving Zn supplementation in diabetic rats substantially contribute to the safe prescription of Zn supplementation as an alternative to therapeutic treatment. Thus, the present study aimed to compare the antidepressant, anxiolytic and neuroprotective activity of supplementing two Zn compounds in an animal model of Type 1 Diabetes Mellitus (DM1).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental protocol

The experiments and protocols performed with the animals are in accordance with the principles recommended [9] and were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Paraíba (UFPB), under n°. 045/2015.

A total of 38 male adult Wistar (*Rattus norvegicus*, variety *albinus*) rats weighing 250 ± 30 g from Thomas George (UFPB) were used.

The animals were housed in individual metabolic cages and maintained under standard lighting conditions (light/dark cycle, 12/12 hours) and temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). Commercial ration (Presence, Paulínea, São Paulo) and filtered water were offered *ad libitum*. After one week of acclimatization, the animals were randomized into four groups: Control (C; n= 8); Diabetic (D; n = 10); Diabetic Zn sulfate supplemented (DSZ; n= 10) and Diabetic Zn gluconate supplemented (DGZ; n= 10).

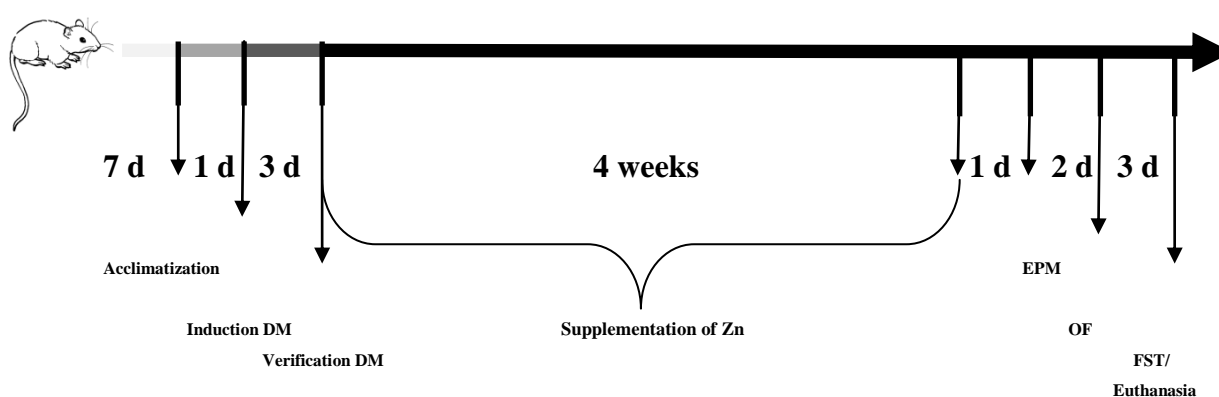


Figure 1. Experimental assay design.

Legend: EPM: Elevated Plus Maze. OF: Open Field. FST: Forced Swim Test.

2.2 Induction of diabetes mellitus type 1

The procedure for chemical induction of diabetes in the animals of the D, DSZ and DGZ groups was performed after a 12-hour fast. A solution of streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in citrate buffer (0.1 M, pH=4.5) was intraperitoneally administered in a single dose of 50 mg/kg body weight [33]. Group C intraperitoneally received equivalent doses of citrate buffer (0.1 M, pH=4.5), without the

addition of STZ. Three days after induction, animals that received glycemia greater than 250 mg/dL were considered diabetic and included in the experimental groups [33].

2.3 Zinc supplementation

The animals in the DSZ group received Zn sulfate supplementation and the animals in the DGZ group received Zn gluconate supplementation, both orogastrically administered at a dose of 15 mg/kg body weight/day once daily for 4 weeks [35]. The dosage choice used complied with the recommended maximum limit for rodents [22]. The animals of groups C and D underwent the stress of a gavage with filtered water during the same period of the other groups.

2.4 Behavioral parameters

The animals of all groups were submitted to behavioral tests at the end of the four weeks of supplementation, and each test was performed on subsequent days. Ideal conditions were maintained for these tests: attenuation of noise levels, low illumination intensity and controlled temperature ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). The animals were taken to the test room for acclimatization and adaptation half an hour before the experiments were performed.

2.4.1 Evaluation of depressive behavior

Antidepressant activity was evaluated by the Forced Swim Test (TNF) through observation of animal behavior in the face of an unconditioned stress situation [29]. The parameters observed are mobility and immobility, the latter also called behavioral inhibition, characterizes a behavior of the depressive type [19].

A cylinder (30 cm in diameter and 50 cm in height) was used with water at a depth of 30 cm and temperature ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$). The animals were taken to the antechamber, where they remained for 30 min. After that time, the animals were individually placed in the cylinder with water and submitted to the test for 5 minutes in a single session, with their active (swimming and climbing) and passive behavior (immobility) evaluated [40]. The evaluations were performed by two observers and filmed, then later transferred to a computer and analyzed in detail. At the end of the test the animals were dried with cloth towels. The water

was exchanged before and after exposure of each animal, and the apparatus was cleaned with 10% ethyl alcohol, allowing it to dry naturally.

2.4.2 Evaluation of anxious behavior

Anxiolytic activity was evaluated by the Elevated Plus Maze (EPM), in which behavioral conflict is based on the animal's need to explore the environment and the potential danger it poses [25].

Anxiolytic activity was evaluated by the Elevated Plus Maze (EPM), in which behavioral conflict is based on the animal's need to explore the environment and the potential danger it poses [25]. The EPM allows detecting the anxiolytic/anxiogenic activity of a variety of substances, since anxiogenic stimuli reduce the proportion of open arms exploration time in relation to the total exploration time, while anxiolytic stimuli increase this proportion [25].

The apparatus (Insight brand, Madeira, EP 151, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) consists of a platform with two open arms (50 x 10 cm) perpendicular to two closed arms (50 x 10 x 50 cm), forming a cross and raised 50 cm from the ground. There is an acrylic border of 1 cm in height surrounding the open arms in order to avoid falls by the animals.

Each animal was positioned in the center of the equipment and allowed to operate the equipment for 5 minutes. An observer made the annotations regarding the entry frequency and duration of the animals in the open arms and closed arms. The apparatus was cleaned with 10% ethyl alcohol and paper towels before and after the exposure of each animal, allowing it to dry naturally.

2.4.3 Evaluation of exploratory capacity

The exploratory activity was evaluated by the Open Field (OF) test [6], used for evaluating stimulant compounds or CNS depressants. The parameters indicative of a high exploratory behavior and low levels of anxiety are related to a greater number of ambulation in the quadrants [6].

The apparatus (Insight brand, EP 154, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) consists of a circular, transparent acrylic box measuring 50 cm in height and 60 cm in diameter. The white acrylic floor (100 cm x 80 cm) is divided into concentric circles (15, 34 and 55 cm radius) and black radial lines forming 12 quadrants of similar areas.

The animals were individually placed in the center of the device and the following behaviors were then observed during 5 minutes: a manual counter was used for recording ambulation (number of entries by the animal with four legs into any of the squares), rearing (number of times the animal is raised on its hind legs, perpendicular to the ground), grooming (number of times the animal self-cleans), immobility time (complete immobility of the animal) and number of fecal cakes. There was a specific observer for each evaluated behavior, totaling four properly trained observers. The apparatus was cleaned with 10% ethyl alcohol and paper towels before and after the exposure of each animal, allowing it to dry naturally.

2.5 Euthanasia

After 8 hours fasting, the animals were intraperitoneally anesthetized with ketamine (25 mg/kg) associated with xylazine (25 mg/kg). The absence of reflexes was confirmed after anesthesia and the brains were collected for histological analysis.

2.6 Histological analysis of the brain

The brains (right hemisphere) of each animal were sanitized with saline, fixed in 10% buffered formalin and stored in coded containers. The organs were processed according to the routine histopathological technique. Ten semi-serial cuts of 5 μm thick were obtained from the paraffin embedded material, following a cross-sectional plane to the analyzed organ of each animal. The obtained slides were stained using Hematoxylin and Eosin (H & E) technique, and the assembly was performed between lamina and laminula with synthetic resin (Entellan-Merck) for analysis in increasing lenses and photographed at 100x total magnification under an optical microscope (Motic, BA200). The structural architectures of the organs and the presence, characteristic and intensity of possible inflammatory infiltrates were evaluated in these analyzes.

2.7 Statistical analysis

Data sets were tested for normality and homogeneity using tests of variance. Behavioral data (mean \pm SEM) were analyzed by the Mann-Whitney test. The accepted level of significance was $p < 0.05$. The results were expressed as mean and standard error of the mean and were analyzed in Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

3.1 Behavioral parameters

The diabetic animals presented higher immobility time and shorter swimming time compared to the other groups during the Forced Swim Test (Figure 2). The DGZ group reduced the time of passive behavior characterized by the animal's immobility (116.6 ± 10.29 versus 164.4 ± 8.63 seconds, $p < 0.05$) and increased behavioral time (24.12 ± 4.91 versus 11.5 ± 3.62 seconds, $p < 0.05$), both compared to group D. The active swimming behavior was similar between groups D and DSZ ($p > 0.05$).

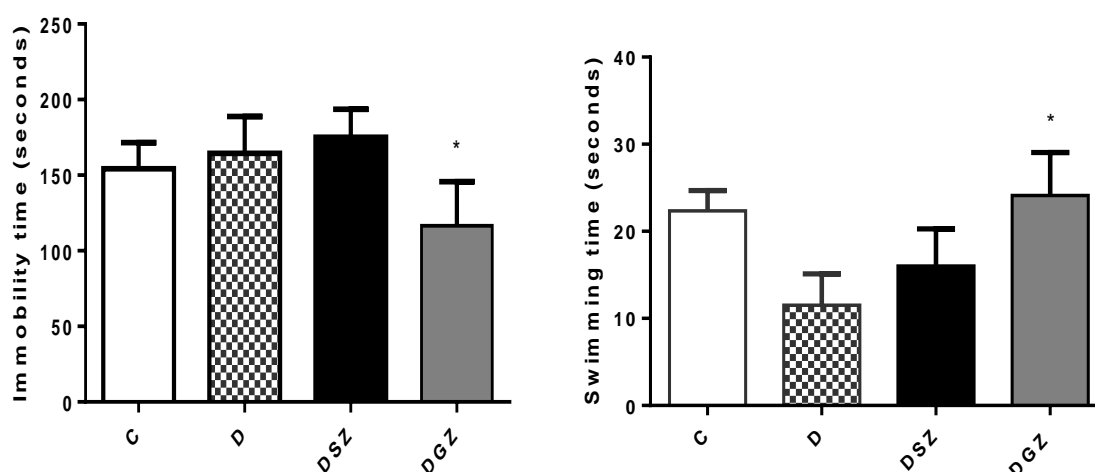


Figure 2. Evaluation of antidepressant activity using the Forced Swim Test in healthy and diabetic rats treated with two different Zn compounds.

Legend: C: Control Group; D: Diabetic Group; DSZ: Diabetic Group Supplemented with Zn Sulfate and DGZ: Diabetic Group Supplemented with Zn Gluconate. Mann-Whitney test ($p < 0.05$). *DGZ versus D and DSZ.

Regarding the anxiolytic symptoms measured by the Elevated Plus Maze (Figures 3 and 4), the DSZ group presented a longer residence time (22.13 ± 2.99 versus 7.87 ± 2.96 seconds, $p < 0.05$) and higher number of open arms (3.12 ± 0.39 versus 1.12 ± 0.39 , $p < 0.05$) compared to group D, whereas the DGZ group did not present significant changes significant in these parameters ($p > 0.05$). As for the closed arms, only the DSZ group had a shorter residence time (195.25 ± 57.92 versus 258.75 ± 23.11 seconds, $p < 0.05$) compared to the D group parameter.

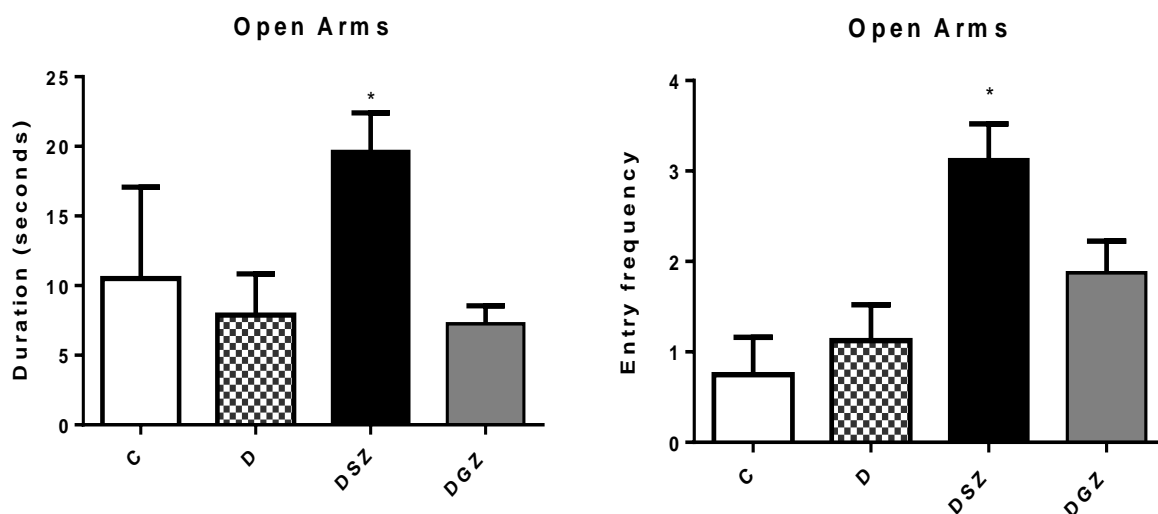


Figure 3. Evaluation of the anxiolytic activity using the Elevated Plus Maze considering the length of stay and the number of entries in the open arms in healthy and diabetic rats treated with two different Zn compounds.

Legend: C: Control Group; D: Diabetic Group; DSZ: Diabetic Group Supplemented with Zn Sulfate and DGZ: Diabetic Group Supplemented with Zn Gluconate. Mann-Whitney test ($p < 0.05$). *DSZ versus D and DGZ.

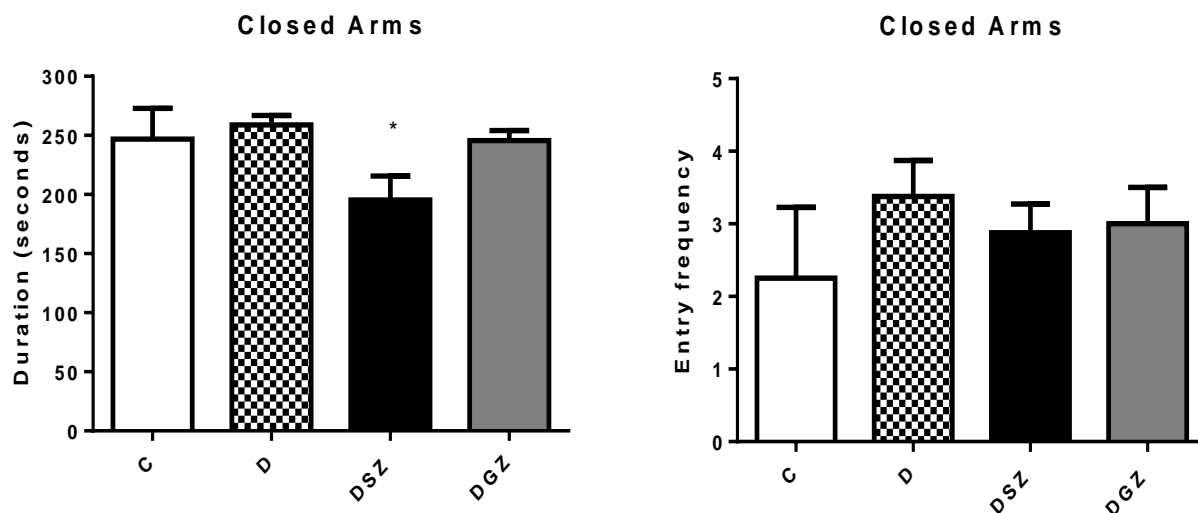


Figure 4. Evaluation of the anxiolytic activity using the Elevated Plus Maze considering the residence time and the number of entries in the closed arms in healthy and diabetic rats treated with two different Zn compounds.

Legend: C: Control Group; D: Diabetic Group; DSZ: Diabetic Group Supplemented with Zn Sulfate and DGZ: Diabetic Group Supplemented with Zn Gluconate. Mann-Whitney test ($p < 0.05$). *DSZ versus D and DGZ.

The exploratory activity was measured using the Open Field (Figure 5). The DSZ group presented better responses as evidenced by greater ambulation (29.25 ± 0.90 versus

18.50 ± 2.24 , $p < 0.05$) and shorter immobility time (3.12 ± 0.35 versus 6.87 ± 0.63 seconds, $p < 0.05$) compared to group D. The DGZ group had a shorter immobility time (3.87 ± 0.42 versus 6.87 ± 0.63 seconds, $p < 0.05$) compared to group D. In relation to the other evaluated parameters (rearing, grooming and number of fecal cakes) there were no differences ($p > 0.05$), so that these data were not included in the graphs.

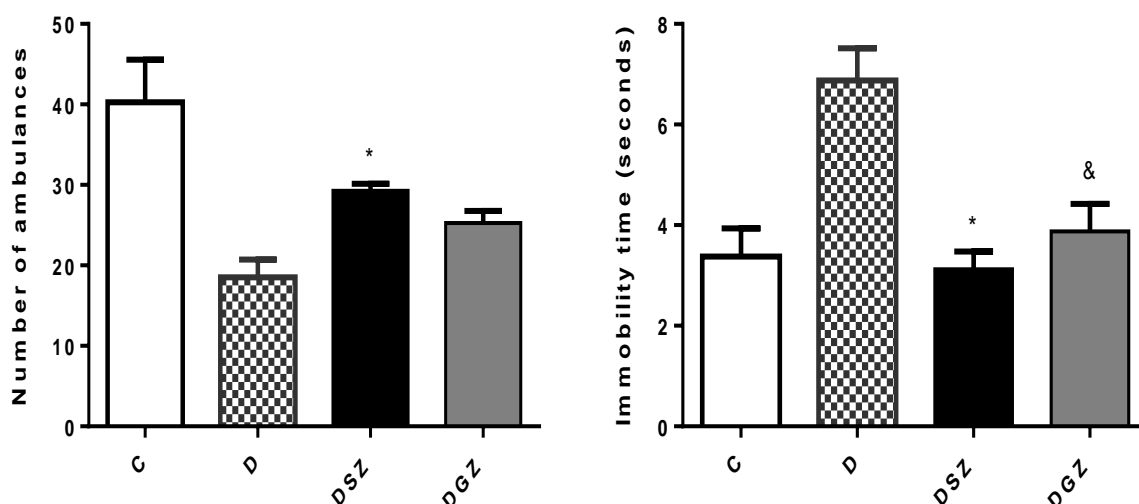


Figure 5. Evaluation of exploratory activity using the Open Field Test in healthy and diabetic rats treated with two different Zn compounds.

Legend: C: Control Group; D: Diabetic Group; DSZ: Diabetic Group Supplemented with Zn Sulfate and DGZ: Diabetic Group Supplemented with Zn Gluconate. Mann-Whitney test ($p < 0.05$). *DSZ versus D and DGZ; &DGZ versus D.

3.2 Histological analysis of the brain

For the histological analyzes of the cerebral cortex of the animals (Figure 6), it was observed that the group D animals presented cerebral degeneration characterized by the presence of ischemic neurons, hemorrhage and dilated vessels, whereas the DSZ group presented the presence of ischemic neurons, and animals from the DGZ group only had dilated vessels.

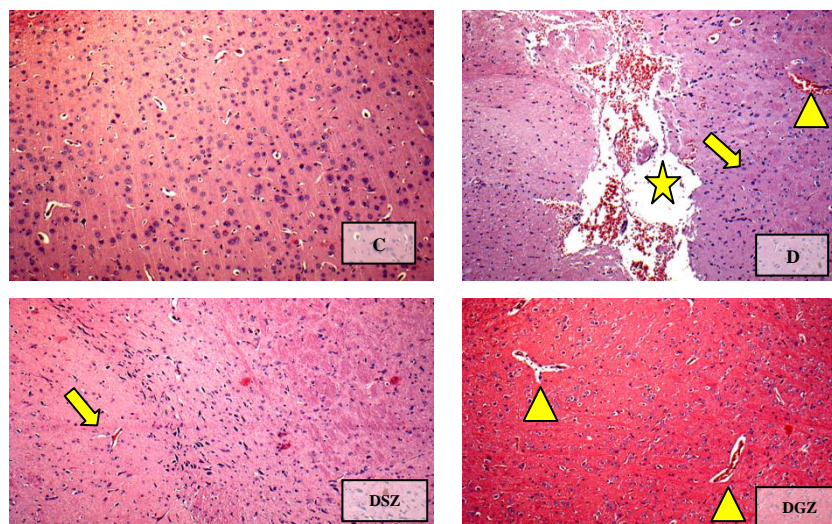


Figure 6. Histology of the cerebral cortex of healthy and diabetic rats treated with two different Zn compounds. (H & E, x 100).

Legend: C: Control Group; D: Diabetic Group, the arrow indicates ischemic neurons, the star indicates hemorrhage and the triangle indicates dilated vessels; DSZ: Diabetic Group Supplemented with Zn Sulphate, the arrow indicates ischemic neurons; DGZ: Diabetic Group Supplemented with Zn Gluconate, the triangle indicates dilated vessels.

4. DISCUSSION

The Forced Swim Test (FST) is based on motor activity followed by immobility in a situation where it is not possible to escape. In this test, the animal adopts a typical posture after an initial period of struggle, performing only the necessary movements to keep its head out of the water, with this behavior being exhibited by the animal called “despair behavior” [28]. In general, immobility is interpreted as a failure in the persistence of escape behavior [7].

Diabetic animals had longer immobility time on the FST compared to diabetic and Zn supplemented animals, indicating that changes in Zn homeostasis contribute to the development of behavior similar to depression. Our results suggest a potential antidepressant activity of Zn Gluconate evidenced by the lower immobility time ($p < 0.05$) in the DGZ group compared to the D and DSZ groups through the FST; the immobility time is used as an index of depressive behavior [40]. This is an interesting finding because supplementation with other Zn compounds has proved to be effective in other models of depression. One hypothesis for such an outcome is linked to the improved availability of Zn gluconate in the presence of DM, since the same dose and the same period of supplementation were used, with the difference only in the compound.

The swimming time parameter was used for evaluating locomotor activity and the results also showed a significant increase in the DGZ ($p < 0.05$) compared to the D group, although the DSZ group caused an increase in this parameter, with no statistical difference ($p > 0.05$). The other active behavior parameter (climbing) did not present a statistically significant difference between the analyzed groups ($p > 0.05$). Together, these results indicate that zinc gluconate plays a crucial role in the development of depression, and the subsequent restoration of this trace element reverses the behavioral signs of depression in animal models.

Our findings corroborate those by [31], who also found reduced immobility time on the FST in rodents supplemented with Zn chloride at a dose of 30 mg/kg/day. A study [52] found that immobility time on the FST was significantly higher in Zn-deficient mice, suggesting that a deficiency of this trace element causes an increase in behavior similar to depression. Hyperactivity of the glutamatergic system occurs in situations of Zn deficiency, thus generating depressive behavior, as demonstrated by [47]. Animals using an antidepressant allied to an adequate or supplemented with Zn diet for 3 weeks showed reduced behavioral despair as measured by the FST [48].

In addition, the antidepressant effect demonstrated by Zn on the FST in this work was related to the inhibition of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activity, and this result has been corroborated by other authors [42, 43, 20]. The antidepressant properties of Zn can attenuate the glutamatergic system through inactivation of the NMDA receptor, which is subject to modulation by various agents including metal ions [44].

In recent decades, the Elevated Plus Maze (EPM) has established itself as the most classic animal model of exploratory behavior used in the laboratory. In this context, EPM is a well-validated and widely used test as a means to detect new therapeutic agents and to aid in understanding the mechanisms involved in anxiety neurobiology [13]. The animal explores both the open and closed arms of the labyrinth, but typically it will more frequently enter and will remain longer in the closed arms. However, a higher intensity of anxiety behavior equates to a lower preference for open arms and thus a higher predilection for closed arms [25, 1].

Anxiety is an emotional situation that changes psycho and physiological components because it is an emotional anticipation of an aversive situation, difficult to control and likely to occur, causing the nervous system to be stimulated [56]. Our results demonstrated an increase in the length of stay and in the number of open arms ($p < 0.05$) in the DSZ group compared to the animals in groups D and DGZ, suggesting that this compound had an anxiolytic effect as confirmed by the longer stay in the open arms, and that the ambulatory capacity in these animals was preserved, indicating the ability of Zn sulfate to reduce anxiety

without causing sedation. Several Zn compounds were used and showed similar effects. In our study, the choice of Zn sulfate compounds and Zn gluconate occurred because of the increased use of these two compounds in animal and human supplementation studies, respectively, and were also based on other studies of our own, whose results of the supplementation showed beneficial effects in glycemic control in animals with DM1.

In using the EPM to predict the potential anxiolytic activity of Zn hydroaspartate in rats and mice, [24] found an increase in the percentage of open arms entries in both species without significantly altering the length of stay in these arms. Zn chloride at different doses of Zn (15 and 20 mg/kg) promoted anxiolytic effects in supplemented rats, evidenced by the increase in the residence time and the greater number of open arms in the EPM [16]. Zn oxide supplementation at different doses (5 mg/kg and 10 mg/kg) resulted in an anxiolytic effect in the EPM test in rats [50]. However, a study on rats supplemented with Zn oxide at a higher dose (25 mg/kg) did not find a significant difference in the anxiety indexes assessed by the EPM [2].

In particular, the Open Field (OF) is considered a good animal model of anxiety, and can evaluate changes in locomotor and exploratory activity, and suggest a correlation with emotional disturbances such as fear and anxiety in animals [36]. It can also be used to evaluate the efficacy of therapeutic drugs that may improve locomotion and/or motor function [49].

In our study we evaluated five parameters: ambulation, latency time, rearing, grooming and fecal cakes. We realized that the abilities to explore the surrounding environment and spontaneous ability were severely impaired in group D, representing the behavioral and emotional changes that could mimic the clinical symptoms of depression. The increase in anxiety in OF is related to a decrease in locomotion and an increase in the peripheral area; an increased permanence in the central portion of the field indicates anxiolysis, whereas a decrease in the permanence in the central part of the device can be interpreted as an anxiogenic effect [1].

The OF arena is considered a stressful environment for fear. More anxious and emotional animals tend to wander less and stay away from the central part of the arena in such conditions [5, 1]. Regarding the evaluated parameters, we noticed that Zn sulfate supplementation in the DSZ group animals improved their locomotor activity in the OF test, increased the number of crossed quadrants and decreased their immobility time ($p < 0.05$), indicating a lower anxiety level compared to the D and DGZ groups. These results allow for

suggesting that the locomotor activity was preserved after administrating Zn sulfate, so this Zn compound did not present sedative effect.

Were observed an increase in anxious behavior in Zn-deficient mice through less ambulation and less immobility during the OF test [47]. Rats fed a Zn-deficient diet for 2 weeks showed decreased ambulation and grooming, suggesting that anxiety-like behavior is increased in Zn deficiency [57]. Behavioral changes may especially represent an effect of Zn deficiency and may be informative about the various pathways in which this trace element is an important functional factor in brain function [12].

The Zn gluconate supplementation did not have an effect similar to Zn sulfate supplementation on anxiety behavior, although the same dose and the same period of supplementation were used. However, it may be noted that, although not statistically significant, there was a clear tendency to reduce anxiety-like behavior in rats supplemented with Zn gluconate. Together, these data suggest that both compounds are effective, although Zn sulfate presented a better response, raising the question about the proposed mechanisms by which Zn can act to improve anxious behavior.

Stress and anxiety have some parallels, as they appear to be genetically linked by sharing neurocircuits and common brain areas, including the prefrontal cortex, hippocampus, and amygdale [34]. In this sense, it is interesting to analyze some brain structures in search of connections between the role of Zn and the brain. In our study, we investigated the cerebral cortex of the animals and verified that the diabetic animals presented alterations characterized by the presence of ischemic neurons, hemorrhaging and dilated vessels, characterizing the oxidative stress of DM1. It is known that DM is associated with learning deficits and oxidative imbalances, which is reflected in alterations of enzymatic antioxidant defenses in organs and tissues, including the brain [17].

In our study, supplementation with the two Zn compounds showed beneficial effects on the cerebral cortex of diabetic animals, since these organs had more preserved structures with a reduction in ischemic neurons and hemorrhaging, suggesting a potential neuroprotective effect; especially of the Zn gluconate compound at doses within the recommended maximum limit for rodents [22]. This finding may be related to the different physico-chemical properties of this compound; as a result, Zn gluconate showed a greater interaction in biological tissues, reducing degeneration and preserving neuronal cells, attenuating the alterations due to diabetes mellitus in the cerebral cortex of diabetic animals, confirming its potential neuroprotective effect and, thus, attenuating the depressive behavior in animals.

We have a limitation related to the absence of the plasma Zn dosage for verifying the deficiency in the animals; therefore, a safe dose was used and below the recommended maximum limit for rodents. However, in view of the results obtained in diabetic animals and supplemented with the two Zn compounds, it can be suggested that the benefits occurred due to the Zn deficiency in these animals, confirming the relation attributed between DM1, Zn deficiency and behavioral changes.

5. CONCLUSIONS

The results found in animal model of DM1 indicate that Zn supplementation attenuated behavioral disorders. Considering the set of results, the two compounds had beneficial effects: Zn gluconate presented an antidepressant, neuroprotective effect and a potential anxiolytic effect, whereas Zn sulfate had an anxiolytic effect, thus contributing to better understanding to the role of Zn as a safe therapeutic alternative for supplementation in diabetic patients and those with behavioral disorders such as anxiety and depression.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

CLC, MCRG and JSA designed the study and the experiments. CLC, EVA, JLPC, RCA, PPL and NLS carried out the experiments. CLC and JSA analyzed the data. CLC, JLB and JSA implemented the reagents/materials/analysis tools. CLC and JSA wrote the article.

ACKNOWLEDGMENTS

The Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) granted a scholarship to CLC.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- [1] S.H. AHN, E.H. JANG, J.H. CHOI, H.R. LEE, J. BAKES, Y.Y. KONG, B.K. KAANG. Basal anxiety during an open field test is correlated with individual differences in contextually conditioned fear in mice, *Anim Cells Syst.* 17 (2013) 154-159.
- [2] S. AMARA, I.B. SLAMA, K. OMRI, E.L.GHOUL, K.B. RHOUMA, H. ABDELMELEK, M. SAKLY. Effects of nanoparticle zinc oxide on emotional behavior and trace elements homeostasis in rat brain, *Toxicol Ind Health.* 31 (2013) 1202-1209.
- [3] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes, *Diabetes care.* 40 (2017) S1-S135.
- [4] Y.S. BALHARA. Diabetes and psychiatric disorders, *Indian J Endocrinol Metab.* 15 (2011) 274-283.
- [5] P.S. BROCARDO, F. ASSINI, J.L. FRANCO, P. PANDOLFO, Y.M. MULLER, R.N. TAKAHASHI, A.L. DAFRE, A.L. RODRIGUES. Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain, *Toxicol Sci.* 97 (2007) 140-148.
- [6] D.K. CANDLAND, B.A. CAMPBELL. Development of fear in the rat as measured by behavior in the open field, *J Comp Physiol Psychol.* 55 (1962) 593-596.
- [7] J.F. CRYAN, A. MARKOU, I. LUCKI. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs, *Trends Pharmacol Sci.* 23 (2002) 238-245.
- [8] H. DE MORAIS, C.P. SOUZA, L.M. SILVA, D.M. FERREIRA, M.F. WERNER, R. ANDREATINI, J.M. CUNHA, J.M. ZANOVELI. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocindiabetic rats, *Behav Brain Res.* 1 (2014) 52-64.
- [9] GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. Institute of Laboratory Animal Resources. Washington DC: National Academy of Sciences. (2011).
- [10] S.H.GOLDEN, M. LAZO, M. CARNETHON, A.G. BERTONI, P.J. SCREINER, A.V. DIEZ ROUX, H.B. LEE, C. LYKETSOS. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes, *JAMA.* 299 (2008) 2751-2759.
- [11] J. GRØNLI, J. SOULÉ, C.R.BRAMHAM. Sleep and protein synthesis-dependent synaptic plasticity: impacts of sleep loss and stress, *Front Behav Neurosci.* 7 (2013) 1-18.
- [12] S. HAGMEYER, J.C. HADERSPECK, A.M. GRABRUCKER. Behavioral impairments in animal models for zinc deficiency, *Front Behav Neurosci.* 8 (2015) 1-16.
- [13] J. HALLER, M. ALICKI. Current animal models of anxiety, anxiety disorders and anxiolytic drugs, *Curr Opin.* 25 (2012) 59-64.
- [14] M. HUANG, L. GAO, L. YANG, F. LIN, H. LEI. Abnormalities in the brain of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats revealed by diffusion tensor imaging, *Neuroimage.* 1 (2012) 57-65.

- [15] G. IRMISCH, D. SCHLAEFKE, J. RICHTER. Zinc and fatty acids in depression, *Neurochem Res.* 35 (2010) 1376-1383.
- [16] M JOSHI, A.K. NAJMI, A.H. KHUROO, D. GOSWANI. Effect of zinc in animal models of anxiety, depression and psychosis, *Hum Exp Toxicol.* 31 (2012) 1237-1243.
- [17] J.W. KIM, S.M. NAM, Y.N. KIM, D. Y. YOU, J.H. CHOI, H.Y. JUNG, W. SONG, I.K. HWANG, J.K. SEONG, Y.S. YOON. Treadmill exercise prevents diabetes-induced increases in lipid peroxidation and decreases in Cu, Zn-superoxide dismutase levels in the hippocampus of Zucker diabetic fatty rats, *J. Vet. Sci.* 16 (2015) 11-16.
- [18] J.P. LÉPINE, M. BRILEY. The increasing burden of depression, *Neuropsychiatr Dis Treat.* 7 (2011) 3-7.
- [19] K. MLYNIEC, I.G. DE AQUERO SÁNCHEZ, K PYTKA, B. BUDZISZEWSKA, G NOWAK. Essential elements in depression and anxiety. Part I, *Pharmacol Rep.* 66 (2014) 534-544.
- [20] K. MLYNIEC, G. NOWAK. Zinc deficiency induces behavioral alterations in the tail suspension test in mice effect of antidepressants, *Pharmacol Rep.* 64 (2012) 249-255.
- [21] K. MLYNIEC, C.L. DAVIES, B. BUDZISZEWSKA , W. OPOKA, W. RECZYRISKI, M. SOWA-KUMA, U. DOBOSZEWSKA, A. PILC, G NOWAK. Time course of zinc deprivation-induced alterations of mice behavior in the forced swim test, *Pharmacol Rep.* 64 (2012) 567-575.
- [22] NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (U.S.) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition/Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington DC: National Academy Press (2001).
- [23] P. NGUYEN, R. GRAJEDA, J. MARCINKEVAGE, A.M. DIGIROLAMO, R. FLORES, R. MARTORELL. Micronutrient supplementation may reduce symptoms of depression in Guatemalan women, *Arch Latinoam Nutr.* 59 (2009) 278-286.
- [24] A. PARTYKA, M. JASTRZĘBSKA-WIĘSEK, B. SZEWCZYK, K. STACHOWICZ, A. SŁAWIŃSKA, E. POLESZAK, U. DOBOSZEWSKA, A. PILC, G. NOWAK. Anxiolytic-like activity of zinc in rodent tests, *Pharmacol Rep.* 63 (2011) 1050-1055.
- [25] S. PELLOW, P. CHOPIN, S.E. FILE, M. BRILEY. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat, *J Neurosci Methods.* 14 (1985) 149-167.
- [26] F. PETRAK, H. BAUMEISTER, T.C. SKINNER, A. BROWN, R.I.G. HOLT. Depression and diabetes: treatment and health-care delivery, *Lancet Diabetes Endocrinol.* 3 (2015) 472-485.
- [27] L.M. PLUM, L. RINK, H. HAASE. The essential toxin: impact of zinc on human health, *Int J Environ Res Public Health.* 7 (2010) 1342-1365.

- [28] R.D. PORSOLT, M. Le PICHON, M. JALFRE. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments, *Nature*. 266 (1977) 730-732.
- [29] PORSOLT, R. D. Animal model of depression, *Biomed Pharmacother*. 30 (1979) 139-140.
- [30] E. RANJBAR, M.S. KASAEI, M. MOHAMMAD-SHIRAZI, J. NASROLLAHZADEH, B. RASHIDKHANI, J. SHAMS, S.A. MOSTAFAVI, M.R. MOHAMMADJ. Effects of zinc supplementation in patients with major depression: a randomized clinical trial, *Iran J Psychiatry*. 8 (2013) 73-79.
- [31] A.O. ROSA, J. LIN, J.B. CALIXTO, A.R. SANTOS, A.L. RODRIGUES. Involvement of NMDA receptors and l-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice, *Behav Brain Res*. 144 (2003) 87-93.
- [32] F. ROTELLA, E. MANNUCCI. Depression as a risk factor for diabetes: a metaanalysis of longitudinal studies, *J Clin Psychiatry*. 74 (2013) 31-37.
- [33] R. X. SANTOS, S.C. CORREIA, M.G. ALVES, P.F. OLIVEIRA, S. CARDOSO, C. CARVALHO, A.L. DUARTE, M.S. SANTOS, P.I. MOREIRA. Insulin therapy modulates mitochondrial dynamics and biogenesis, autophagy and tau protein phosphorylation in the brain of type 1 diabetic rats, *Biochim Biophys Acta*. 1842 (2014) 1154-1166.
- [34] S.B. SARTORI, M. HAUSCHILD, M.BUNCK, S. GABURRO, R. LANDGRAF, N. SINGEWALD. Enhanced Fear Expression in a Psychopathological Mouse Model of Trait Anxiety: Pharmacological Interventions, *PloS One*. 6 (2011) 1-8.
- [35] A. SAPOTA, A. DARAGÓ, M. SKRZYPIŃSKA-GAWRYSIAK, M. NASIADEK, M. KLIMCZAK, A. KILANOWICZ. The bioavailability of different zinc compounds used as human dietary supplements in rat prostate: a comparative study, *Biometals*. 27 (2014) 495-505.
- [36] M. L. SEIBENHENER, W.C. WOOTEN. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice, *JoVE* 6 (2015) 1-6.
- [37] S.L. SENSI, J.M. JENG. Rethinking the excitotoxic ionic milieu, the emerging role of Zn(2+) in ischemic neuronal injury, *Curr Mol Med*. 4 (2004) 87-111.
- [38] C. SHABAN. Psychological themes that influence self-management of type 1 diabetes, *World J Diabetes*. 6 (2015) 621-625.
- [39] M. SIWEK, D. DUDEK, M. SCHLEGEL-ZAWADZKA, A. MORAWSKA, W. PIEKOSZEWSKI, W. OPOKA, A. ZIEBA, A. PILC, P. POPIK, G. NOWAK. Serum Zinc Level in Depressed Patients During Zinc Supplementation of Imipramine Treatment, *J Affect Disord*. 126 (2010) 447-452.
- [40] D.A. SLATTERY, J.F. CRYAN. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents, *Nat Protoc*. 7 (2012) 1009-1014.

- [41] R.B. STRANDBERG, M. GRAUE, T. WENTZEL-LARSEN, M. PEYROT, B. ROKNE. Relationships of diabetes-specific emotional distress, depression, anxiety, and overall well-being with HbA1c in adult persons with type 1 diabetes, *J Psychosom Res.* 77 (2014) 174-179.
- [42] B. SZEWCZYK, M. GRAUE, T. WENTZEL-LARSEN, M. PEYROT, B. ROKNE. Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action, *Pharmacol Rep.* 60 (2008) 588-599.
- [43] B. SZEWCZYK, M. KUBERA, G. NOWAK. The role of zinc neurodegenerative inflammatory pathways in depression, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 35 (2011) 693-701.
- [44] B. SZEWCZYK, A. PAŁUCHA-PONIEWIERA, E. POLESZAK, A. PILC, G. NOWAK. Investigational NMDA receptor modulators for depression, *Expert Opin Investig Drugs.* 21 (2012) 91-102.
- [45] B. SZEWCZYK. Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders, *Front Aging Neurosci.* 5 (2013) 1-12.
- [46] A. TAKEDA, H. TAMANO, F. KAN, H. ITOH, N. OKU. Anxiety-like behavior of young rats after 2-week zinc deprivation, *Behav Brain Res.* 177 (2007) 1-6.
- [47] A. TAKEDA, H. TAMANO, T. OGAWA, S. TAKADA, M. ANDO, N. OKU, M. Watanabe. Significance of serum glucocorticoid and chelatable zinc in depression and cognition in zinc deficiency, *Behav Brain Res.* 226 (2012) 259-264.
- [48] TASSABEHJI, N. M. CORNIOLA RS, ALSHINGITI A, LEVENSON CW. Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats, *Physiol Behav.* 95 (2008) 365-369.
- [49] K.S. TATEM, J.L. QUINN, A. PHADKE, Q. YU, H. GORDISH-DRESSMAN, K. NAGARAJU. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases, *JoVE.* 91 (2014) 1-7.
- [50] M. TORABI, M. KESMATI, H.E. HAROONI, H.N. VARZI. Effects of nano and conventional Zinc Oxide on anxiety-like behavior in male rats, *Indian J Pharmacol.* 45 (2013) 508-512.
- [51] A.A.WALF, C.A. FRYE. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents, *Nat Protoc.* 2 (2007) 322-328.
- [52] M. WATANABE, H. TAMANO, T. KIKUCHI, A. TAKEDA. Susceptibility to stress in young rats after 2-week zinc deprivation, *Neurochem Int.* 56 (2010) 410-416.
- [53] C.A.Y. WAYHS, V. MANFREDINI, A. SITTA, M. DEON, G. RIBAS, C. VANZIN, G. BIANCINI, M. FERRI, M. NIN, H.M. BARROS, C.R. VARGAS. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect, *Metab Brain Dis.* 25 (2010) 297-304.

- [54] C.A. WAYHS, C.P. MESCKA, C.S. VANZIN, G.S. RIBAS, G. GUERREIRO, M.S. NIN, V. MANFREDINI, H.M. BARROS, C.R. VARGAS. Brain effect of insulin and clonazepam in diabetic rats under depressive-like behavior, *Metab Brain Dis.* 28 (2013) 563-570.
- [55] N. WHITTLE, G. LUBEC, N. SINGEWALD. Zinc deficiency induces enhanced depression-like behaviour and altered limbic activation reversed by antidepressant treatment in mice, *Amino Acids.* 36 (2009) 147-158.
- [56] K.B. WOLITZKY-TAYLOR, N. CASTRIOTTA, E.J. LENZE, M.A. STANLEY, M.G. CRASKE. Anxiety disorders in older adults: a comprehensive review, *Depress Anxiety.* 27 (2010) 190-211.
- [57] Y. XIE, Y. WANG, T. ZHANG, G. REN, Z. YANG. Effects of nanoparticle zinc oxide on spatial cognition and synaptic plasticity in mice with depressive-like behaviors, *J Biomed Sci.* 19 (2012) 1-11.