



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NÚCLEO DE TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

TAMARA DANTAS MAUÉS

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO AÇAÍ (*EUTERPE
OLERACEA*) SOBRE AS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS VISUAIS E
COMPORTAMENTAIS DE RATOS WISTAR COM RETINOPATIA DIABÉTICA
INDUZIDA**

Belém

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NÚCLEO DE TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA*)
SOBRE AS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS VISUAIS E
COMPORTAMENTAIS DE RATOS WISTAR COM RETINOPATIA DIABÉTICA
INDUZIDA**

TAMARA DANTAS MAUÉS

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Neurociências e comportamento, sob a orientação do Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha e Co orientação do Prof. Dr. Paulo Roney Killp Goulart.

Belém

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo
com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

D192i DANTAS MAUÉS, TAMARA.
INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO AÇAÍ (EUTERPE OLERACEA)
SOBRE AS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS VISUAIS E COMPORTAMENTAIS DE
RATOS WISTAR COM RETINOPATIA DIABÉTICA INDUZIDA / TAMARA DANTAS
MAUÉS. — 2018.
101 f. : il.

Orientador(a): Prof. Dr. Fernando Allan de
Farias Rocha Coorientador(a): Prof. Dr. Paulo
Roney Killp Goulart
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento,
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

1. Diabetes. 2. eletroretinografia. 3. retinopatia diabética. 4. comportamento. 5. aprendizagem. I.
Título.

CDD 612.82

DADOS DA DEFESA E BANCA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA*)
SOBRE AS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS VISUAIS E
COMPORTAMENTAIS DE RATOS WISTAR COM RETINOPATIA DIABÉTICA
INDUZIDA**

Candidata: Tamara Dantas Maués

Data da defesa: 22/10/2018

Resultado:

Banca examinadora:

Prof. Dr Fernando Allan de Farias Rocha
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará Orientador

Prof. Dr. Paulo Roney Killp Goulart
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará Coorientador

Prof. Dr Bruno Gomes Duarte (Titular)

Prof. Dr. Saulo Misiaggia Velasco (Titular)

Profª. Dra. Ana Leda de Faria Brino (suplente)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por todo amor,
incentivo e exemplo de que na vida
sempre devemos buscar alcançar
nossos objetivos .*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades que me concedeu e que me fizeram chegar até aqui, pela sabedoria, discernimento, coragem para enfrentar os desafios e nunca desistir dos meus sonhos.

Agradeço a minha mãe, minha heroína, por sempre estar presente me encorajando a conquistar meus objetivos, sendo paciente nos meus momentos de aflição, ansiedade e pelas sábias palavras sempre acolhedoras e assertivas nos momentos em que o silêncio era desanimador.

Ao meu papai, meu grande exemplo de que o conhecimento é a chave que abre todas as portas, que te impulsiona a conquistar o que parece impossível e onde a educação é base de tudo.

Aos meus amados irmãos Jéssica e Matheus, meus companheiros, melhores amigos, e com quem pude caminhar nessa jornada mais feliz por tê-los em minha vida.

Ao meu orientador prof. Dr. Fernando Allan, por me despertar o interesse em conhecer o mundo da eletro-neurofisiologia me auxiliando e conduzindo no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Paulo Goulart, pelos seus ensinamentos, contribuições e paciência em me ajudar a compreender a Análise do comportamento.

Aos colegas do LNEOC, Hanna Katarine, Atônio Bastos, Luana Aparecida, Filipe, Thony pela contribuição e convivência diária e companheirismo. Um obrigado mais que especial a : Edwiges Oliveira, Matheus Rosa que foram muito importantes na condução desta pesquisa, sempre me auxiliando e compartilhando os saberes, os quais pude contar em todos os momentos deste projeto.

À professora Ana Leda pela dedicação, paciência e disposição em me ensinar mais sobre análise do comportamento e esquemas de aprendizagem em animais.

Aos Técnicos do biotério, Amarildo, ao coordenador Reginaldo, por sempre estarem dispostos a me ajudar nos cuidados e manutenção dos meus animais de pesquisa.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Neurociências e Comportamento, que de alguma forma e em algum momento, nesses anos, fizeram parte dessa história e contribuíram para a conclusão desse ciclo.

Ao Núcleo de teoria e pesquisa do comportamento, em destaque a coordenação, que me disponibilizou espaço para que esta pesquisa fosse possível.

Ao CNPq e FAPESPA pelo apoio financeiro.

RESUMO

MAUÉS, T.D. Investigação do efeito neuroprotetor do açaí (*Euterpe Oleracea*) sobre as alterações eletrofisiológicas visuais e comportamentais de ratos *Wistar* com retinopatia diabética induzida. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em Neurociências e comportamento. Universidade Federal do Pará. 2018. 101 páginas.

O *diabetes mellitus* hoje é considerado um problema de saúde pública mundial. A doença é descrita como uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada pela hiperglicemia crônica e déficit absoluto ou relativo na secreção ou ação da insulina, que resultam em alterações microvasculares e neurais desencadeando diversas complicações. A retinopatia diabética é tida como umas das principais complicações que provocam cegueira. Estudos apontam que o estresse oxidativo tem participação central no mecanismo de alteração e dano na retina. O açaí (*Euterpe Oleracea*) tem atraído muita atenção dada à sua capacidade antioxidante e benefícios potenciais associados à saúde na prevenção e redução do estresse oxidativo. A presente pesquisa objetivou avaliar o possível efeito neuroprotetor do açaí (*Euterpe oleracea*) na função retiniana de ratos *Winstar* com diabetes induzida de forma transversal, a partir do eletrorretinograma de campo total ($_{ff}$ ERG), bem como a avaliação do desempenho comportamental através do treino discriminativo claro/escuro. Optou-se por modelos de ratos *Winstar* com diabetes induzidas a partir da injeção com aloxano a 2% e tratamento com ração enriquecida com polpa de açaí por 30 dias. O animais foram divididos em 3 grupos: controle (recebeu ração padrão), DM (recebeu ração padrão) e DM + açaí (ração enriquecida com açaí). Os procedimentos de análise comportamental tiveram início com todos animais antes da indução diabetogênica até a fase de CRF, posteriormente, foi retomado até o término do treino discriminativo claro/escuro. O ERG teve início após 30 dias de indução e dieta com açaí. Os resultados do presente estudo mostram que a utilização de dieta enriquecida com açaí é eficaz contra a diminuição da amplitude das respostas eletrofisiológicas visuais em animais com diabetes induzida e demonstrou influência na aquisição de aprendizagem operante, observado através do treino discriminativo claro/escuro com menor tempo de sessões de treino no grupo diabetes + açaí em comparação ao diabético. Estes achados despertam o interesse em se buscar novas terapêuticas adjuvantes à insulina com uso dos fitoquímicos presentes no açaí no tratamento do Diabetes mellitus e suas complicações.

Palavras - chave: Diabetes, retinopatia diabética, estresse oxidativo, *Euterpe Oleracea*, eletroretinografia, comportamento, aprendizagem

ABSTRACT

MAUÉS, T.D. Investigation of the neuroprotective effect of açai (Euterpe Oleracea) in the visual and behavioral electrophysiological of Wistar rats with induced diabetic retinopathy.. Master's Dissertation presented to the Graduate Program in Neurosciences and Behavior. Federal University of Pará, 2018. 101 pages.

Diabetes mellitus today is considered a worldwide public health problem. The disease is described as a metabolic disorder of the etiology, characterized by chronic hyperglycemia and absolute deficit or relative to the secretion or action of insulin, which results in microvascular and neural changes triggering several complications. Diabetic retinopathy is one of the leading causes of blindness. Studies demonstrating oxidative stress have a central role in the mechanism of alteration and damage to the retina. Açai (Euterpe Oleracea) has attracted a lot of attention for its antioxidant capacity and extracts the benefits associated with health in the prevention and reduction of oxidative stress. The present research aimed at the neuroprotective effect of açai (Euterpe oleracea) on a retinal function of rats as a transverse action test, from the total field electroretinogram (ffERG), as well as the evaluation of behavioral performance through discriminative training of the light and dark. We chose models of Wistar rats with diabetes induced by injection with 2% aloxane and treatment with enriched açai pulp for 30 days. The animals were divided into three groups: açai (DM) and DM + açai enriched ration (açai enriched ration). Behavior analysis procedures started with all animals prior to diabetic induction until a CRF stage, after which they were submitted to the completion of the light and dark discriminative training. ERG started after 30 days of induction and açai diet. The results of this study were, in turn, the use of a diet enriched with the aid of efficacy in the demonstration of the visual electrophysiological responses in animals with induced diabetes and demonstrated influence in learning ability through the light / dark discriminative training with less time of training sessions in the diabetes + açai group compared to the diabetic group. These were the alarm clocks of interest in seeking new adjuvant insulin therapies with the use of the drugs present in açai in the treatment of Diabetes Mellitus and Its Complications.

Key words: Diabetes, diabetic retinopathy, Behavior, learning, eletroretinograh, oxidative stress, Euterpe Oleracea

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura laminar e composição celular da retina	25
Figura 2: Exemplo do estímulo apresentado originalmente pelo Cambridge Colour Test para discriminação cromática	31
Figura 3 Foto da ração enriquecida com açaí	40
Figura 4: Eletrodos utilizados no eletrorretinograma.	41
Figura 5: Disposição dos equipamentos para realização dos registros eletrorretinográficos	42
Figura 6: Padrões de respostas esperadas no eletrorretinograma.	45
Figura 7: Exemplo de disposição de estímulo cromático adotado.	46
Figura 8: Peso dos animais de cada grupo antes dos experimentos	53
Figura 9: Medida de glicemia dos grupos pós indução diabética nos experimentos	55
Figura 10: Amplitude da onda b em resposta escotópica de bastonete	57
Figura 11: Amplitude da onda b em resposta escotópicas mista 1	58
Figura 12: Amplitude da onda b em resposta escotópica mista 2	59
Figura 13: Amplitude da onda b em resposta fotópica de cones S	60
Figura 14: Amplitude da onda b em resposta fotópica de cones 1HZ	63
Figura 15: Amplitude da onda b em resposta fotópicas cone M	62
Figura 16: Padrão de Registro da resposta escotópica de bastonete dos grupos	64
Figura 17: Padrão de Registro da resposta escotópica de mista 1	65
Figura 18: Padrão de Registro da resposta escotópica de mista 2	66
Figura 19: Padrão de Registro da resposta fotópica de cone 1Hz	67
Figura 20: Padrão de Registro da resposta fotópica de cone S	68
Figura 21: Padrão de Registro da resposta fotópica de cone M	69
Figura 22: Taxa de resposta de pressão à barra (RPB) em CRF	71
Figura 23: Taxa de resposta de pressão à barra (RPB) em recuperação de CRF	72
Figura 24: Número total de sessões para término do treino discriminativo	73
Figura 25: Diferença nas taxas de respostas em recuperação de CRF e treino discriminativo em CRF	74
Figura 26: Diferença nas taxas de respostas de discriminativo em CRF e VR2	75
Figura 27: Taxa de resposta de pressão à barra em treino discriminativo claro/escuro VR2	76
Figura 28: Registro do desempenho em todas as sessões do procedimento de treino discriminativo dos animais de teste do grupo controle	77
Figura 29: Registro do desempenho em todas as sessões do procedimento de treino discriminativo dos animais de teste do grupo diabético	78
Figura 30: Registro do desempenho em todas as sessões do procedimento de treino discriminativo dos animais de teste do grupo diabetes + açaí	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais	37
Tabela 2: Média da massa corporal dos grupos do estudo	53
Tabela 3: Monitorização de glicemia pós indução diabetogênica nos grupos experimentais	54
Tabela 4: Médias e desvio padrão das amplitudes da onda b em resposta escotópica de bastonetes	56
Tabela 5: Médias e desvio padrão das amplitudes da onda b em resposta escotópica de mista 1	57
Tabela 6: Médias e desvio padrão das amplitudes de onda b em resposta escotópica de mista 2	59
Tabela 7: Médias e desvio padrão das amplitudes de onda b em resposta fotópica de cones S	60
Tabela 8: Médias e desvio padrão das amplitudes de onda b em resposta fotópica de cones 1Hz	61
Tabela 9: Médias e desvio padrão das amplitudes de onda b em resposta fotópica de cones M	62
Tabela 10: Médias e desvio padrão das taxas de respostas pressão a barra entre os grupos na fase CRF	70
Tabela 11: Médias e desvio padrão da taxa de resposta na fase de recuperação do CRF	71
Tabela 12: Médias e desvio padrão do nº de sessões para conclusão do treino discriminativo	73
Tabela 13: Médias e desvio do incremento de treino discriminativo em CRF e recuperação de CRF	74
Tabela 14: Médias e desvio padrão do incremento de treino discriminativo em VR2 e treino discriminativo em CRF	75
Tabela 15: Médias e desvio padrão das taxas de resposta do treino discriminativo Claro/ escuro	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA Análise de Variância

CRF Reforço contínuo de cada resposta

DP Desvio padrão

ERG Eletrorretinograma de campo total

EROS estresse oxidativo

EXT extinção

GLUT Glicose transportation

ISCEV Sociedade Internacional Eletrofisiologia Clínica da Visão

OMS Organização Mundial de Saúde

RPB Resposta de pressão à barra

VR Razão variável

LISTA DE SÍMBOLOS

cpg ciclos por grau ângulo visual

g Gramas

Hz Hertz

mg/dl Miligrama por decilitro

mg/Kg Miligrama por kilograma

mg Miligrama

milhões/mm³ Milhões por milímetro cubico

ms Milissegundo

μV Microvolt

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
APRESENTAÇÃO	18
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Definição e classificação do diabetes	20
1.2 Retinopatia Diabética	21
1.3 Neurofisiologia visual	24
1.4 Fisiologia visual de roedores	26
1.5 Eletrorretinograma de campo total (FF ERG)	26
1.6 Açai e sua capacidade antioxidante	28
1.7 Avaliação psicofísica para visão de Cores.	30
1.7.1 <i>Avaliação comportamental</i>	32
1.7.2 <i>Comportamento operante – discriminação</i>	33
2 OBJETIVO	34
3 MÉTODO	35
3.1 Ambiente	36
3.2 Sujeitos	36
3.2.1 <i>Grupos experimentais</i>	37
3.3 Modelo de diabetes experimental .	37
3.3.1 <i>Aferição de glicemia .</i>	38
3.4 Dieta dos animais	39
3.4.1 <i>Dieta enriquecida com açai</i>	39
3.5 Monitoramento do peso corporal	39
3.6 Avaliação eletrofisiológica através do eletroretinograma de campo total	40
3.6.1 <i>Instrumentos para realização do ERG</i>	40
3.7 Procedimentos de coleta de dados	42
3.7.1 <i>Realização do Eletroretinograma</i>	43
3.7.1.1 <i>Preparação do animal para o ensaio eletrofisiológico</i>	43
3.7.2 <i>Mensuração dos componentes do ERG</i>	44
3.8 Avaliação comportamental	45
3.8.1 <i>Equipamentos para testes psicofísicos</i>	46
3.8.2 <i>Estímulos</i>	47
3.8.2 <i>Preparo do animal para avaliação psicofísica</i>	47
3.9 Análise estatística dos dados	51
4. RESULTADOS.	52
4.1 Caracterização da amostra	52
4.1.1 <i>Avaliação da massa corporal dos ratos</i>	52
4.1.2 Glicemia	53
4.2 Respostas do eletrorretinograma	54
4.2.1 <i>Resposta escotópica de bastonete</i>	55
4.2.2 <i>Resposta escotópica (Mista 1)</i>	56

4.2.3 <i>Resposta escotópica (Mista 2)</i>	57
4.3 Respostas Fotópicas	58
4.3.1 <i>Resposta fotópica de cones S</i>	59
4.3.2 <i>Resposta fotópica de cones 1Hz</i>	60
4.3.3 <i>Resposta fotópica de cones M</i>	61
4.4 Padrão de repostas ERG	61
4.4 Resultados dos testes comportamentais	68
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÃO	88
7. REFERÊNCIAS	89
ANEXOS	

Apresentação

O diabetes melito (DM) é uma síndrome metabólica complexa em que ocorre uma deficiência relativa ou absoluta de insulina afetando o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Estima-se que no Brasil 7,6% da população urbana entre 30 e 69 anos apresente DM, sendo que 46% dos casos não se sabem portadores de DM. O DM está associado a complicações crônicas cardiovasculares, do sistema nervoso periférico e autonômico e microvascular.

Uma das complicações microvasculares mais importantes do DM é a retinopatia diabética (RD), que é a principal causa de novos casos de cegueira nas idades de 20 a 64 anos, causando 8000 novos casos de cegueira a cada ano. No Brasil, estima-se que metade dos pacientes portadores de DM seja afetada pela RD, sendo responsável por 7,5% das causas de incapacidade de adultos para o trabalho e por 4,58% das deficiências visuais (Sociedade Brasileira de Oftalmologia, 2015).

A hipóxia tecidual, acompanhada da perda da auto-regulação dos vasos retinianos provocada pelo estresse oxidativo, é o fator desencadeante da RD. A hiperglicemia está associada a outros possíveis fatores causais como dano celular mediado por alterações no metabolismo da glicose.

O estudo sobre fotoquímicos capazes de atenuar ou prevenir alterações pelo estresse oxidativo ainda é investigado. O açaí como fruto rico em substâncias antioxidantes mostra-se como importante alimento funcional, podendo apresentar ação neuroprotetora de danos visuais na RD.

A avaliação e compreensão quanto o consumo do açaí e seu efeito nos danos visuais, ocasionados pela retinopatia e sobre o comportamento de aprendizagem em discriminação de cores dos roedores, torna-se necessário para elucidar as mudanças ocorridas nos sujeito nesse

processo. Diante desta abordagem, este estudo se propôs analisar as alterações visuais e comportamentais de aprendizado relacionados à patologia em questão utilizando modelo animal, afim de verificar os efeitos da ingestão de açaí sobre estas alterações.

Introdução

Diabetes mellitus (DM) é um dos principais problemas de saúde pública atualmente, decorrente das complicações crônicas incapacitantes e ao aumento da mortalidade dos indivíduos afetados.

1.1 Definição e classificação do diabetes

O termo “diabetes mellitus” (DM) refere-se a um transtorno metabólico de etiologias heterogêneas, caracterizado por hiperglicemia e distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, resultantes de defeitos da secreção e/ou da ação da insulina (*World Health Organization*, 2009). O DM vem tornando-se bastante relevante pela sua crescente prevalência e habitualmente está associado à dislipidemia, à hipertensão arterial e à disfunção endotelial (Alfradique *et al.*, 2009). A doença possui alta incidência mundial, ainda sem possibilidade de cura (Brasil, 2013).

O diabetes pode ser classificado em 4 classes clínicas, proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes em: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos de DM específicos, sendo os 3 primeiros os principais e com maior frequência na população (Diretrizes SBD, 2015; IDF, 2017).

O diabetes tipo I é de caráter autoimune, onde o sistema imunológico ataca a células do pâncreas (células pancreáticas) e estas são destruídas, havendo assim, insuficiência na produção de insulina, hormônio responsável pelo metabolismo da glicose. Como resultado, a glicose fica circulante no sangue e não é utilizada como fonte de energia, levando ao quadro de hiperglicemia. O tipo I surge geralmente na infância, acometendo de 5 - 10% do total de pessoas com diabetes (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015, *American Diabetes Association*, 2010).

O diabetes tipo II aparece quando o organismo não conseguiu utilizar adequadamente a insulina que produz, ou não é capaz de produzir quantidade suficiente de insulina para controlar o nível de glicose. Corresponde a 90% do total de indivíduos portadores da doença (Sociedade Brasileira de Diabetes 2015 & *American Diabetes Association*, 2010).

A gestacional pode ocorrer neste período de vida da mulher por está associado as mudanças hormonais decorrentes da gravidez. É uma condição temporária, que afeta de 2 a 4% de todas as gestantes e implica em risco aumentado de desenvolvimento posterior de diabetes para mãe e filho (Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD -, 2015, *American Diabetes Association*, 2010).

O DM1 idiopático corresponde à minoria dos casos e caracteriza-se pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células beta. Os indivíduos com essa forma de DM podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina. Como a avaliação dos anticorpos não se encontra disponível em todos os centros, a classificação etiológica do DM1 nas subcategorias autoimune e idiopática pode não ser sempre possível. (Diretrizes da SBD, 2014).

O diabetes por se tratar de uma patologia crônica que apresenta diversas alterações no organismo que culminam com o aparecimento de complicações agudas e crônicas como retinopatia diabética considerada uma das complicações mais incapacitantes do diabetes (Dias; Vieira, Fragoso; Rezende & Palata, 2010; Brasil, 2013).

1.2 Retinopatia diabética

Esta é caracterizada por um conjunto de alterações anatômicas e funcionais, essencialmente vasculares, que se instala na retina em decorrência da hiperglicemia crônica. Apresenta como característica dano em microvasos gerando alterações estruturais de pequenos vasos da retina, onde há diminuição do oxigênio no tecido vascular, acompanhada

da perda de autorregulação dos vasos retinianos, que é o fator desencadeante da RD (Esteves, 2008 & Serrabassa *et al.*, 2008).

Enquanto a maioria dos estudos têm dado ênfase às mudanças na vascularização da retina, na RD surgem evidências de que a função de células nervosas da retina é alterada logo após o início do diabetes. Mudanças funcionais podem ser identificadas antes do desenvolvimento da patologia vascular, sugerindo que elas são decorrentes de um efeito direto do diabetes na retina neural (Serrabassa *et al.*, 2008 & Dias *et al.*, 2010).

Alterações morfoneurofuncionais na retina diabética são observadas desde início da patologia. Park e colaboradores (2003), demonstraram em experimento com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina que os processos pós-sinápticos das células horizontais apresentaram degeneração com 1 semana após o início do diabetes. Em outro estudo, observou-se que após 4 semanas há células ganglionares necróticas e apoptose em células fotorreceptoras com o decorrer da doença, e com 12 semanas algumas células amácrinas e horizontais continham características necróticas (Carmo, 2010).

Os estágios progressivos da RD podem ser reconhecidos clinicamente que cursa com estágios clínicos classificados basicamente em dois: não proliferativo e proliferativo. A fase não proliferativa é caracterizada por alterações associadas ao aumento da permeabilidade capilar, como microaneurismas, edema macular e exudatos duros (extravasamento de lipoproteínas), e também à oclusão vascular que pode ou não ocorrer nesta fase. Quando a neovascularização aparece na interface vítrea da retina, a retinopatia é considerada então no estágio proliferativo (Bosco *et al.*, 2005).

A fase proliferativa é caracterizada por neovascularização da retina, disco óptico e íris. Essa neovascularização desencadeia complicações como hemorragia vítrea e descolamento tracional da retina que levam à cegueira (Henriques, 2006 & *American Academy of*

Ophthalmology, 2004).

Tendo início nos vasos de calibre menor (capilares) com o comprometimento da barreira hematoretiniana. Esta barreira atua no controle da entrada e saída de fluídos para os meios intra e extracelular. As alterações decorrentes da RD podem acarretar no desequilíbrio na manutenção dos fotorreceptores e conseqüentemente promovem mudanças neuronais nas células da retina (Rosales, 2014).

As causas para o estabelecimento da RD estão relacionados a uma série de processos químicos para o metabolismo da glicose, ou mecanismos afetados por ela. Na retina há absorção da glicose e esta, é realizada por transportadores conhecidos como *GLUT* (glucose transportation). Quando ocorre aumento na concentração intracelular de glicose, no caso da hiperglicemia, há ativação destas vias, que ocorrem em situação de transporte excessivo de glicose intracelular (Pérez, 2009 & Luu, 2010).

O estresse oxidativo se mostra como uma das principais vias associadas ao desenvolvimento da RD, por se tratar da principal via de metabolismo da glicose. Porém, a ativação desta via promove a liberação de uma enzima (aldose redutase) enzima redutora de glicose em sorbitol (Pérez 2009 & Luu, 2010).

Como mecanismo de resposta à hiperglicemia nos casos de indivíduos diabéticos, há então acúmulo de sorbitol nas células dos capilares retinianos, levando a um estado de hiperosmolaridade (elevado nível de glicose) que causa diminuição na absorção de oxigênio, gerando redução da oxigenação tecidual, provocando morte celular nos capilares da retina (Kohzaki *et al.*, 2008).

Há ainda outro papel da enzima aldose redutase, sua contribuição para o estresse oxidativo. Isso ocorre pelo aumento de níveis basais de espécies reativas de oxigênio o que caracteriza a situação de estresse, pelo fato de haver um desequilíbrio, entre a produção dessas

espécies reativas de oxigênio e sua desintoxicação pelo próprio organismo, a fim de proteger células e tecidos contra essas reações (Burn, 2007; Kohzaki *et al.*, 2008).

Pesquisas experimentais revelaram redução dos níveis de pelo menos duas enzimas antioxidante durante o DM (glutaciona peroxidase e superóxido desmutase). Acredita-se que a própria glicose possa contribuir para o agravamento desta condição, visto que em situações de estresse oxidativo, a glicose passa a ser uma fonte de espécies reativas de oxigênio (Kohzaki *et al.*, 2008).

1.3 Neurofisiologia visual humana

A retina é um tecido de aproximadamente 0.5 mm de espessura e 42 mm de diâmetro, localiza-se à frente do epitélio pigmentado que delinea a parte posterior do olho (Webvision: the organization of retina and visual system, 2007). Em animais vertebrados é composta por três classes funcionais de neurônios: os fotorreceptores (bastonetes e cones), os interneurônios (células bipolares, células horizontais e células amácrinas) e as células de Muller (Kandel *et al.*, 2003).

Sua estrutura composta de tecido neural em formato laminar e se dispõem em oito camadas (Figura 1), que possui como função a conversão da luz em códigos neurais transmitidos para o cérebro. Este processo é iniciado por dois tipos principais de fotorreceptores: bastonetes e cones, que se distinguem em vários aspectos, tais como: morfologia; tipo de fopigmento; a distribuição na retina; e padrão de ligações sinápticas (Burn 2007, Dias *et al.*, 2010).

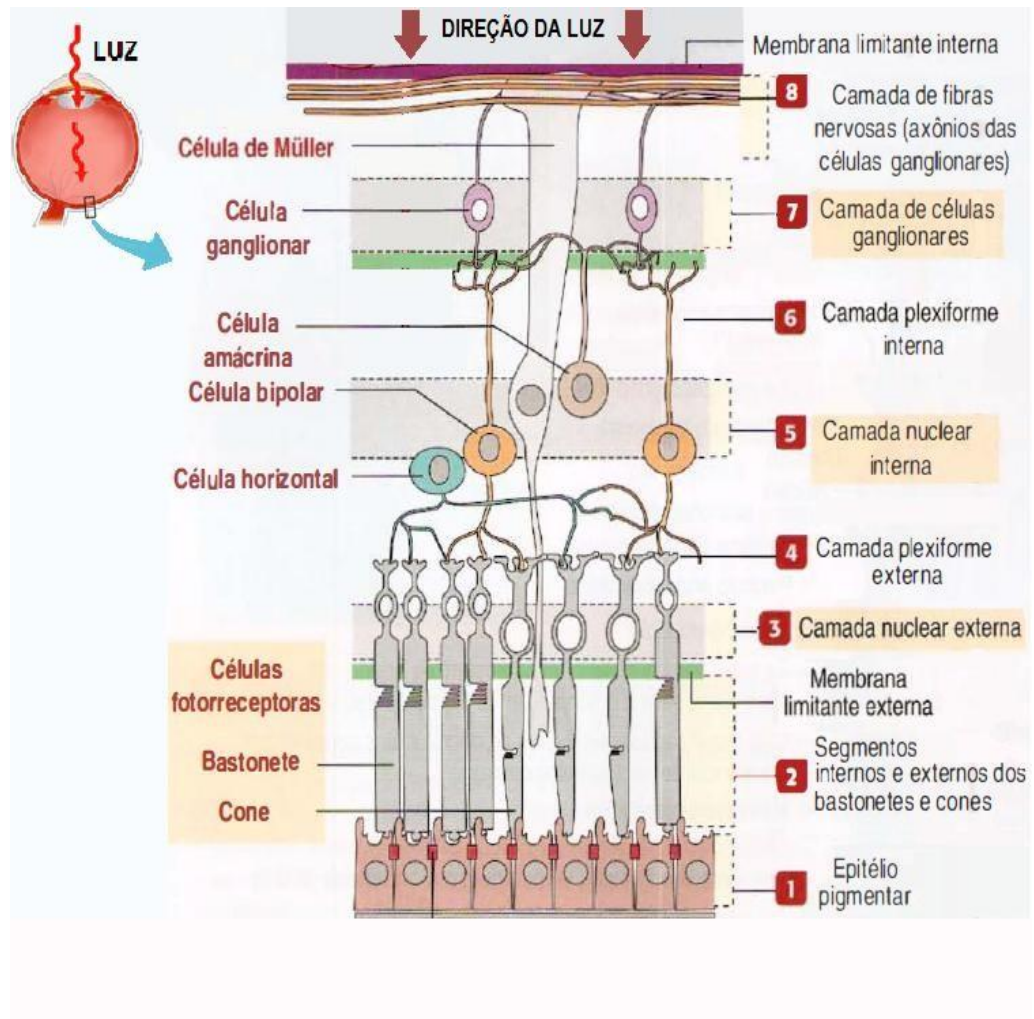


Figura 1. Ilustração das camadas da retina (adaptado de Kierszenbaum,2008).

Os cones são células que iniciam o processo de percepção de cores nos animais. São células de baixa sensibilidade à luz, ou seja, necessitam de alta intensidade luminosa para serem ativadas, o que caracteriza a visão fotópica. Os cones desempenham funções em quase todas as tarefas visuais e permitem melhor resolução da imagem (Kandel *et al.*, 2003).

Os bastonetes são células finas, alongadas e formadas por duas porções diferentes, são os principais receptores para baixos níveis de luz, visão escotópica (Parisi & Uccioli, 2001 & Burn, 2007). Estes bastonetes são altamente sensíveis à luz, e, portanto, funcionam melhor com baixas intensidades de luz, como as que estão presentes nos crepúsculos ou à noite, quando a maioria dos estímulos é de baixa intensidade, e eles medeiam a visão acromática

(Purves *et al.*, 2001; Kandel *et al.*, 2003).

Os fotorreceptores distinguem-se também por duas características: o comprimento de onda máximo da radiação a que os seus fotopigmentos são sensíveis (espectro de sensibilidade) e o intervalo de intensidade luminosa detectado pelos fotorreceptores (sensibilidade á luz). Chama-se “pico de absorção máxima” ao comprimento de onda de determinada radiação para o qual a absorção por um fotopigmento é máxima. (Slatter, 2008).

A visão normal depende de uma comunicação intacta entre as células neuronais, glias, microgliais, vasculares e o epitélio pigmentado da retina. As funções fundamentais da retina são: captar fótons; converter a energia luminosa em energia eletroquímica; integrar os potenciais de ação resultantes e transmitidos para áreas mais centrais do córtex, onde eles são decifrados e interpretados em imagens reconhecíveis (Serrabassa *et al.*, 2008 & Burn 2007).

1.4 Fisiologia visual de roedores

A retina humana apresenta similaridades quando comparada a de roedores. Quanto a porcentagem de células fotorreceptoras em ratos, animal noturno, encontramos aproximadamente 99% de bastonetes e o restante cones. Em animais diurnos como primatas a porcentagem de bastonetes é de 90%. Essa maior porcentagem de bastonetes em ratos advém da necessidade de sobrevivência em seu habitat composto de pouca luminosidade (Szel & Rolich, 2000).

A respeito da diferença entre a retina de roedores e humanos, conforme Andrade, Pinto & Oliveira (2002), descrevem a utilização de ratos como modelos biológicos é eficaz, tendo em vista a ampla utilização desses animais no meio científico, e pela aproximação da fisiologia visual, principalmente os humanos. É também possível o fácil manejo e reprodução, sendo esse modelo de grande auxílio para compreensão da fisiopatologia de algumas doenças.

1.5 Eletretinograma de campo total (FF ERG)

O déficit da visão de cores, como uma alteração produzida pela retinopatia é um dos primeiros danos visuais causados nessa patologia (Ewing *et al.*, 1998; Fletcher *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2000; Rodriguez & Galietero *et al.*, 2005). Este déficit pode ser avaliado através de testes que permitam a descrição das alterações eletrofisiológicas utilizando como a eficiente técnica a eletrorretinografia.

No que tange a neurofisiologia visual, Luu (2008) propôs em seu estudo que os neurônios e a vasculatura da retina estão envolvidos na patogenia da retinopatia diabética, comprometendo principalmente estruturas neurais nas camadas médias e internas da retina, sendo o eletroretinograma uma ferramenta de grande auxílio na avaliação dessas alterações, antes da retinopatia diabética ser detectada clinicamente.

O eletroretinograma de campo total (ERG) é método de eletrofuncional e laboratorial, que permite avaliar a função das células nervosas de toda retina. É um registro elétrico destas células em resposta a um estímulo luminoso (flash), que gera estimulação simultânea em todo o campo visual sua mensuração. Esse teste é utilizado como uma ferramenta no mundo inteiro para avaliar o estado da retina em doenças oculares, em pacientes humanos e em animais de laboratório utilizados como modelos experimentais de doenças da retina (Holmgren, 1980; Parisi & Uccioli, 2001; Marmor *et al.*, 2009).

Estudos utilizando o ERG para avaliação da retinopatia diabética em roedores já foram realizados. Guimarães (2014), avaliou as alterações eletrofisiológicas por meio do eletroretinograma de campo total no desenvolvimento de diabetes e hipotireoidismo induzidos em ratos *Wistar*.

Em estudo realizado por Negrito e colaboradores (2008), propôs avaliar os potenciais oscilatórios escotópicos através do eletroretinograma na retinopatia hipertensiva em humanos, afim de descrever as alterações decorrentes da retinopatia e seu acometimento

precoce a vascularização do tecido retiniano.

Sacai e colaboradores (2003), buscaram avaliar por meio do ERG 385 pacientes em hospital universitário com patologias visuais, obtiveram como resultado frequente e significativa indicação de registro eletrofisiológico visual como melhor ferramenta diagnóstica.

Li e colaboradores (2002), utilizaram medida de *ff* ERG e da expressão de GFAP (*glial fibrillary protein*) pelas células de Muller para avaliar a função retiniana e acompanhar o desenvolvimento da RD em ratos diabetes induzida. Duas semanas após o início do diabetes, já tornou-se possível observar alterações no ERG. Os autores concluem que, pouco tempo após o início da DM, já ocorre comprometimento funcional da retina.

1.6 Açaí e sua capacidade antioxidante

Estudos clínicos em modelos animais, baseados em estudo celular e análises bioquímicas demonstram que as plantas contêm uma grande quantidade de nutrientes e fitoquímicos biologicamente ativos que promovem numerosos benefícios a saúde, onde o açaí vem recebendo destaque na comunidade científica (Joseph *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2009; Sun 2010).

Quanto aos danos teciduais na retina ocasionado pela retinopatia diabética, a busca de mecanismos de combate, atenuação e prevenção são incentivados, utilizando propriedades fitoquímicas afim de minimizar os efeitos deletérios decorrentes do estresse oxidativo nas células (Kohzaki *et al.*, 2008).

A *Euterpe Oleracea* (açaí) é uma palmeira de origem amazônica, seu fruto é comercializado como um suco chamado "açaí" amplamente consumida por habitantes da região amazônica e com alto valor econômico no Brasil. (Shauss *et al.*, 2006 ; Poulouse *et*

al., 2012 ; Da Silva *et al.*, 2014; Bonomo *et al.*, 2014).

Atualmente considerado um alimento funcional, cuja polpa apresenta elevado valor energético por conter alto teor de lipídeos como Ômega 6 e 9, além de carboidratos, fibras, vitamina E, proteínas, minerais (Mn, Fe, Zn, Cu, Cr) e grande quantidade de antioxidantes, particularmente contra o superóxido e radicais peroxil (Portinho *et al.*, 2012).

Estudos bioquímicos revelam que o açaí possui numerosos tipos de fitoquímicos, particularmente, antocianinas, proantocianinas e outros flavonoides (Shauss *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2008). A polpa do açaí possui vários antioxidantes, mas as antocianinas, proantocianidina e outros flavonóides são os fitoquímicos predominantes. Além desses pigmentos, o açaí também possui em sua composição compostos fenólicos, dentre outros, que também são componentes antioxidantes (Santos *et al.*, 2008; Associação Americana dietética, 2009; Sun *et al.*, 2010).

Os componentes antioxidantes têm a capacidade de inibir ou diminuir os processos de oxidação gerada pelos radicais livres no organismo. Quando os sistemas biológicos apresentam capacidade insuficiente em neutralizar a produção excessiva de radicais livres, ocorre o estresse oxidativo, o qual pode contribuir para o surgimento de doenças e envelhecimento celular precoce (Favacho *et al.*, 2011; Portino, 2012).

Kang e colaboradores 2010, revelaram em seu estudo que tinha como objetivo avaliar as substâncias responsáveis pelo efeito antioxidante do fruto *Euterpe Oleracea* o qual identificou 7 tipos de flavanoídes e observaram, que dos 7 analisados pelo menos 3 tinham a capacidade de produzir esse efeito dentro das células.

Em estudo recente, realizado por Brasil *et al.*, (2016), na Universidade Federal do Pará, que objetivou-se avaliar o efeito de dieta enriquecida com açaí na prevenção de alterações retinianas provocadas pela exposição ao Metil mercúrio em modelo animal, obteve-

se como resultado que, a utilização da polpa da fruta na dieta, permite prevenir estas alterações funcionais na retina dos animais que foram avaliadas através o eletroretinograma (ERG).

O efeito de protetor da *Euterpe Oleracea* em célula do sistema nervoso central e seu papel como antioxidante ou anti-inflamatório já são descritos em estudos anteriores (Da Silva *et al.*, 2014; Poulouse *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2016; Shauss *et al.*, 2006). Entretanto ainda não é claro o como a dieta enriquecida com a polpa da fruta pode promover um efeito protetor no tecido retiniano, com alterações provenientes da retinopatia diabética como o déficit de visão de cores, sensibilidade ao contraste etc.. ou se há alguma consequência funcional e ou até mesmo de atenuação ou reversão das alterações produzidas pela patologia.

Além da avaliação eletrofisiológica a avaliação do comportamento visual através de testes psicofísicos são comumente utilizados, pois estes refletem na interação do sujeito com o meio em vive e quantificam a resposta dada pelo sujeito frente a um estímulo físico pré-estabelecido e esta resposta, por sua vez, depende do processamento e integração das informações recebidas pelo sujeito. Os diferentes tipos de testes usados na avaliação psicofísica da visão de cores podem ser separados em três classes: testes de pranchas, testes de ordenamento e anomaloscópio (Dain, 2004; Hovis & Muniz 2013).

1.7 Avaliação psicofísica para visão de Cores

Atualmente, muitos testes de discriminação de cores podem ser aplicados através do uso de testes computacionais, como o *Cambridge Colour Test* (CCT). O CCT é um teste psicofísico, computadorizado, utilizado para a discriminação de cores e desenvolvido por Mollon-Reffin (Mollon & Regan, 2000, Mollon & Reffin, 1989).

Consiste na apresentação, a intervalos regulares de tempo, de estímulos coloridos na forma do C de Landolt em um monitor de vídeo. O estímulo é formado por círculos de

tamanhos diferentes, distribuídos aleatoriamente e com luminância variável. Esta configuração, ruído de luminância mais ruído de forma, impede que o brilho e o contorno sejam usados como dicas para a tarefa de discriminação. A posição do estímulo muda a cada nova apresentação (C com abertura à direita, esquerda, para cima ou para baixo), Figura 2.

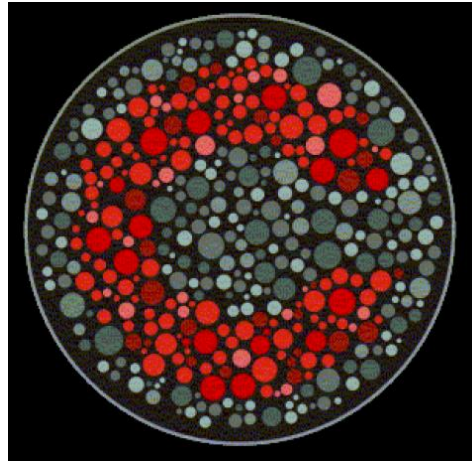


Figura 2. Exemplo do estímulo apresentado originalmente pelo *Cambridge ColourTest* para discriminação cromática.

O sujeito submetido ao CCT informa suas respostas obedecendo a um método de escolha forçada com quatro alternativas (*4 Alternative Forced Choice, 4AFC*), já que a cada apresentação, a figura tem quatro posições possíveis e o sujeito deve escolher uma delas.

Mancuso, Neitz, e Neitz (2006) propuseram modificações do *Cambridge Colour Test* para aplicá-lo em modelos animais, onde os estímulos eram semelhantes às placas de um teste pseudoisocromático tradicional, porém, eram apresentados em um monitor tradicional de Tubos de Raios Catódicos (CRT-).

Na nova versão, a mudança mais expressiva é o alvo, que deixa de ser o C de *Landolt*, e passa a ser apresentado como um “quadrado”. O trabalho de Goulart, Bonci, Galvão, Silveira, e Ventura (2013) avaliou a eficiência da versão adaptada do teste de Mollon-Reffin para a investigação comportamental da visão de cores em macacos-prego (*Sapajus spp.*), e

observou que a diferença de fenótipos observados confirma a eficácia do teste de *Mollon-Reffin* como uma ferramenta útil para avaliar a discriminação de cores em primatas não humanos, podendo ser abrangente para o uso de outros animais não primatas, tornando-se de grande valia sua utilização neste estudo.

Para roedores, essa proposta de avaliação é recente, trata-se de uma tentativa em adaptar os testes para condições que permitam que os roedores adquiram comportamento de discriminação de cores com a utilização dessa ferramenta.

1.7.1 Avaliação comportamental

Métodos que utilizam a análise do comportamento para avaliar lesões de estruturas neurais surgiram no século XIX com Flourens e Rolando (Skinner, 1953) e atualmente ainda são utilizadas, pois possibilitam estabelecer relações entre cérebro e comportamento (Sabino, 2011).

Os objetivos essenciais da análise do comportamento denotam a identificação, a descrição e a programação de contingências ambientais que estabelecem e controlam a probabilidade de classes de comportamento (Catania, 1999).

As pesquisas realizadas com tais objetivos permitiram a construção de um conjunto de dados e procedimentos com sólida fundamentação experimental e conceitual (Catania, 1999), cuja importância abrange não apenas as questões investigadas pela Psicologia, mas também questões de outras disciplinas e área do conhecimento científico. Um exemplo disso encontra-se na metodologia e nos conceitos derivados da análise do comportamento que têm fornecido linhas de base comportamentais adequadas para as investigações dos mecanismos biológicos subjacentes ao comportamento (Sabino, 2011).

Especificamente, os procedimentos de discriminação têm sido úteis para a análise da aprendizagem discriminativa em sujeitos infra-humanos submetidos a lesões do sistema

nervoso central. Assim, tarefas discriminativas têm sido amplamente utilizadas em experimentos que realizam estudos sobre a aprendizagem operante em organismos não-intactos e, em sua maioria, objetivam um maior entendimento da região do organismo que foi afetada por alguma patologia e os efeitos sobre o desempenho dos sujeitos sobre uma determinada tarefa (Bitterman, 1965; Cerutti, Cintra, Diáz-Cintra & Ferrari, 1997; Cerutti & Ferrari, 1995; Lam, Sethi & Low, 2005; Lashley, 1929; Mazarakis *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2003; Stettner e Schultz, 1967).

1.7.2 Comportamento operante - discriminação

Um processo comportamental de aprendizagem básico dos organismos é a discriminação operante, processo no qual respostas específicas ocorrem apenas na presença de estímulos específicos.

O comportamento operante é aquele que produz mudanças no ambiente e que é afetado por elas. Assim, quando inserimos uma nova variável (o contexto), passamos a falar sobre os comportamentos *operantes discriminados*, ou seja, aqueles que se emitidos em um determinado contexto, produzirão consequências reforçadoras (Moreira & Borges, 2007).

Dessa forma, os estímulos consequentes onde apresentação aumenta a probabilidade de um comportamento, recebem o nome de reforço. Todavia, aqueles estímulos que são apresentados antes do comportamento e controlam sua ocorrência são considerados estímulos discriminativos “S^d”. Ao inserimos os Estímulos Discriminativos nas contingências temos a unidade básica de análise do comportamento operante, Skinner denominou esse processo de Tríplice Contingência. A Tríplice contingência pode ser explicada pela seguinte Expressão “S^d – R – C” ou “S^Δ – R – C” (Moreira & Borges, 2007).

Os estímulos discriminativos S^{dS} sinalizam que uma dada resposta será reforçada caso ocorra um determinado comportamento, ficando claro que o S^d tem uma relação íntima com as consequências. Os S^{Δs} sinalizam que uma resposta não será reforçada, ou seja,

sinalizam a indisponibilidade do reforço ou sua extinção (Moreira & Borges, 2007).

Segundo Reese (1975, p.28) "... a discriminação se estabelece pelo fato de um comportamento ser reforçado na presença de uma situação que seja estimuladora e não ser na presença de outra situação estimuladora", processo é nomeado de reforçamento diferencial.

A partir desses princípios afirmamos que o controle discriminativo de estímulos foi estabelecido quando um determinado comportamento tem alta probabilidade de ocorrer na presença do S^d e baixa probabilidade de ocorrer na presença do S^A . Aprendemos a discriminar os estímulos, pois passamos por um processo chamado treino discriminativo, no qual consiste em reforçar um comportamento na presença de um S^d e não disponibilizamos reforço presença de um S^A . É importante frisar que embora o S^d assuma uma importância na tríplice contingência, ele não tem a função de eliciar uma determinada resposta, apenas fornecer um determinado contexto, aumentando a probabilidade de que as respostas ocorram.

2.Objetivo

Objetivo geral

Verificar o possível efeito neuroprotetor do açaí (*Euterpe Oleracea*) nas alterações eletrofisiológicas e comportamentais do sistema visual causadas pela retinopatia diabética em modelo animal com diabetes induzida.

Objetivos específicos

- Caracterizar alterações funcionais na retina provocada pela retinopatia diabética, através de eletrorretinograma de campo total (ERG);
- Avaliar o possível efeito neuroprotetor do açaí na função da retina dos animais com diabetes induzida através da análise das amplitudes da onda B;

- Comparar as possíveis mudanças na retina dos animais induzidos ao diabetes com ingestão de alimentação enriquecida com açaí comparado aos animais do grupo controle que receberão alimentação padrão através da mensuração das seguintes respostas: escotópica de bastonetes, escotópica mista (bastonetes e cones), fotópica de através do ERG;
- Reproduzir um modelo de diabetes tipo I em rato *Wistar* albino utilizando como droga diabetogênica aloxana;
- Comparar o desempenho de ratos controles e diabéticos em tarefas de discriminação;
- Comparar o desempenho comportamental dos ratos diabéticos e controlesantes e após a indução diabetogênica;

3. Método

3.1 Ambiente

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Neurofisiologia Dr. Eduardo Oswaldo Cruz, situado no Instituto de Ciências Biológicas – ICB da Universidade Federal do Pará-UFPA bem como o laboratório de condicionamento operante do Núcleo de Pesquisa e teoria do comportamento (NTPC I). A sala de procedimentos era ampla, com iluminação artificial, bem como natural, durante o dia. Nesta, constavam os equipamentos necessários (fotoestimulador, amplificador, computadores, caixa de condicionamento operante) para a realização de todos os experimentos propostos nesse estudo.

3.2 Sujeitos

O presente estudo se desenvolveu em concordância com as normas preconizadas pelo

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e teve início a partir do da liberação do protocolo (CEPAE-UFGA: BIO 033.2015), que está de acordo com os princípios éticos em testes em animais adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará.

Foram utilizados aproximadamente 18 Ratos albinos da espécie *Wistar* machos, experimentalmente ingênuos, com aproximadamente 3 meses de idade (12 semanas, 90 dias de vida), com peso de 120 a 200g, obtidos no biotério central do ICB/ UFGA, mantidos em gaiolas – viveiro de polipropileno, medindo 41 x 34 x 17 cm, distribuídos em três animais por gaiola. Estes ficaram alojados no biotério do Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento NTPC I/ UFGA, com ciclo 12 h claro – escuro à 25 °C, com água e ração balanceada Purina Labina *ad libitum*. As gaiolas eram forradas com maravalha autoclavada. Para realização de avaliações e testes, os animais foram transportados para sala de experimentos em recipiente adequado (caixas viveiro) e desenvolvidos ao biotério após a finalização de cada sessão de testes.

3.2.1 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos igualmente em 3 grupos com 6 animais cada: sendo 1 (um) grupo controle com ração padrão; 1(um) grupo diabético com ração padrão; 1 (um) grupo com diabetes induzida que recebeu a ração enriquecida com açai pós indução da patologia.

Após o procedimento de indução diabética dos animais, alguns foram a óbito e outros excluídos pois, não desenvolveram quadro de diabetes como proposto no protocolo. A tabela 1 mostra a distribuição dos grupos com aos animais que chegaram ao término da pesquisa.

Tabela 1

Grupos experimentais

Grupo	Experimento	Quantidade
Grupo controle (GC)	Alimentação padrão + ERG + treino discriminativo	6 animais
Grupo diabético com Açaí (DMA)	Alimentação enriquecida pós indução diabetogênica, + ERG + treino discriminativo	2 animais
Grupo diabético sem Açaí (DM)	Alimentação padrão + aloxana + ERG + treino discriminativo	6 animais

3.3 Modelo de diabetes experimental

Optou-se por esse método do modelo de indução de diabetes nos animais estudados, devido a larga utilização da Aloxana como agente diabetogênico (Gomes, 2010). Essa droga possui citotoxicidade específica para as células pancreáticas, levando a morte das células e o quadro clínico equivalente ao diabetes tipo I (Lenzen, 2008).

O efeito da droga após sua administração no organismo se dá pela liberação maciça de insulina, presumidamente em virtude do influxo de cálcio ao citosol das células do pâncreas, na resposta das ilhotas pancreáticas à glicose, devido à necrose destas células (Szkudel Ski, 2001).

Muitos fatores interferem na ação da aloxana, entre eles, a dose e via de administração da droga. Por isso, foi escolhida a via intraperitoneal, por apresentar segurança na manutenção da vida do animal bem como uma dose de 150mg/kg a 2%, diluída em cloreto

de sódio 0,9%, para evitar a necessidade de uma segunda dose.

Para a indução do “Diabetes Mellitus” experimental, foi necessário que os animais permanecessem 24 horas em jejum. A glicemia pré-indução foi aferida por processo automatizado com o uso de medidor glicêmico (OnCall® Plus, marca ACON Laboratories, Inc).

Em seguida, os animais alatoriamente selecionados a compor o grupo diabético receberam aloxanamonohidratada com uma dose de 150mg/ kg a 2%, diluída em cloreto de sódio 0,9% (administração endovenosa). Logo após foram recolocados nas gaiolas com alimento.

Após a aplicação da droga, a taxa glicêmica foi verificada após sete dias em todos animais induzidos, utilizando como ponto de corte os animais que estiverem com registros sanguíneos de glicemia acima de 200mg/dl evidenciando quadro de diabetes. Os animais que apresentarem valores abaixo do referido anteriormente foram excluídos do estudo.

3.3.1 Aferição da glicemia

Após sete dias da aplicação da droga, foi aferido o índice glicêmico em jejum de 12 horas, por processo automatizado com o uso de medidor glicêmico (OnCall® Plus, marca ACON Laboratories, Inc). Para isso foi realizado uma leve incisão (corte) na cauda do animal para coleta do sangue e posteriormente realizou-se a dosagem glicêmica. Após a constatação que o animal desenvolveu o diabetes, deu-se início aos testes.

3.4 Dieta dos animais

3.4.1 Ração enriquecida com açaí

A polpa do açaí (*Euterpe Oleracea*) pasteurizado foi obtida em um estabelecimento comercial denominado Kidelícia, localizado no município de Belém do Pará, fiscalizado e autorizado para funcionamento pela vigilância sanitária para comercialização da polpa.

A dieta foi elaborada de acordo com Souza et al. (2010) e Brasil *et al.*, (2014). A ração enriquecida com polpa de açaí foi confeccionada manualmente, de acordo com a *Association of Official Analytical Chemistry* (1989) e AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993) através da mistura da ração convencional (farelo) (PURINA, Company Cia, São Paulo) e a polpa da fruta (10:1 g/ g) com água potável. A mistura foi comprimida em pelotas e foi secada em uma estufa de 60° por 3 horas (Figura 3).



Figura 3. Foto da ração enriquecida com açaí. Fonte: acervo próprio

Em seguida, foram mantidas sob refrigeração em sacos hermeticamente fechados (0 a 4°C), protegidas da luz até o momento da utilização (ficando armazenadas por até 3 dias). A ração comercial que foi utilizada para alimentar os grupos controles foi a mesma utilizada para preparar a ração enriquecida com o açaí (*Euterpe oleracea*). Cada animal recebeu a mesma quantidade de ração, 100 g ao dia, que equivale a 1 pelota por dia.

A dieta com ração enriquecida com foi iniciada após a confirmação do quadro de diabetes nos grupos DM e DM + açaí, porém, todos os grupos receberam alimentação convencional em um período igual de 30 dias antes do início de todos os procedimentos

experimentais.

3.5 Monitoramento do peso corporal

A massa corporal dos animais foi verificada através da balança ELGIN DP15 no início e final dos experimentos em todos os grupos experimentais.

3.6 Avaliação eletrofisiológica através do eletroretinograma de campo total

3.6.1 *Instrumentos para realização do ERG*

Para avaliação, armazenamento e coleta de dados do eletroretinograma de campo total, foram utilizados os seguintes instrumentos: O programa Labview 3.0 (*National instruments Austin, TX*) foi utilizado para medição de sinais físicos ou elétricos de uma ampla variedade de sensores.

O programa Signal 3.0 foi responsável pela mensuração e produção dos gráficos do eletroretinograma, com a descrição das ondas produzidas a partir dos estímulos para posterior interpretação.

Para realização ERG foram utilizados os seguintes equipamentos: A estimulação visual foi gerada por um foto estimulador com tubo de xenônio, modelo PS33-PLUS, marca Grass Technologies. Serão utilizados filtros de densidade neutra para redução da intensidade luminosa, sendo um ND400 e outro a sobreposição de dois filtros, ND4 e ND6.

Os eletrodos utilizados foram: eletrodo de prata tipo disco (A) de 6 mm, modelo F-E6SHC-12, eletrodo de aço tipo agulha (B), modelo F-E3-48; ambos da marca Grass Technologies e eletrodo de filamento de prata (C) dobrado em forma circular em tamanho proporcional ao olho do animal, Figura 4.

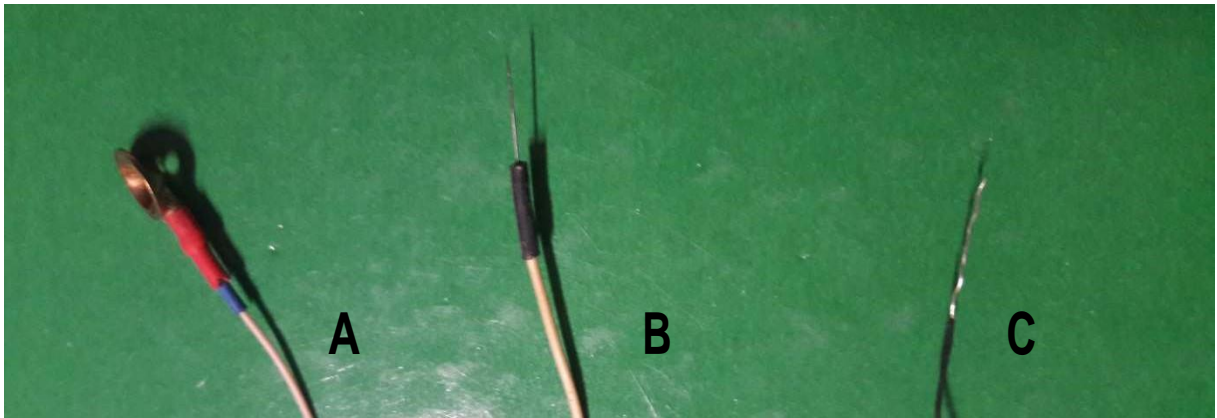


Figura 4: Eletrodos utilizados no eletrorretinograma. A) Eletrodo terra; B) eletrodo ativo e C) Eletrodo referência. Fonte: arquivo pessoal

Os registros eletrofisiológicos obtidos foram enviados a um amplificador diferencial AC com alta impedância de entrada (Grass Technolgies, modelo P511), com filtragem passa-alta de 0,3 Hz e passa-baixa de 300 Hz (figura 5). As respostas elétricas da retina foram amplificadas em 200.000 vezes, com uma frequência de amostragem de 1 KHz por uma placa de aquisição de dados A/D (*National Instruments*, Austin, TX). O programa de aquisição de dados utilizado foi o Labview 3.0 (*National Instruments*, Austin, TX).

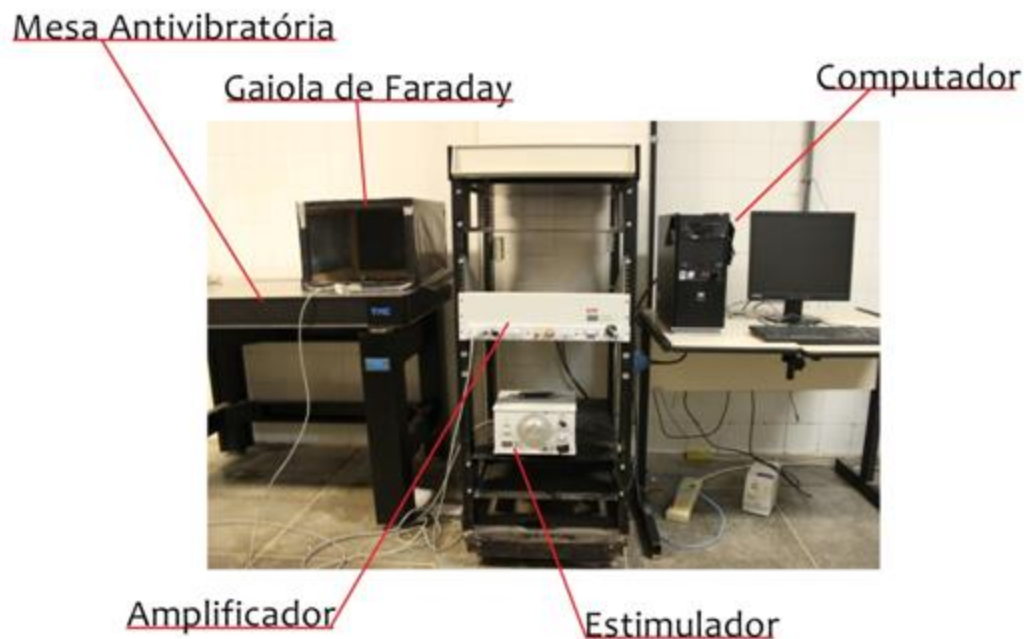


Figura 5. Disposição dos equipamentos para realização dos registros eletrorretinográficos

3.7 Procedimentos de coleta de dados

Após a seleção dos animais e distribuição aleatório nos 3 grupos, 2 grupos experimentais (diabetes com açaí e diabetes sem açaí). foram submetidos ao processo de indução ao diabetes para posterior avaliação funcional da retina após o estabelecimento da doença (diabetes tipo I), bem como os outros grupo (controle sem açaí) onde todos os grupos primeiramente foram submetidos aos procedimento de aprendizagem comportamental até a fase de operante indiscriminado e posteriormente realizaram do exame de eletroretinograma (ERG) para finalizarem testes comportamentais.

As avaliações eletrofisiológicas foram realizadas no trigésimo segundo dia de dieta. Os testes eletrofisiológicos (ERG) tiveram início 4 (quatro) semanas após a indução do diabetes, o que corresponde a um mês de indução de diabetes nos sujeitos.

Após a realização da avaliação eletrofisiológica, os testes psicofísicos concluídos.

3.7.1 Realização do Eletroretinograma

O registro eletrorretinográfico foi realizado nos animais 30 dias após a confirmação do quadro de diabetes tipo I. Os animais serão adaptados ao escuro por no mínimo 14 horas (overnight) na sala de experimentação, com o objetivos de manter seus bastonetes (células da retina) em seu limiar de ativação, para a realização dos testes de resposta mista (bastonetes e cones).

3.7.1.1 Preparação do animal para o ensaio eletrofisiológico

Os registros eletrofisiológicos da retina foram realizados após anestésias os animais, com injeção intraperitoneal de solução de hidrocloreto de cetamina (Cetamina 10% (50mg/kg) e hidrocloreto de xilazina (5 mg/kg) 2%, numa proporção de 3:1. Após observar a ausência de

reflexos, o animal foi posicionado na gaiola de Faraday e colocado para anestesia monocular: cloridrato de proximetacaína 0,5 % (anestesia local). Os mesmo também teve a sua pupila previamente dilatada com uma gota de colírio tropicamida 1% (MydriacylAlcon R) para que o estímulo luminoso alcance maior área possível do tecido retiniano. Estes procedimentos foram realizados pelo experimentador, previamente treinado para a execução deste.

Após a dilatação da pupila, os eletrodos foram colocados com o auxílio de uma lupa (3,5x) da seguinte forma: O eletrodo terra (com formato de uma cúpula) foi posicionado, instalando-o na região interna do lóbulo da orelha do animal, após escarificação (esfoliação) local para retirada de pelos presentes, resíduos de fluidos corporais, diminuindo possíveis interferências. Para tal procedimento, foi utilizada pasta escarificadora (NuPrep, D.O.WEAVER). Para fixação do eletrodo terra, foi utilizada uma pasta eletrolítica (Tem 20 D.O. Weaver), que auxilia na captação dos sinais elétricos.

O eletrodo referência, em forma de agulha, foi posicionado na região subpalpebral, no qual sua extremidade será posicionada adjacente à córnea. Finalmente, o eletrodo registro, constituído com uma adaptação com DTL (Downson, Trick e Litzkow), que consiste num fio de prata, que posicionado sobre a retina é capaz de captar os sinais provenientes da mesma. Os animais serão posicionados na gaiola de Faraday (46,5 x 40,3x30 cm) a 30 cm do fotoestimulador.

Todos esses procedimentos foram realizados no escuro com auxílio de uma luz vermelha de baixa intensidade. Após os registros das respostas, os animais permaneceram adaptados no claro por 10 minutos, para anular a participação dos bastonetes, com intuito de obter-se respostas isoladas dos cones. Os estímulos luminosos serão apresentados por fotoestimulador posicionado a 30 cm do olho do animal.

3.8 Protocolo para realização do ERG

O protocolo a ser utilizado é uma ampliação do protocolo proposto pela *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision* (ISCEV), baseada em pesquisas anteriores

realizadas com animais que também se utilizaram deste protocolo (Oliveira, 2016; Bastos, 2017).

Foram apresentados estímulos de luz branca com diferentes intensidades, duração e intervalo interestímulos de acordo com o tipo de resposta que se pretende obter.

Para cada tipo de resposta serão emitidos 6 a 12 pulsos, exceto na resposta de Flicker, na qual foram emitidos pulsos intermitentes durante 6 segundos. A resposta final foi a média obtida das respostas de cada pulso.

A aplicação do protocolo a partir do início dos registros, teve duração de 20 a 30 minutos. O registro foi realizado pelos próprios pesquisadores responsáveis pela pesquisa, após devido treinamento e conhecimento prévio do protocolo.

Os registros foram obtidos na seguinte ordem:

- Estímulo com flash único com duração de 10 μ s por um período de um minuto;
- Em seguida, será avaliada a resposta fotópica, realizando-se a adaptação do animal por aproximadamente 10 minutos, de acordo com as seguintes etapas:
- Estímulo com flash único com duração de 10 μ s por um período de um minuto;
- Estímulo com flash único com duração de 10 μ s por um período de um minuto, com a utilização de filtros de luz (vermelho, verde e azul).

3.7.2 Mensuração dos componentes do ERG

As respostas obtidas a partir de cada pulso de luz foram promedidas e medidas com auxílio do programa Signal 3.0, como descrito a seguir: (1) A amplitude da onda – a é medida entre a linha de base e o pico máximo da onda-a. (2) A amplitude da onda-b é medida entre o pico máximo da onda-a e o pico máximo da onda-b. (3) O tempo implícito de cada onda é medido entre o início do estímulo (*flash*) e o pico máximo da onda. Figura 6.



Figura 6. Padronização das medidas das respostas do eletrorretinograma

3.8 Avaliação comportamental

Avaliação Psicofísica da Visão de Cores em Camundongos

A investigação comportamental da visão de cores dos camundongos foi uma tentativa de treino realizada através de estímulos pseudoisocromáticos, semelhantes aos utilizados na adaptação do *Cambridge Colour Test* para o uso sem instruções em crianças e em primatas não humanos (Goulart *et al.*, 2008; Goulart *et al.* 2013). A preparação para os testes psicofísicos consistiu em um treino discriminativo em uma câmara de condicionamento operante, no qual a resposta de pressão à barra (RPB) foi reforçada diferencialmente na presença de contraste cromático entre alvo e fundo em estímulos pseudoisocromáticos, como apresentado na figura a seguir.

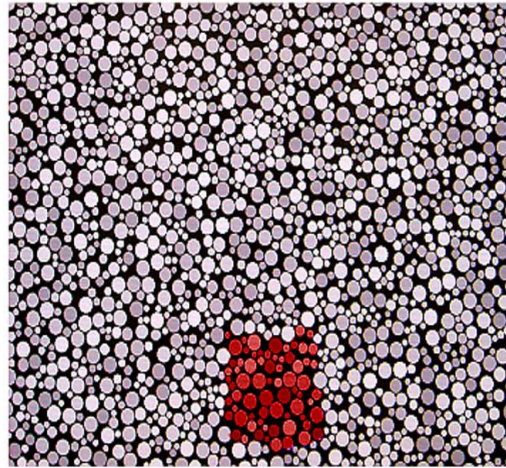


Figura 7. Exemplo de disposição de estímulo cromático adotado. A área de aproximadamente quadrado com um matiz diferente do fundo é o alvo. (Goulart *et al.*, 2013).

Os matizes de treino foram escolhidos de forma a não coincidir com as linhas de confusão previstas para ratos. Os testes consistirão na introdução de tentativas de teste, totalizando 3 novos matizes, incluindo matizes localizados em potenciais linhas de confusão dicromata.

3.8.1 Equipamentos para testes psicofísicos

Foi utilizada uma caixa de condicionamento operante INSIGHT Cs 0199, à qual estavam acopladas barras e luzes e um bebedouro (todos do mesmo fabricante da caixa). A caixa foi associada a um monitor *Catodic Ray Tube* (CRT) Diamond Pro 2070SB (*Mitsubishi*, Cypress, USA) no qual foram apresentados os estímulos cromáticos.

Na caixa de condicionamento operante porta de acrílico frontal, nós acoplamos o monitor CRT a uma distância de 10 cm, que foi usado para apresentar os estímulos gerados através do *Cambridge Color Test*.

Para o controle dos parâmetros experimentais, utilizamos um software inspirado no *Cambridge Colour Test*, em linguagem *Object Pascal* (*Borland's Delphi 7.0*). A geração e controle dos arranjos de estímulo foi feita por meio do sistema ViSaGe (*Cambridge Research Systems*, Rochester, UK), que permite resolução de cor de 16-bits e controle de luminância.

As tentativas foram apresentadas através do monitor CRT de. O monitor foi mantido calibrado por meio do fotômetro Color CAL (*Minolta*, Osaka, Japão) usando a rotina padrão de calibração da biblioteca VSG Desktop (versão 8).

3.8.2 Estímulos

O arranjo de estímulos consistiu de um mosaico de círculos de tamanho e luminância variáveis, apresentados sobre um fundo preto. A luminância de cada círculo variou de forma randômica de tentativa para tentativa, podendo assumir qualquer um de seus valores entre 8cd/m^2 e 18cd/m^2 .

Um subconjunto de círculos definido com um matiz diferente dos demais círculos constituiu um alvo. A luminância média do alvo e do fundo foi constante, de maneira que a única variável relevante para a resolução da tarefa foi a diferença cromática entre ambos.

A cromaticidade do alvo foi modificada de uma tentativa para outra. A principal modificação em relação ao teste original foi o alvo. Originalmente o alvo consiste de um C de Landolt onde este foi alterado para uma área colorida definida com a forma aproximada de um quadrado de lado 5cm (Figura 3). O alvo apareceu em uma posição central fixa na tela, sem variações em relação ao fundo, de uma tentativa para a outra.

Os matizes do alvo e do fundo foram definidos em termos de coordenadas do diagrama de cromaticidade da *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE) 1976 $u'v'$. Os limites da gama de cores (gamut) do monitor serão $u'=0,416$; $v'=0,522$ (fósforo vermelho); $u'=0,117$; $v'=0,559$ (fósforo verde); $u'=0,159$; $v'=0,177$ (fósforo azul). O arranjo mudava dinamicamente de uma tentativa para outra, com o matiz do alvo variando tanto entre os eixos de variação cromática (que correspondem à linha que liga as coordenadas do fundo às coordenadas do alvo) quanto dentro deles, com a excursão ao longo de cada eixo variando entre 0,110 e 0,002 unidades $u'v'$.

3.9 Preparo do animal para avaliação psicofísica

Para a avaliação do desempenho visual dos camundongos através do teste psicofísico, os animais dos grupos diabéticos e os controles foram privados da ingestão de água por 24 horas antecedentes aos procedimentos. Sendo este o fator de reforçamento.

As sessões experimentais ocorriam diariamente, com aproximadamente 23 horas de intervalo entre elas, com exceção dos finais de semana e dias nos quais fatores extraordinários inviabilizaram a realização das mesmas.

3.9.1 Procedimento geral

Como protocolo de preparação para os testes, os animais foram submetidos à seguinte sequência de procedimentos: treino ao bebedouro e modelagem da resposta de pressão à barra (Fase 1), treino discriminativo em CRF com estímulo isocromático (fase 2),

As fases seguintes que seriam: Treino discriminativo em esquema variável com estímulo isocromático (3) e fase 4 - treino com múltiplos matizes. Porém durante a fase 2, os animais por muitas sessões realizadas não apresentaram diferenciação comportamental para discriminação dos estímulos, não sendo possível atingir critério para a fase seguinte.

A partir de então, optou-se em realizar o treino discriminativo claro/ escuro por tratar-se de uma tarefa comportamental menos complexa em função do tempo restante de pesquisa e que também permitiria avaliar o desempenho comportamental dos sujeitos e sua comparação entre grupos.

Fase 1 – Treino ao bebedouro

Essa fase consistiu em uma sessão nas quais ocorria a liberação de gotas de água (feita, exclusivamente nessa fase, de forma manual) em intervalo variável. Ao início do treino, a água era sempre liberada quando o animal estava muito próximo ao bebedouro, e a distância foi sendo aumentada, até que gotas fossem liberadas com o animal de frente para a parede oposta ao bebedouro. As sessões eram encerradas quando o sujeito não bebia uma gota de água quando a mesma era liberada, passados 10 minutos de sessão ou quando se antigisse o

tempo de 20 minutos de sessão. A fase foi encerrada quando o sujeito, estando virado para a parede oposta, se voltava rapidamente (em intervalo menor que 4 segundos no tempo de reação) ao bebedouro quando a gota era liberada por quatro vezes consecutivas.

Modelagem de Pressão à Barra e Reforçamento Contínuo (CRF)

Os sujeitos passaram por um treino preliminar que consistiu de uma sessão de modelagem, na qual a resposta de pressionar a barra (RPB) foi reforçada diferencialmente por aproximações sucessivas com a liberação de uma gotícula de água para o animal. Instalada a resposta, os sujeitos foram expostos a duas sessões de CRF, com 60 reforçadores cada, objetivando fortalecer a resposta anteriormente modelada.

Recuperação de CRF

Esse momento foi de retomada aos treinos de aprendizagem após a indução do animais ao diabetes e alimentação com dieta enriquecida com açaí para os grupo de intervenção. Consistiu em uma única sessão de treino de RPB, com duração de 20 minutos.

Fase 2 Treino discriminativo

2.1 Treino do Responderem CRF com estímulo pseudoisocromático

Nessa segunda fase, foi realizado mais de 10 sessões de 15 minutos. Cada sessão com 30 componentes, destes, 20 com reforço e 10 extinção. A apresentação do estímulo cromático diante da caixa de comportamento operante pelo monitor permaneceu por 30 segundos e pode se repetir na sequência por mais 30 segundos. Os estímulos variavam em comprimento de onda na cor azul e verde. Após inúmeras sessões os animais não atingiram critério de 90% ou índice menor.

Fase 2.2 Treino discriminativo da resposta de pressão à barra em CRF claro/ escuro

O treino discriminativo foi conduzido com a introdução de períodos de luz 100%,

nos quais a resposta de pressão à barra (acima do bebedouro) era conseqüenciada com água, e períodos sem luz, nos quais a resposta não era seguida de água. A sessão composta por 30 componentes dos quais 20 compreendiam reforço no S⁺ e 10 componentes S⁻, ambos com duração de 30s cada (ANEXO II). Garantiu-se que o sujeito ficasse 3 segundos sem responder antes do início da iluminação da caixa, uma vez que respostas nos últimos 3 segundos de ausência de luz adicionavam 3 segundos ao período (DRO 3s). Esta fase teve duração que variava entre 2 a 3 sessões de acordo com o desempenho do animal para atingir do ID de 90% em cada sessão.

Esta fase se encerrou quando o sujeito atingiu duas sessões consecutivas com Índice Discriminativo (ID = razão entre a taxa de respostas em S⁺ e a taxa total de respostas) maior ou igual a 90% em cada sessão.

Os componentes que compuseram cada sessão foram aleatoriamente dispostos na folha de registro (ANEXO I). 3.3 – Treino discriminativo claro/ escuro com esquema variável – Razão Variável 2

Nesta fase, a quantidade de respostas necessárias para acessar água na presença da luz foi gradualmente aumentada. Foram realizadas sessões com VR2. A sessão foi composta por 30 componentes com 30 segundos cada (anexo III), sendo 20 S⁺ aleatoriamente e de forma proporcional distribuídos em R1, R2, e 10 componentes de S⁻. O tempo despendido em cada sessão foi de 15 minutos. O critério adotado para encerrar esta fase foram duas sessões consecutivas com ID de 90%.

As sessões experimentais serão realizadas diariamente, cinco dias por semana, sendo que cada sessão de coleta de dados terá duração máxima de 20 minutos.

4. Análise estatística dos dados

Para o processamento dos dados obtidos a partir dos registros eletrofisiológicos, utilizou-se o programa Signal 3.0 (Cambridge Eletronic Designer), que avaliou e mensurou as

ondas a e b produzidas em respostas das células retinianas ao estímulo luminoso. Em seguida, os dados foram calculados pelo programa Calc (Apache OpenOfficeCalc).

Para a análise no nível populacional, os dados obtidos passarão por análise estatística, na qual foi utilizado o programa GraphPad 5, onde foram atribuídos a média e desvio padrão dos grupos experimentais. Posteriormente, os resultados foram comparados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA), um critério seguido pelo pós-teste de Tukey. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey* para a comparação entre grupos experimentais ou um grupo em diferentes condições através do programa Graphpad prism 5.0. Foi aceito como significativo valores de $p < 0,05$.

Para os testes comportamentais, a análise envolveu a comparação entre os grupos controle e experimental e a comparação dos desempenhos individuais dos animais do grupo experimental antes e depois da indução diabetogênica (sujeito como seu próprio controle), levando em consideração os seguintes parâmetros: taxa de respostas no treino operante em CRF; em recuperação de CRF, Taxa de respostas em cada componente do treino discriminativo em CRF e em esquema intermitente VR2; número de sessões necessárias até os critérios de aprendizagem. As comparações foram realizadas utilizando teste ANOVA ou por inspeção visual, quando apropriado.

Resultados

Parâmetros clínicos para a caracterização do modelo experimental

A partir da análise do peso corporal e glicemia, podemos delinear a caracterização de cada grupo experimental que constituiu este estudo.

Avaliação da massa corporal

O peso corporal dos animais foi mensurado anteriormente a realização dos testes de eletrorretinograma e comportamentais e ao final dos experimentos, estão expressos na tabela 2. A comparação entre os grupos não evidenciou diferença significativa.

Tabela 2

Média da massa corporal dos grupos do estudo

	Controle	DM+ açai	DM
Peso (g)	223,5 ± 18,56	241,5 ± 0,707	216 ± 30,97

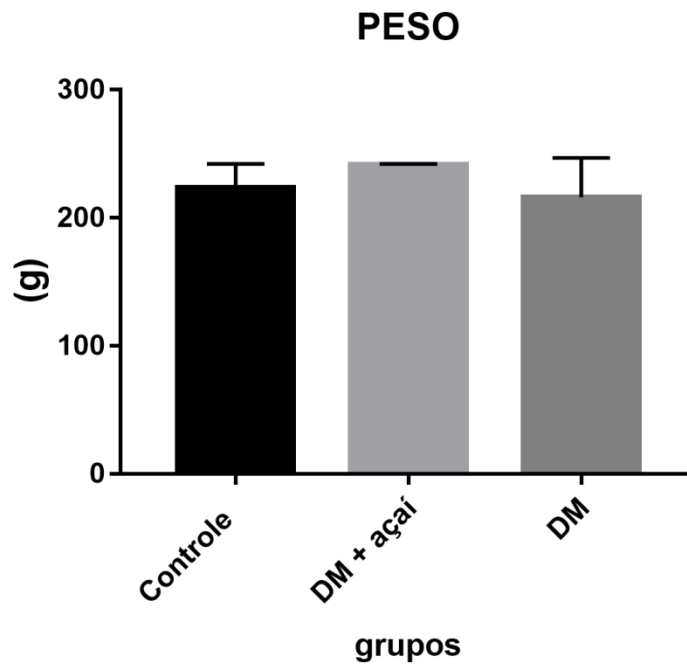


Figura 8

Peso dos animais de cada grupo antes dos experimentos. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, * $< 0,05$. Não foram apresentadas diferenças significativas.

Monitoramento da glicemia dos grupos de estudo

A avaliação da glicemia de jejum foi realizada em todos os grupos, sete dias após a

indução da droga aloxana nos animais dos grupos experimentais. Os resultados demonstram que os grupos experimentais apresentaram glicemia superior ao grupo controle, com diferenças significativas na comparação controle e DM + açai ($p = 0,001$) e controle com DM ($p = 0,001$).

Tabela 3

Monitoramento de glicemia pós indução diabetogênica nos grupos experimentais

	Controle	DM+ açai	DM
Glicemia	86,17 ± 6,3 mg/dl	550 ± 70,71 mg/dl	418,4 ± 118 mg/dl

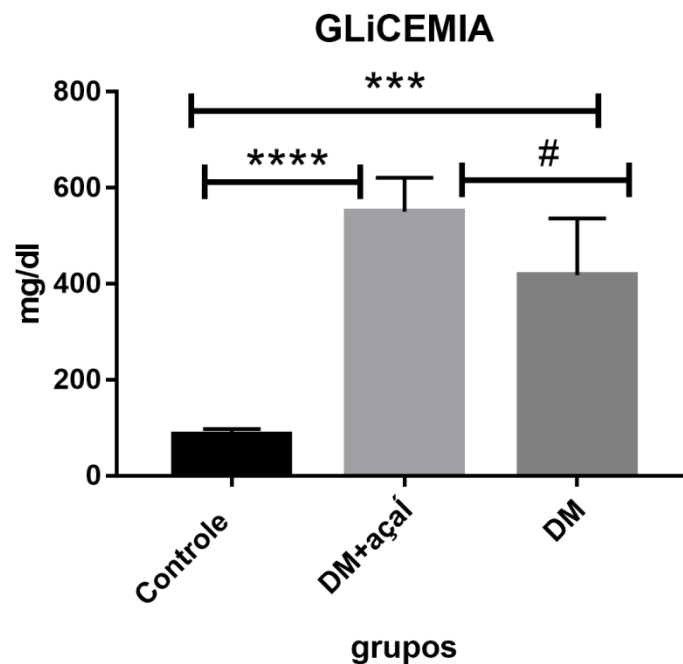


Figura 9

Medida de glicemia dos grupos pós indução diabetogênica nos experimentos. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $< 0,05$. Foram apresentadas diferenças significativas em relação ao grupo controle e os grupos diabéticos.

Estes dados caracterizam a amostra em relação ao peso como homogênea. Quanto a glicemia, os resultados evidenciam que os animais pertencentes aos grupos diabéticos apresentavam média de glicemia de acordo com a exigida neste estudo ($< 200\text{mg/dl}$) para que fossem considerados diabéticos.

Respostas do eletrorretinograma

As respostas eletrofisiológicas dos grupos experimentais foram calculadas, seguindo os padrões da Sociedade Internacional Eletrofisiologia Clínica da Visão (ISCEV-*International Society of Electrophysiology of Vision*). Os dados a seguir serão descritos em tabelas e gráficos contendo média por grupo e desvio padrão da amplitude onda b.

Resposta escotópica de bastonete

Em relação a *onda b*, foram encontradas diferenças significativas nas comparações em todos os grupos em relação a amplitude, o grupo DM açai e controle ($p = 0,0126$), grupo controle e DM ($p = 0,0149$) e DM+ açai com controle ($p < 0,0001$). Foi possível observar nessa resposta a diminuição na amplitude da onda b na comparação entre os grupos controle e diabéticos. O grupo diabético tratado com açai apresentou amplitude maior que os demais, com diferença significativa ($* < 0.05$).

Tabela 4

Médias e desvio padrão das amplitudes da onda b em resposta escotópica de bastonetes

Controle	DM + açai	DM
178,10 \pm 51,6	423,30 \pm 22,10	140,40 \pm 15,51

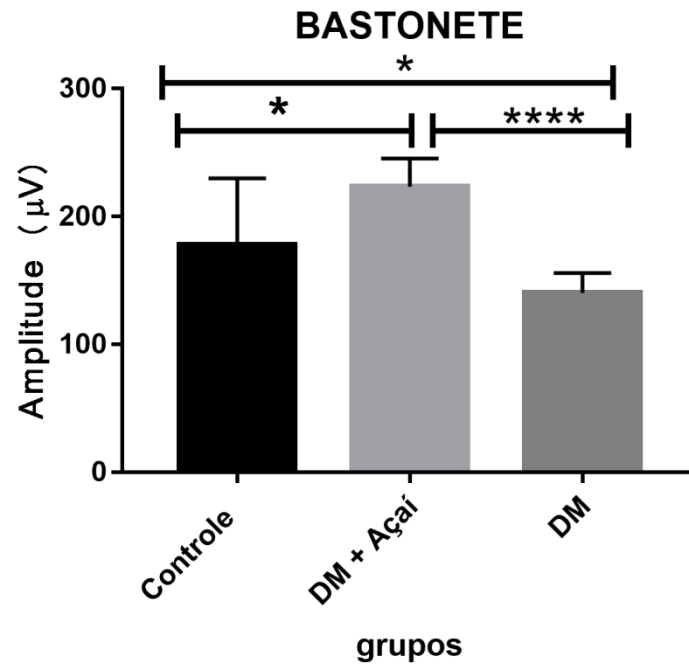


Figura 10

Amplitude da onda-b em resposta escotópica de bastonete. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey* * <0.05 , ** $0,01$, *** $0,001$, e para **** $<0,00001$.

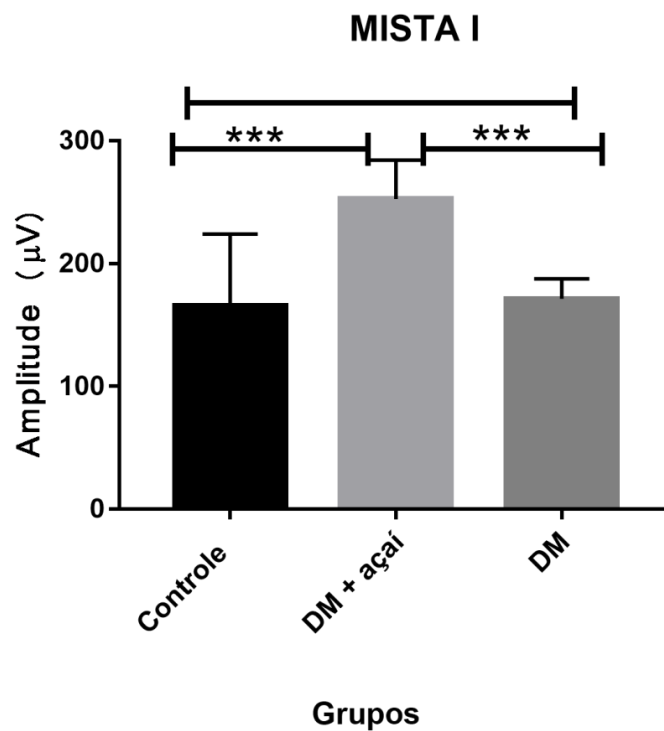
Resposta escotópica (Mista 1)

Os dados a seguir são referentes a amplitude da onda b da resposta mista 1 (cones e bastonetes), na qual é utilizado estímulo com intensidade de $0,378 \text{ cd.s/m}^2$. Em relação a amplitude, houve diferenças significativas entre os grupos controle e DM açai ($p = 0,0001$) e DM açai e DM ($p = 0,0003$). Não houve diferença significativa entre os grupos controle e DM ($p = 0,9453$). Foi possível observar nessa resposta, a diminuição na amplitude da ondab nos grupos controle e diabetes, o grupo diabético tratado com açai apresentou amplitude maior que os demais, com diferença significativa ($* < 0.05$), demonstrados na figura 11.

Tabela 5

Médias e desvio padrão das amplitudes de onda B em resposta escotópica mista 1

Controle	DM+ Açai	DM
165,80 ± 58,38	252,50 ± 31,77	171,5 ± 16,24

**Figura 11**

Amplitude da onda-b em resposta escotópicas mista 1 dos animais de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via com pós teste de *Tukey*, * < 0.05 , ** $0,01$, *** $0,001$.

Resposta escotópica (Mista 2)

Os dados a seguir são referentes a amplitude da onda b da resposta mista 2 (cones e

bastonetes), na qual é utilizado estímulo com intensidade de 0,215 cd.s/m². Em relação a amplitude, houveram diferenças estatisticamente significativas relacionadas aos grupos controle e DM ($p = 0,0007$), DM+ açai e DM ($p = 0,0392$). Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o DM + açai ($p = 0,5427$), apresentadas na figura 12.

Tabela 6

Médias e desvio padrão das amplitudes de onda b em resposta escotópica mista 2

Controle	DM + Açai	DM
211,80 ± 55,23	158,20 ± 29,39	92,80 ± 5,85

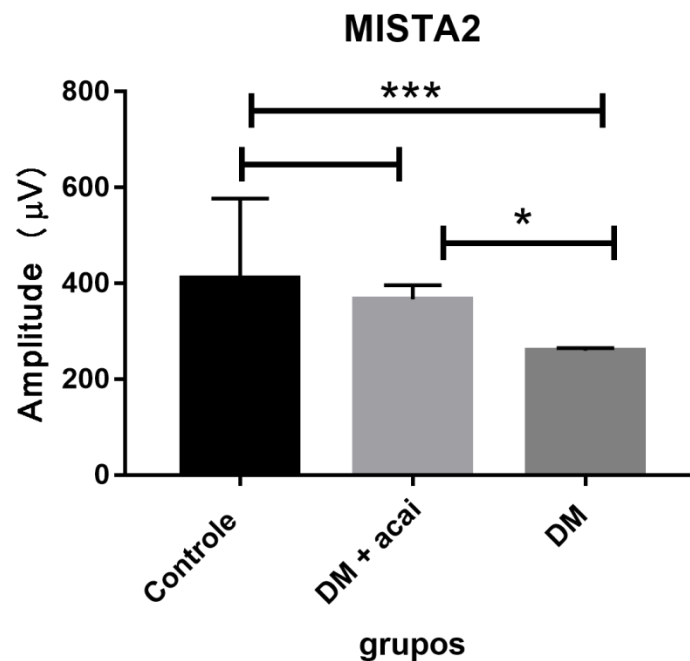


Figura 12

Amplitude da onda-b em resposta escotópica mista 2. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, * $< 0,05$, ** $0,01$, *** $0,001$.

Resposta Fotópicas

Em relação as respostas de cones S dos animais de teste, não foram encontradas diferenças significativas na amplitude entre os grupos controle e DM açai ($p = 0,0699$), controle e DM ($p = 0,1708$), e DM açai e DM ($p = 0,9096$). Houve diminuição na amplitude da onda b nos grupos experimentais mas não significativa (figura13).

Tabela 7

Médias e desvio padrão das amplitudes de onda b em resposta fotópica de cones S

Controle	DM + açai	DM
194,9 ± 90,95	130,2 0 ± 22,13	143 ± 59,22

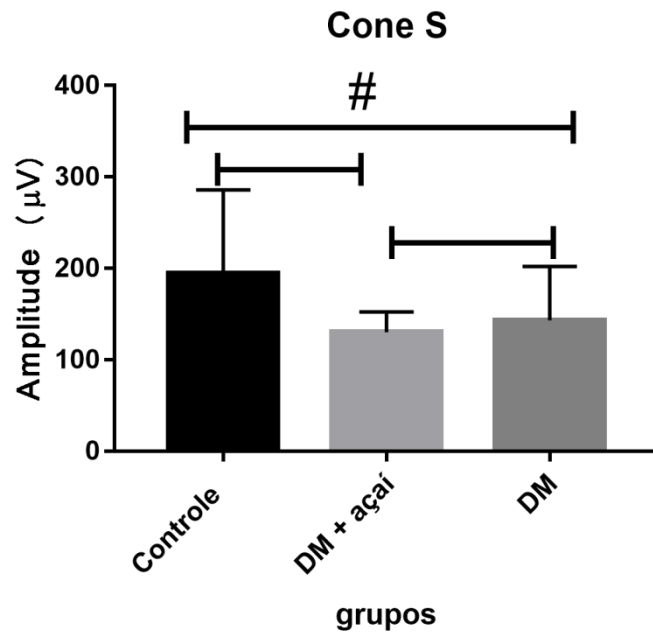


Figura 13

Amplitude da onda b em resposta fotópica de cones dos animais de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$.

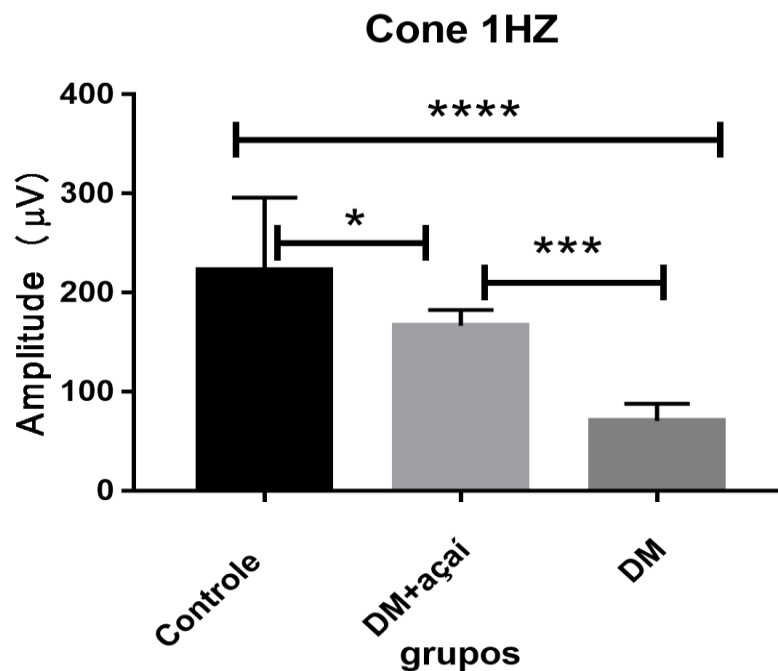
Resposta fotópica de cones 1Hz

Em relação as respostas de amplitude da onda b de cones 1Hz, foram encontradas diferenças significativas na comparação entre grupos, controle e DM + açai ($p = 0,0255$), controle e DM ($p = <0,0001$) e DM + açai e DM ($p = 0,0004$). Houve diminuição da amplitude nos grupos experimentais, entretanto o grupo DM+ açai mostrou amplitude superior em comparação ao DM, com diferença significativa, $p < 0,05$ (figura 14).

Tabela 8

Médias e desvio padrão amplitude da onda b em resposta fotópica de cones 1 Hz

Controle	DM + açai	DM
222,7 0 ± 53,16	166,6 0± 15,77	70,53 ± 17,39

**Figura14**

Amplitude da onda-b em resposta fotópica de cones 1 Hz aos animais de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0,05$.

Resposta fotópica de cones M

Em relação as respostas de amplitude da onda b de cones M, foram encontradas diferenças significativas na comparação entre grupos, controle e DM + açaí ($p = 0,0095$), controle e DM ($p = <0,0001$) e DM + açaí e DM ($p = 0,0156$). Houve diminuição da amplitude nos grupos experimentais, entretanto o grupo DM+ açaí mostrou amplitude superior em comparação ao DM, com diferença significativa, $p < 0,05$.

Tabela 9

Médias e desvio padrão das amplitudes de onda b em resposta fotópica de cones M

Controle	DM + açaí	DM
194,90 ± 44,14	124,5 0 ± 15,77	52,25 ± 11,38

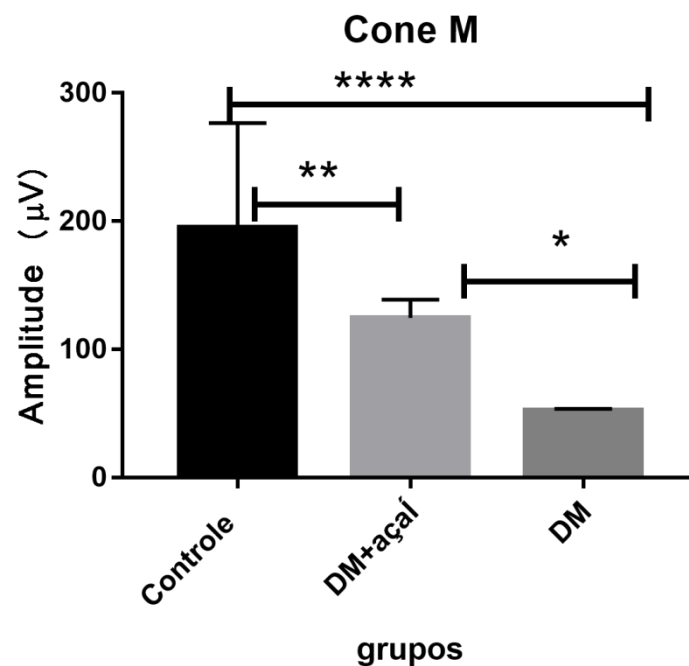


Figura 15

Amplitude da onda-a em resposta fotópicas de cone dos animais de teste. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via com pós-teste de *Tukey*, $* < 0.05$.

Padrão dos registros dos animais do estudo

Nos padrões de registros, foram detectados principalmente redução da amplitude nos grupos experimento, sendo encontrado tanto em respostas escotópicas e fotópicas. Tal diferença pode ser atribuída ao percurso da retinopatia diabética nos grupos de animais estudados. Os registros de respostas encontram-se exemplificados nas figuras 15, 16, 17, 18, 19 e 20 a seguir:

Resposta de bastonetes

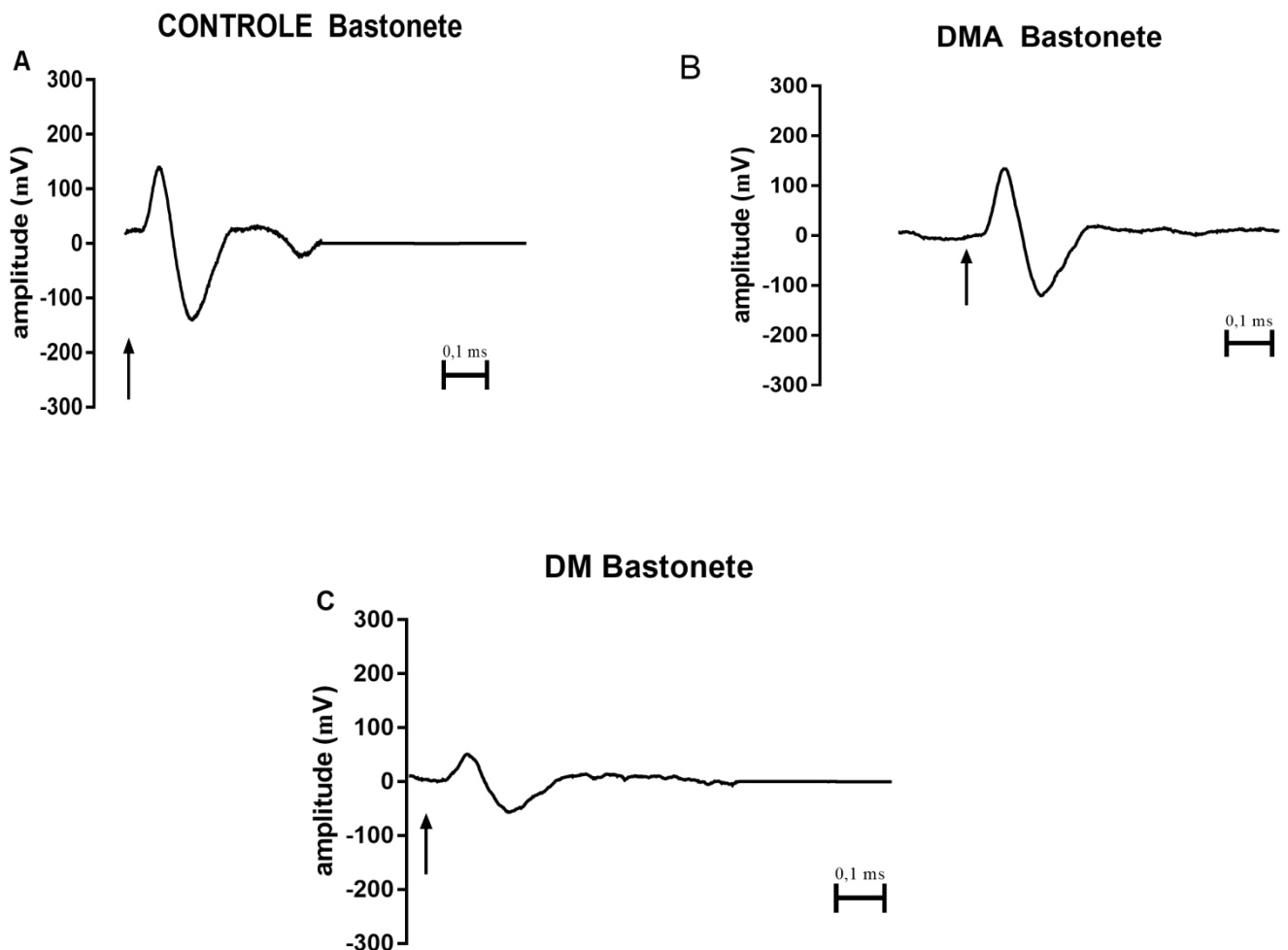


Figura 16

Registro da resposta escotópica de bastonete dos animais de teste. Em A resposta do grupo controle; em B resposta do grupo DM + açúcar e C resposta do grupo diabetes. A seta indica o início do estímulo.

Resposta escotópica mista

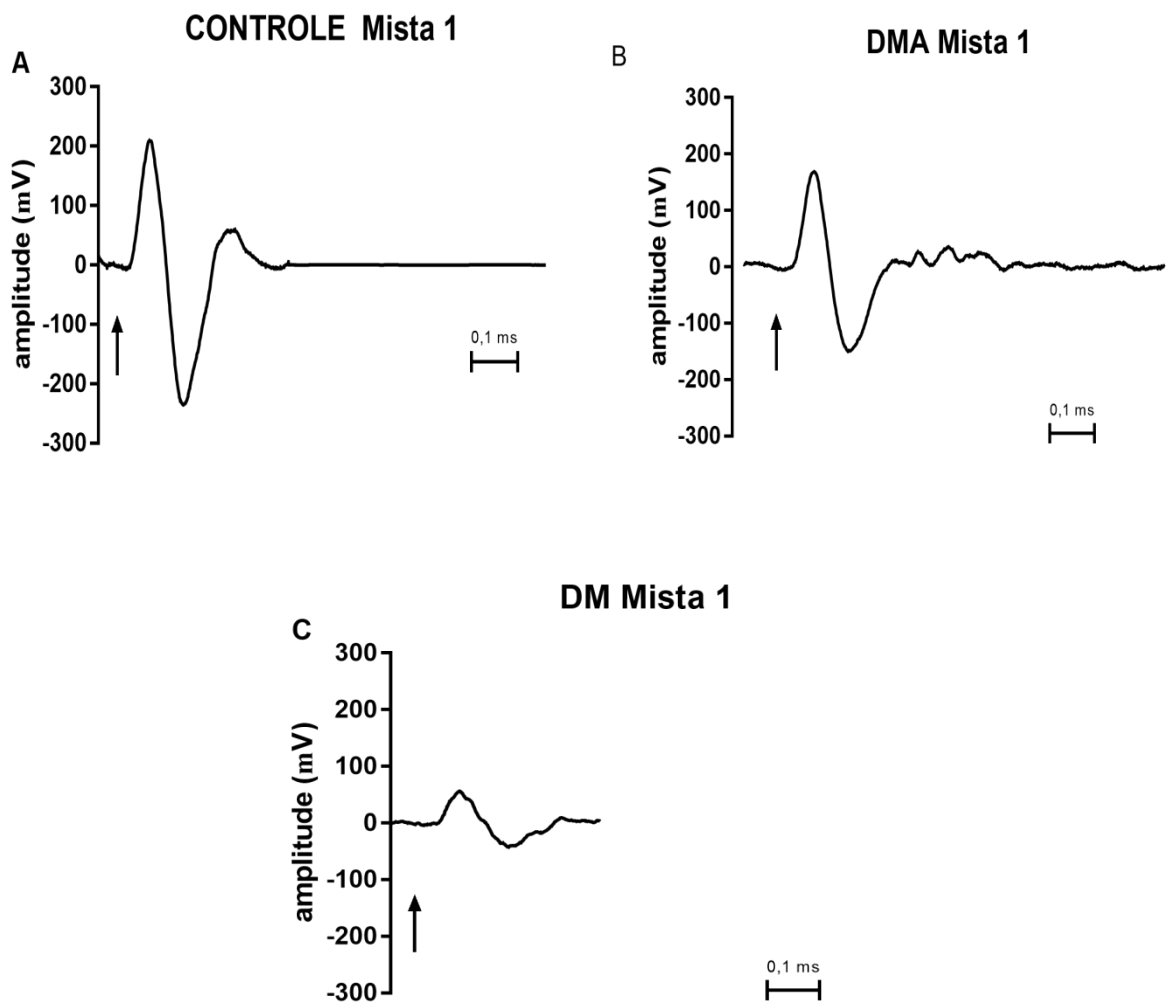


Figura17

Registro da resposta escotópica de mista 1 dos animais de teste. Em A resposta do grupo controle; em B resposta do grupo DM + açai e C resposta do grupo diabetes. A seta indica o início do estímulo.

Resposta escotópica mista 2

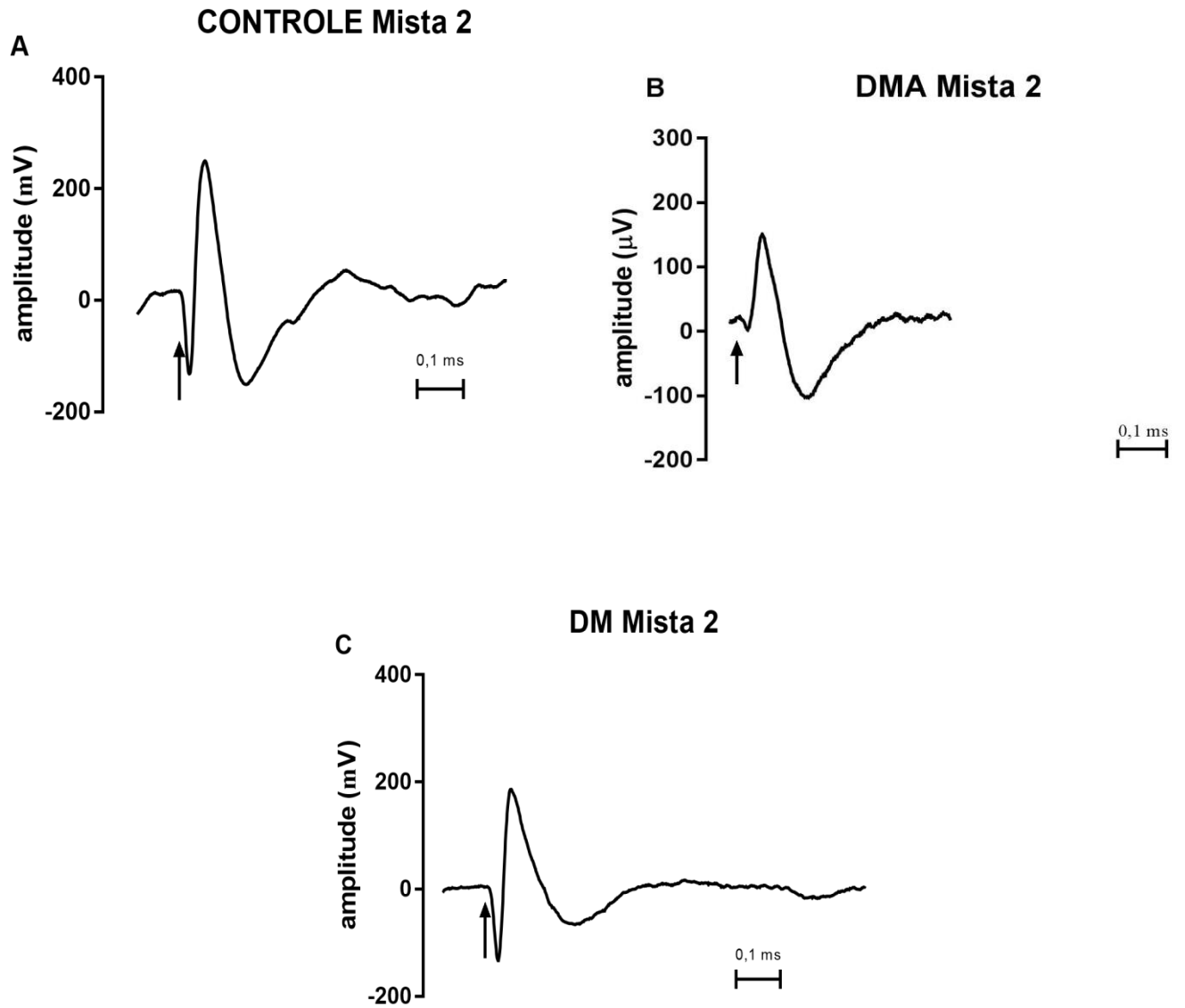
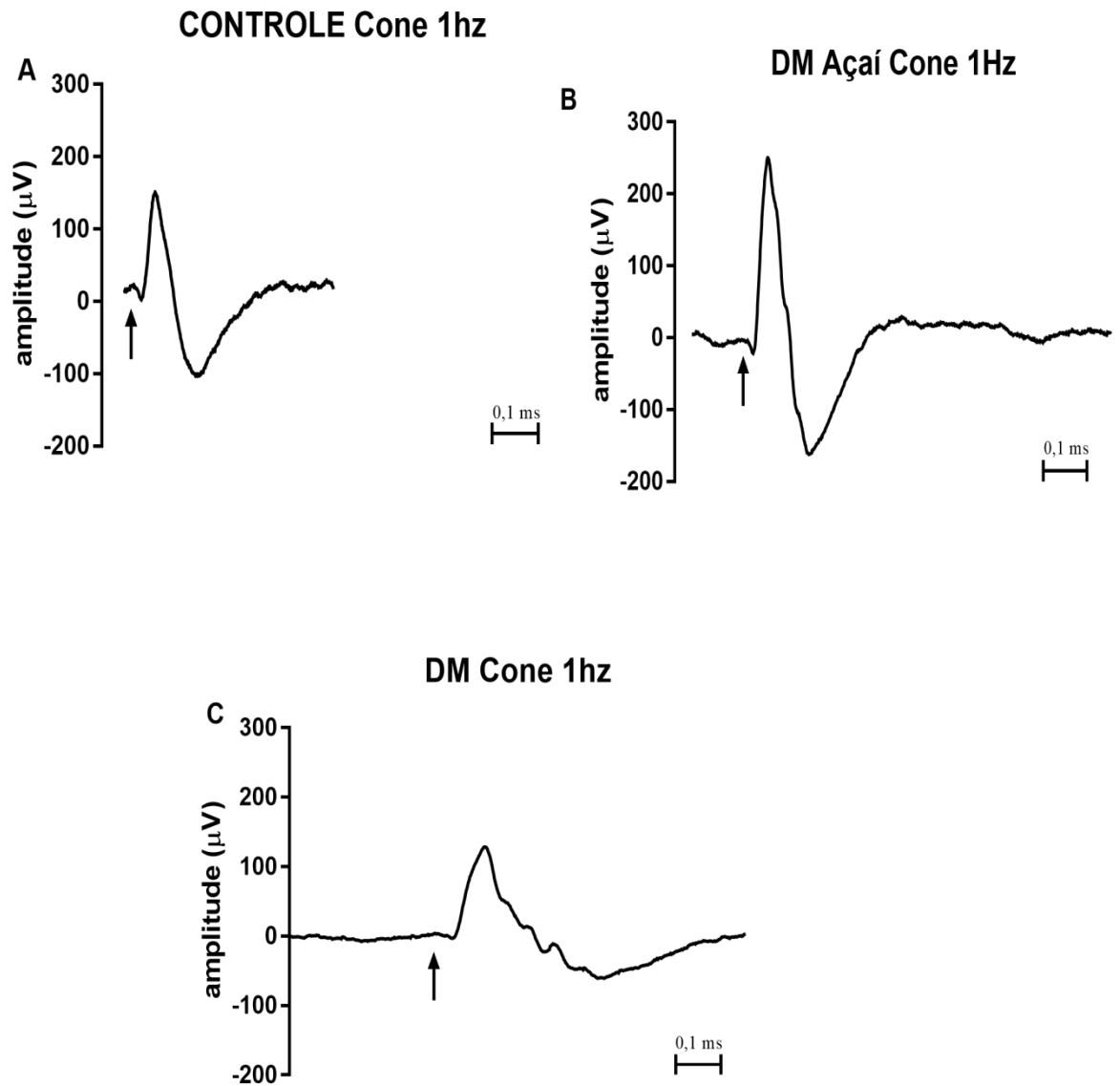
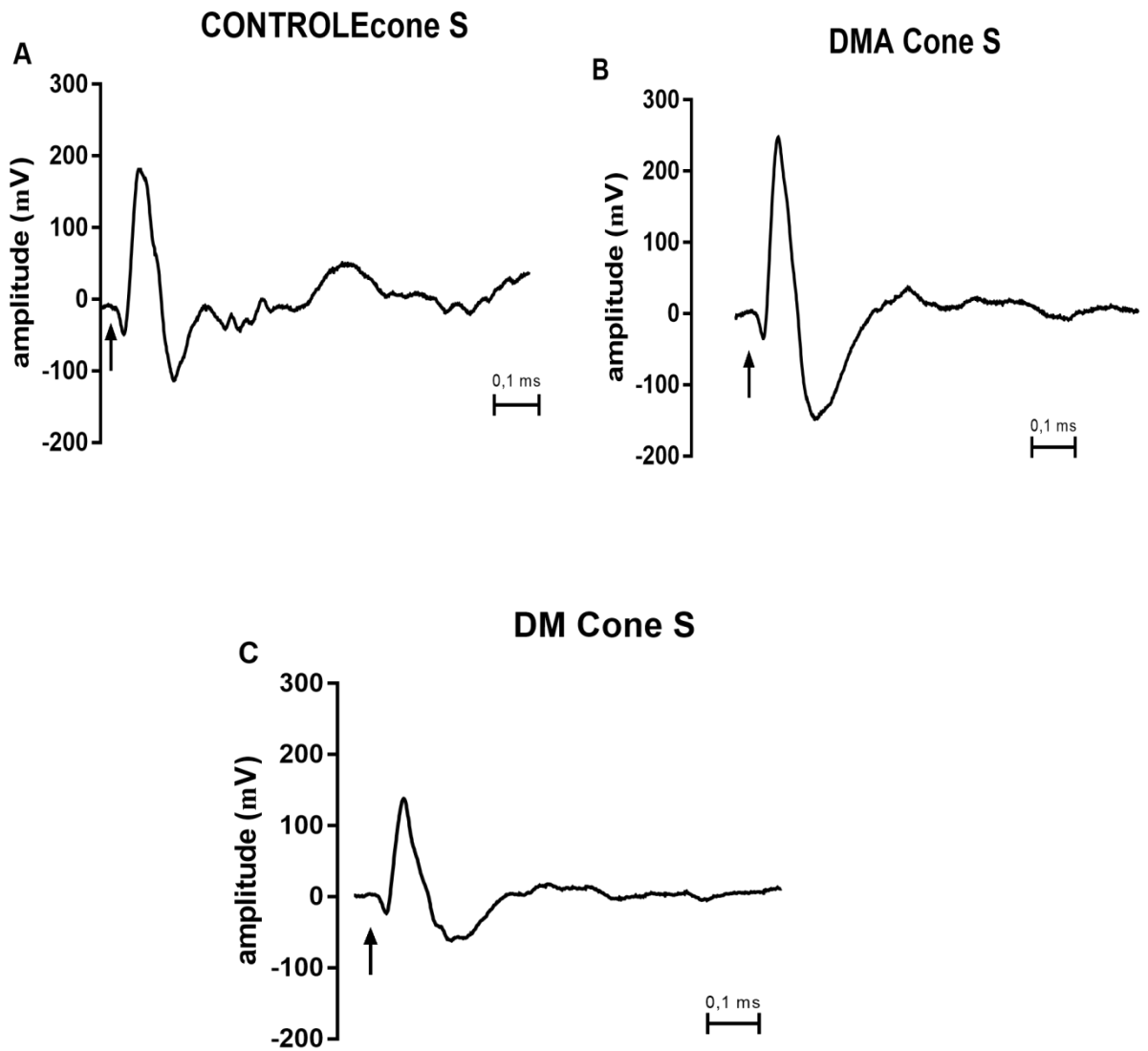


Figura18

Registro da resposta escotópica de mista 2 dos animais de teste. Em A resposta do grupo controle; em B resposta do grupo DM + açai e C resposta do grupo diabetes. A seta indica o início do estímulo.

Resposta fotópica de cone 1Hz**Figura 19**

Registro da resposta fotópica de cone 1Hz dos animais de teste. Em A resposta do grupo controle; em B resposta do grupo DM + açai e C resposta do grupo diabetes. A seta indica o início do estímulo.

Resposta cone S**Figura 20**

Registro da resposta fótica de cone S dos animais de teste. Em A resposta do grupo controle; em B resposta do grupo DM + açai e C resposta do grupo diabetes. A seta indica o início do estímulo.

Resposta cone M

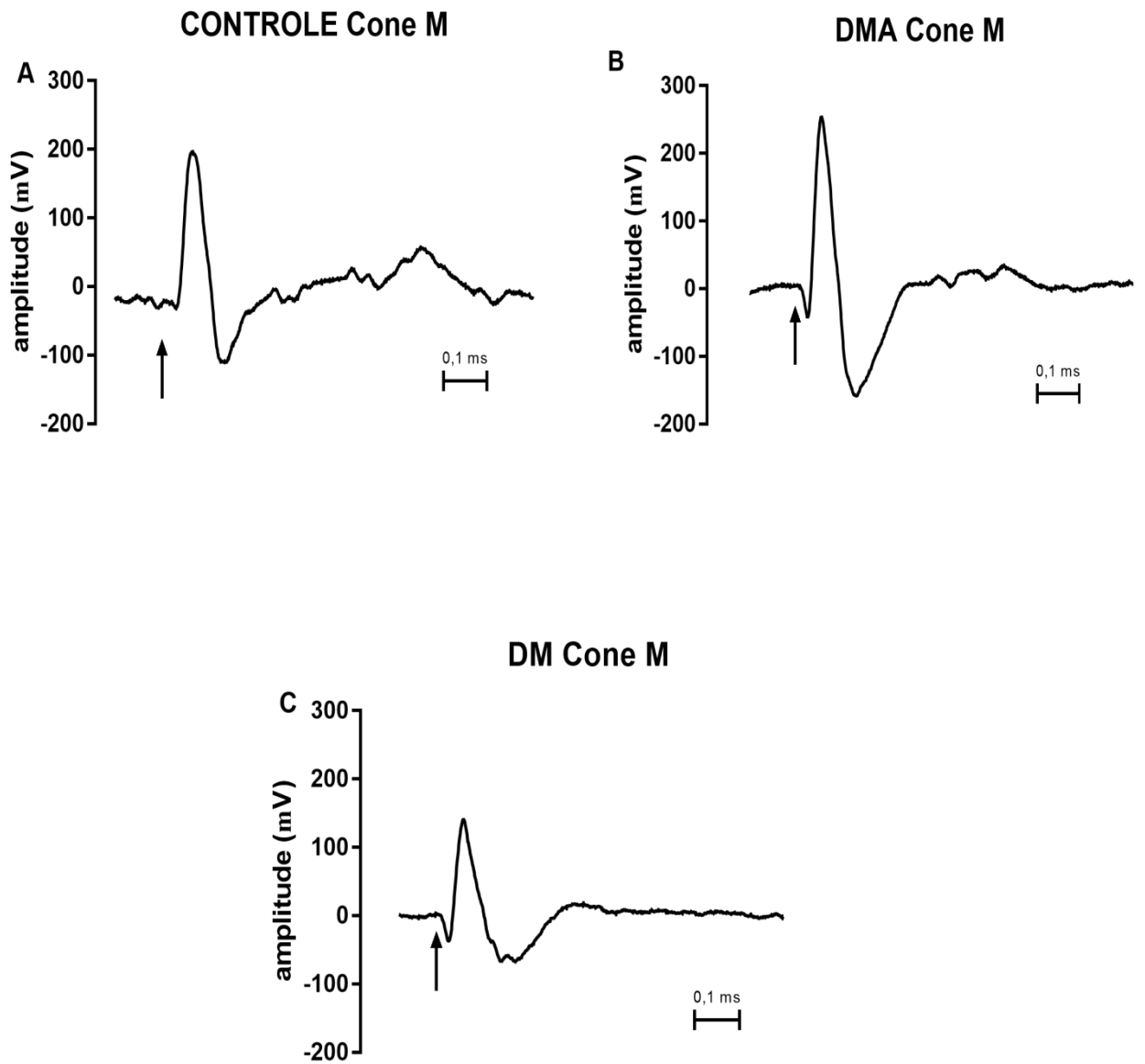


Figura 21

Registro da resposta fotópica de cone M dos animais de teste. Em A resposta do grupo controle; em B resposta do grupo DM + açai e C resposta do grupo diabetes. A seta indica o início do estímulo.

Resultados dos testes comportamentais

As taxas de respostas de pressão a barra, referentes à razão entre os números de eventos brutos e o tempo de sessão, foram monitoradas através de protocolo próprio, idealizado pela pesquisadora (ANEXO I). As sessões de CRF tiveram duração de 15 minutos. As sessões de treino discriminativo também tiveram duração de 15 minutos, com 30 componentes de 30 s, sendo 20 componentes S+ e 10 componentes S-. A partir de então, obteve-se a média e desvio padrão de cada grupo por fase de treino para comparação entre grupos.

As taxas de resposta foram comparadas estatisticamente pelo teste ANOVA uma via, com pós-teste de Tukey, atribuindo valores de $p < 0,05$

Reforçamento contínuo

Na fase de treino CRF, os grupos foram comparados quanto a taxa de resposta de pressão a barra. Este treino foi realizado com todos os animais antes da indução do diabetes. Não foram observadas diferenças significativas na comparação do grupo controle e DM+açai ($p = 0,9541$), controle e DM ($p = 0,5251$) e DM+açai e DM ($p = 0,8461$). Expressos na figura 22.

Tabela 10

Médias e desvio padrão das taxas de respostas pressão a barra entre os grupos na fase CRF

	Controle	DM + açai	DM
Eventos/ min	5,35 ± 1,55	5,05 ± 0,35	4,48 ± 0,96

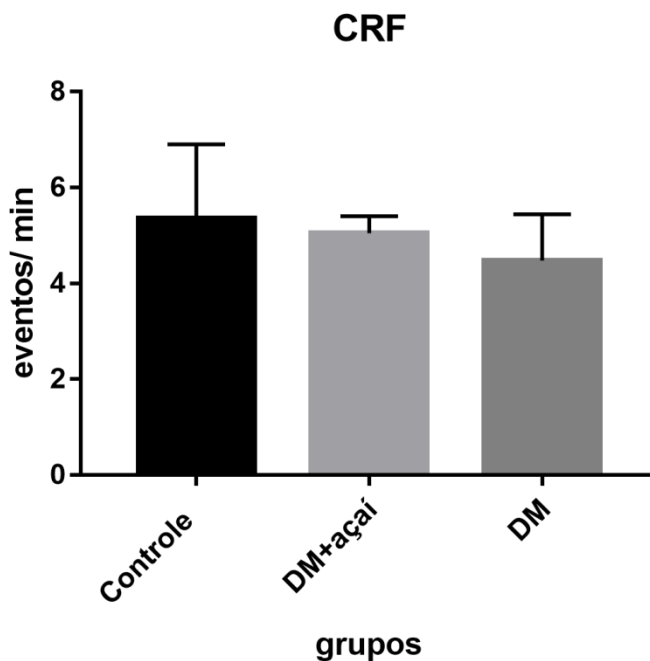


Figura 22

Taxa de resposta de pressão à barra (RPB) em CRF no controle e grupos experimentais. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via com teste de *Tukey*, * < 0.05 . Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Recuperação do CRF

A recuperação CRF para treino de RPB foi a fase de retomada aos treinos de aprendizagem comportamental, quando os animais dos grupos experimentais já eram diabéticos, com glicemia superior a 200mg/dl. Os grupos foram comparados quanto a taxa de resposta de pressão a barra. Não foram observadas diferenças significativas na comparação do grupo controle e DM + açaí ($p = 0,7188$), controle e DM ($p = 0,0628$) e DM + açaí e DM ($p = 0,4767$), dados ilustrados na figura 23.

Tabela 11

Médias e desvio padrão da taxa de resposta na fase de recuperação do CRF

Controle	DM + açaí	DM
5,28 ± 0,873	4,85 ± 0,495	4,19 ± 0,361

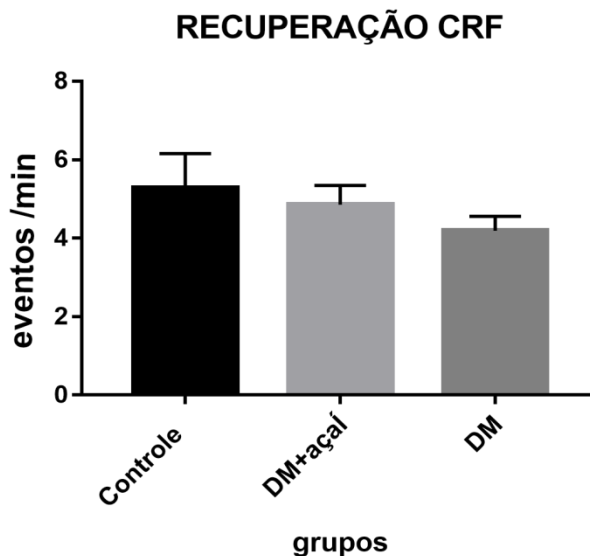


Figura 23

Taxa de resposta de pressão à barra (RPB) em recuperação de CRF no controle e grupos experimentais. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, $* < 0.05$. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Nº de sessões para conclusão do treino discriminativo

Nesta fase admitiu-se como critério de término dos procedimentos a aquisição por cada animal de $ID \leq 90\%$ em duas sessões consecutivas de treino com VR2. Os resultados demonstram uma média de sessões que varia de 7 a 9 sessões para concluir o treino. Houve diferença significativa na comparação do grupo controle com o DM ($p = 0,0040$), nas demais comparações não foram encontradas diferenças significativas controle e DM + açaí ($p = 0,0745$), e DM+ açaí e DM ($p = 0,6860$), Figura 24.

Tabela 12

Médias e desvio padrão do nº de sessões para conclusão do treino discriminativo

Controle	DM+açaí	DM
7 ±0,3162	8,5 ±0,5	9 ±0,3162

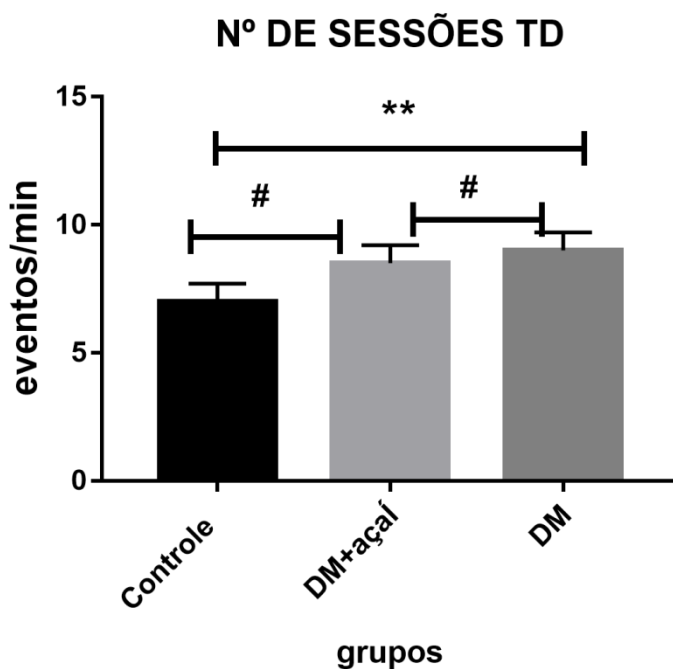


Figura 24

Número total de sessões para término do treino discriminativo no controle e grupos experimentais. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de Tukey, $* < 0.05$.

Incremento no Treino discriminativo em CRF

Na comparação entre grupos das diferenças de incremento (considerou - se a diferença entre as taxas de respostas/min da fase de treino discriminativo em CRF e a taxa de respostas em recuperação de CRF. Nesta análise não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 13

Médias e desvio do incremento de treino discriminativo em CRF e recuperação de CRF

	Controle	DM+ açai	DM
Eventos/ min	11,7 ± 3,96	6,19 ± 4,15	6,59 ± 3,012

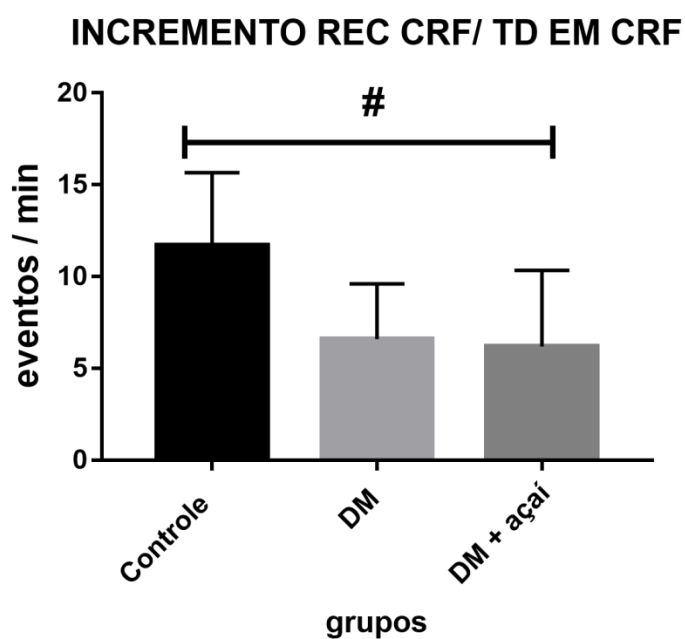


Figura 25

Diferença nas taxas de respostas em recuperação de CRF e treino discriminativo em CRF no controle e grupos experimentais. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, * < 0.05.

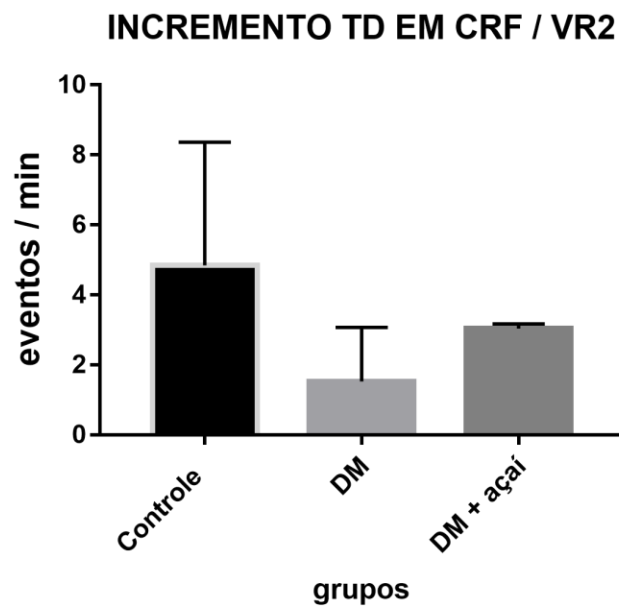
Incremento no Treino discrisminativo em VR2

Na comparação entre grupos das diferenças de incremento (considerou - se a diferença entre as taxas de respostas/min da fase de treino discriminativo em VR2 e a taxa de respostas em de treino discriminativo em CRF. Nesta análise, não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 14

Médias e desvio padrão do incremento de treino discriminativo em VR2 e treino discriminativo em CRF

	Controle	DM+ açai	DM
Eventos / min	4,84 ± 3,52	3,03 ± 0,13	1,54 ± 1,51

**Figura 26**

Diferença nas taxas de respostas de treino discriminativo em CRF e VR2 no controle e grupos experimentais. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de Tukey, * < 0.05.

Treino discriminativo com VR2

Nesta fase final de avaliação comportamental, admitiu-se como critério de término dos procedimentos a aquisição por cada animal de ID < = 90% em duas sessões consecutivas de treino com VR2. Os resultados expressos em média e desvio padrão (tabela 14), evidenciam o aumento do número de respostas de pressão a barra na condição S+ (claro), bem como a redução na condição S- em todos os grupos de teste (Tabela 15).

Tabela 15

Médias e desvio padrão das taxas de resposta do treino discriminativo Claro/escuro

	Controle	DM + açaí	DM
Claro S+	33,83 ± 13,26	18,10 ± 1,131	16,28 ± 5,61
Escuro S -	6,10 ± 3,18	3,40 ± 0,28	2,15 ± 1,53

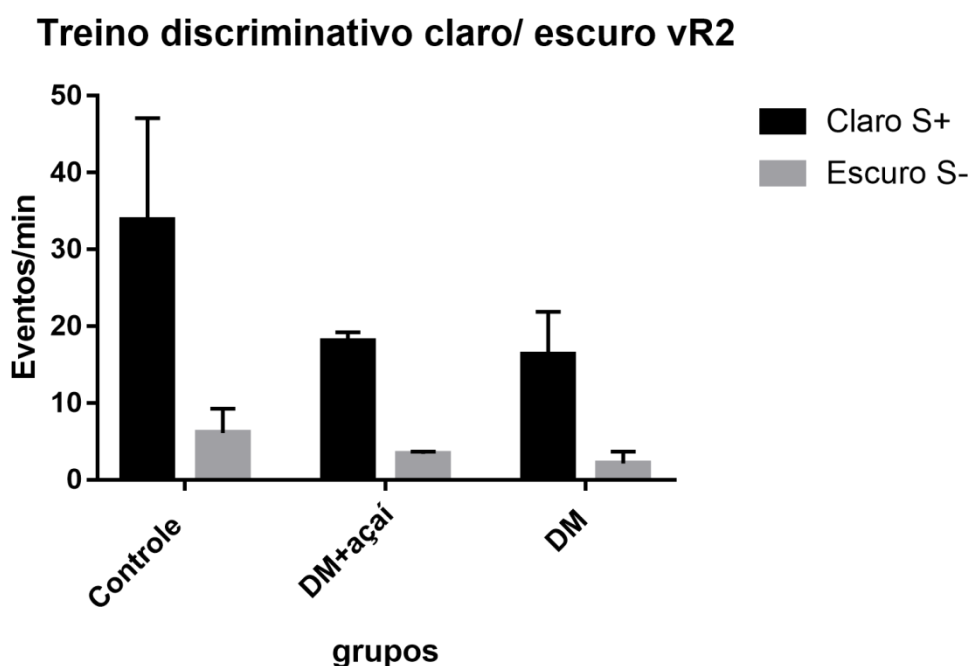


Figura 27

Taxa de resposta de pressão à barra em treino discriminativo claro/escuro Vr2 no controle e grupos experimentais. Resultados expressos em média e em DP. Teste ANOVA uma via compôs teste de *Tukey*, * <0.05 .

Foram observadas diferenças significativas na comparação do grupo controle e DM ($p = 0,0240$), sem diferença entre controle e DM + açaí ($p = 0,1622$) e DM + açaí e DM ($p = 0,9716$) para as respostas no claro (S+).

Para as respostas no escuro em (S-) também houveram diferenças significativas na

comparação do grupo controle e DM ($p = 0,03$). Não foram observadas diferenças significativas na comparação grupo controle e DM + açaí ($p = 0,385$) e grupo DM com DM + açaí ($p = 0,80$).

Desempenho individual no procedimento de treino discriminativo

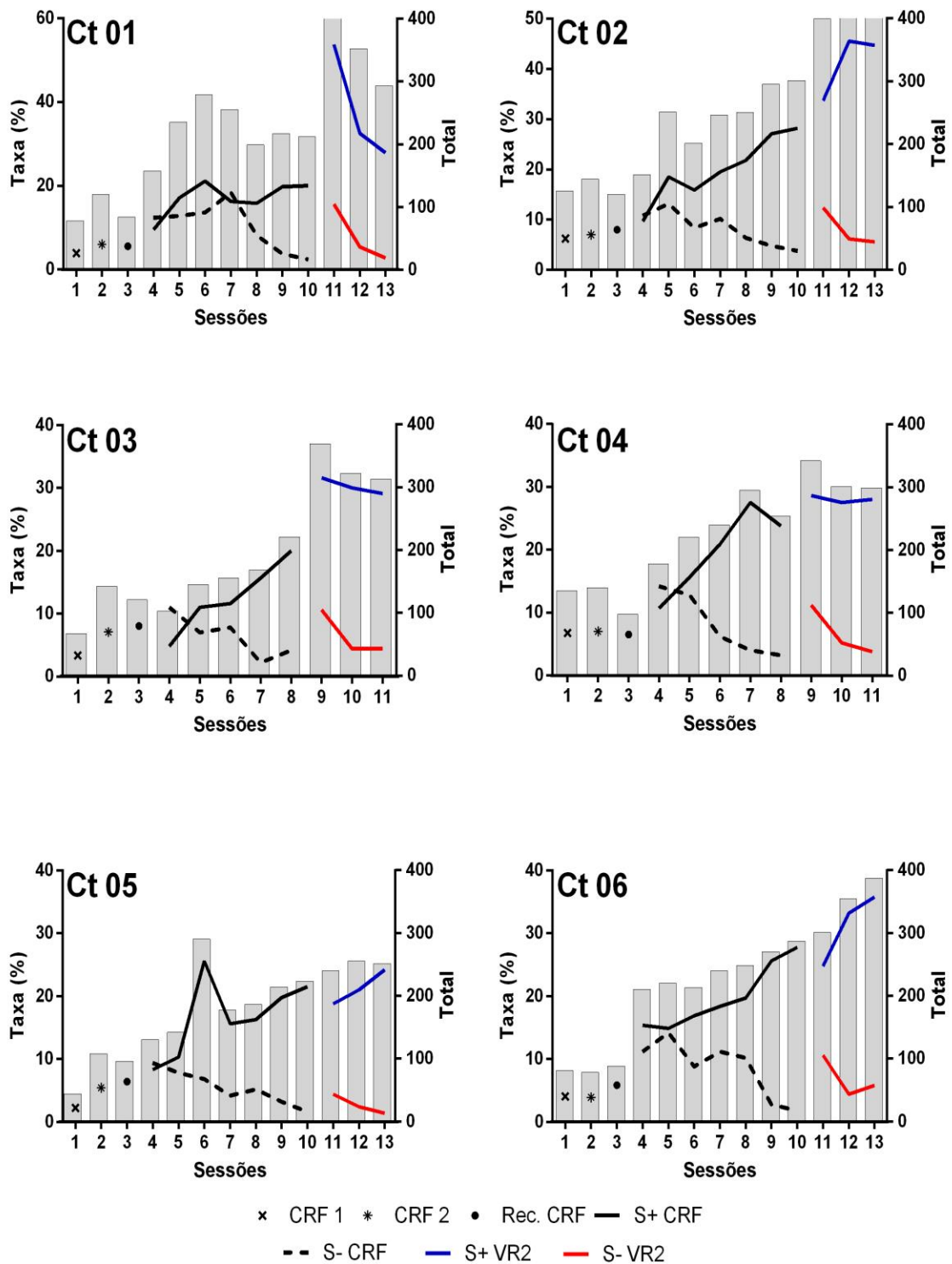


Figura 28

Registro do desempenho em todas as sessões do procedimento de treino discriminativo dos animais de teste do grupo controle.

Desempenho individual no procedimento de treino discriminativo

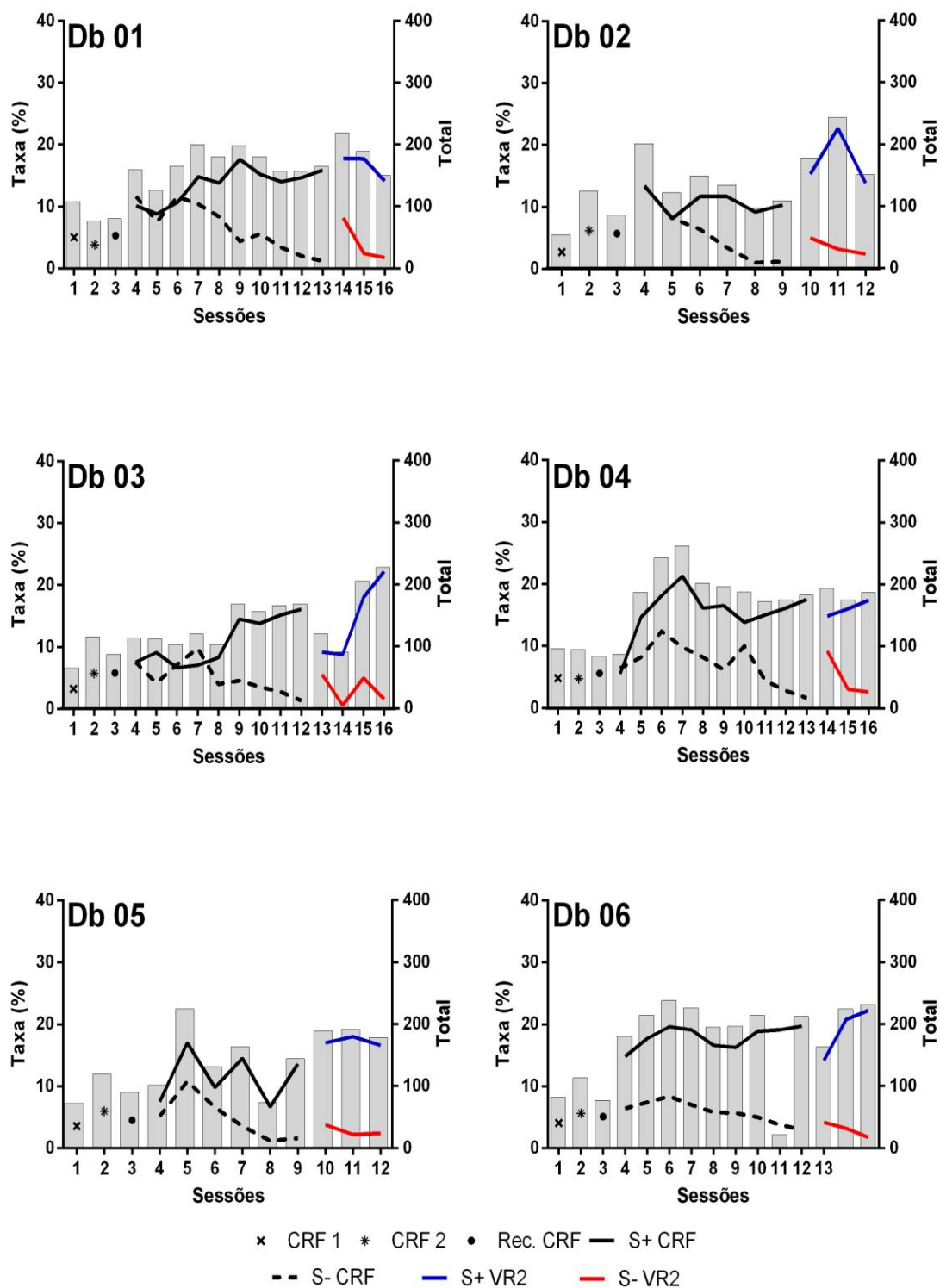


Figura 29

Registro do desempenho em todas as sessões do procedimento de treino discriminativo dos animais de teste do grupo diabético.

Desempenho individual no procedimento de treino discriminativo

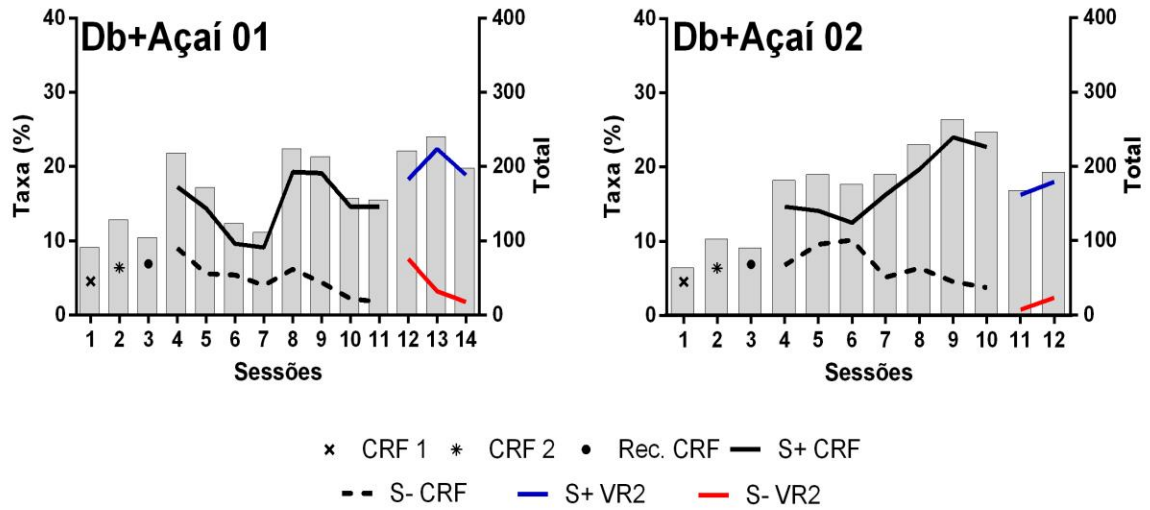


Figura 30

Registro do desempenho em todas as sessões do procedimento de treino discriminativo dos animais de teste do grupo diabetes + açaí.

Discussão

O modelo de diabetes experimental utilizado neste estudo se mostrou eficaz, o protocolo utilizado para o desenvolvimento do diabetes com uso de aloxana, resultou no quadro de diabetes tipo 1 nos animais dos grupos experimentais. Foi observado que após sete dias de administração da droga, em uma dose de 150mg/kg a glicemia já se mostrou elevada, bem acima de < 200mg/dl, caracterizando o diabetes.

O diabetes Mellitus, induzido quimicamente com drogas citotóxicas em animais de experimentação tem sido empregado como modelo para os estudos de agentes terapêuticos e preventivos da doença, dos eventos hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabético (Zanoello *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2007).

O uso da aloxana é considerada modelo eficaz para desenvolver o diabetes Mellitus experimental. Alguns pesquisadores relatam dificuldades em conseguir induzir o diabetes (Federiuk *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2007), devido as características da droga: instabilidade química, metabolismo rápido e fatores como dieta e idade, o que torna quase impossível estabelecer uma relação clara entre as doses de aloxana e sua concentração efetiva no pâncreas (Negri, 2005).

Essa dificuldade também foi observada no presente estudo, quanto a dose eficaz para estabelecer o quadro de diabetes. Os protocolos de indução variam na concentração da droga, Para o presente estudo, foram selecionados para compor os grupos os animais que após sete dias de indução apresentassem glicemia superior a 200mg/dl. Adotou-se para os sujeitos da pesquisa em questão a dose de 150mg/kg.

Os grupos de animais diabéticos apresentaram glicemia superior a 300 mg/dl, e na sua maioria superior a 500 mg/dl. O quadro de diabetes grave tipo 1 foi estabelecido nos animais de estudo.

A literatura evidencia que as alterações iniciam precocemente tão logo a hiperglicemia se

mantém. Philips e colaboradores (2004), mostram em seu estudo que após dois dias do início do diabetes já se observava alterações no ERG, que aumentavam até a 12ª semana.

Estudo realizado por Guimarães (2014), que buscou avaliar as alterações eletrofisiológicas através do ERG em ratos induzidos ao diabetes e hipotiroidismo, evidenciou importantes alterações no ERG a partir de 30 dias do início das patologias. A conclusão foi que ambas doenças afetam a função visual, mas o diabetes de forma mais rápida. Além disso, os resultados do ERG mostraram que os animais diabéticos foram mais afetados que os com hipotiroidismo, sugerindo que o diabetes provoca mais danos ao tecido retiniano.

No presente estudo nos componentes do ERG foram analisadas as amplitudes da onda b. Após 30 dias do início do diabetes, esta amplitude se mostrou diminuída em todos os tipos de resposta avaliadas (escotópica de bastonete, escotópica de mista 1 e 2, fotópicas de cone 1Hz, azul e verde) nos animais diabéticos sem adição do açúcar na dieta.

A retinopatia diabética afetou respostas de cones e bastonetes, já que houve redução na amplitude da onda-b em condições de adaptação escotópica e fotópica, indicando déficit nas diferentes células da retina responsáveis por tal componente (células bipolares *ON* e células de Müller). Estes dados também foram compatíveis com dados obtidos por bdelkader (2013), em ERG com humanos onde se obteve alterações nas respostas escotópicas e fotópicas, e Kohzaki & colaboradores (2008), que relatam diminuição da amplitude da onda b.

Os déficits na função do sistema visual foram relatos tanto em humanos quanto em modelos de animais com diabetes tipo I. A redução da amplitude das ondas e potenciais oscilatórios foram os que mais ocorreram (Guimarães, 2014; Oliveira, 2018). Estas alterações podem advir de diversos mecanismos, dentre elas duas são as mais aceitas.

A primeira forma de alteração retiniana onde Ino e colaboradores (2000) e Mac Gregor *et al* (1986), descrevem que o estresse oxidativo, acúmulo de sorbitol nos tecidos, provocam hipóxia tecidual na retina evoluindo para morte celular (Reis *et al.*, 2008; Fortunato *et al.*, 2008;

Ferreira *et al.*, 2011).

A segunda hipótese é de que a excitotoxicidade do glutamato, Li & Puro (2002), mostram que o diabetes gera uma disfunção no transportador de glutamato na retina. Apesar deste ser o principal neurotransmissor da retina, sua concentração excessiva é prejudicial e gera neurodegeneração. Ensaios já sugerem que a retinopatia diabética causa uma perda crônica de neurônios na retina interna, pelo aumento da frequência de apoptose (Hammes *et al.*, 1995; Mizutani & Kern, 1996; Serrabarsa *et al.*, 2008).

Enquanto a maioria dos estudos tem dado ênfase às mudanças vasculares da retina na RD, surgem evidências de que a função das células nervosas da retina são alteradas logo após o início do diabetes. Mudanças funcionais podem ser identificadas através do ERG antes do desenvolvimento da patologia vascular, sugerindo que elas são decorrentes de um efeito direto do diabetes na retina neural ao invés de serem secundárias a quebra da barreira hemato-retiniana. Diante desses achados, o presente estudo deteve-se na avaliação da retina no estágio inicial do desenvolvimento da retinopatia (Serrabarsa *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2011).

O desenvolvimento da RD e as possíveis alterações bioquímicas decorrentes do estresse oxidativo no processo de alterações da retina se mostraram de forma diferenciada no grupo diabetes + açaí (*Euterpe Oleracea*), no qual as amplitudes da onda b analisadas nas diversas respostas, mostraram-se superiores no grupo diabético + açaí e até mesmo em alguns componentes superiores ao grupo controle. Esses dados sugerem que o poder das substâncias antioxidantes do açaí promoveram uma possível proteção no agravo dos danos visuais, ainda que em sujeitos patológicos com o mesmo tempo de doença que os do outro grupo.

Estes achados estão em consonância com estudo recente de Oliveira (2018), em que na retina de camundongos com diabetes induzida, acompanhados em três semanas consecutivas com realização de ERG semanalmente, também demonstraram a melhora na amplitude da onda b em camundongos que receberam o tratamento com dieta enriquecida com açaí (*Euterpe*

Oleracea). Estudo semelhante foi feito por Sasaki *et al* (2010), onde o comprometimento do ERG devido ao estresse oxidativo nas células neuronais da retina de camundongos mostrou-se suprimido devido à administração de antioxidante, que suprime EROs local.

Em outro estudo realizado por Brasil *et al* (2016), avaliou-se o efeito de dieta enriquecida com açaí, na prevenção de alterações retinianas provocadas pela exposição ao metil mercúrio, demonstrando que a utilização da polpa da fruta na dieta permite prevenir estas alterações retinianas que foram avaliadas através o eletroretinograma de campo total.

As substâncias antioxidantes contidas no fruto, responsáveis pela redução do estresse oxidativo nas células, as antocianinas, proantocianidina e flavanoídes são considerados os principais responsáveis pela coloração do fruto. Quanto mais escuro é o tom vermelho da polpa do açaí, maior será a concentração de antocianinas. Uma revisão em 2011 mostrou 20 compostos químicos bioativos e várias atividades farmacológicas da espécie (Heinrich *et al.*, 2011).

Na pesquisa atual, a administração do açaí (*Euterpe Oleracea*) foi realizada por 30 dias consecutivos para se avaliar os efeitos dessa dieta. O tempo de suplementação foi suficiente para se observar as possíveis mudanças no organismo, em concordância com o estudo de Pala (2016), que avaliou em humanos os efeitos do consumo do fruto por igual período, afim de observar o efeito do açaí (*Euterpe oleracea*) sobre o estado oxidativo e a influência nas transferências de lipídeos para HDL em mulheres. Foi observado que o açaí apresentou atividade protetora contra o estresse oxidativo e um efeito benéfico no metabolismo de lipídeos.

A correlação desta capacidade antioxidante do açaí é positiva para as frações de antocianinas e os compostos fenólicos totais Santos *et al.*,(2008) e Spada *et al* (2008) também demonstraram *in vitro* que a polpa do açaí possui atividade antioxidante para o radicais livres. A capacidade antioxidante também foi avaliada *em ex vivo* em tecidos isolados do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo de ratos. O pré-tratamento com açaí reduziu o dano oxidativo induzido por H₂O₂ em lipídios e proteínas e a atividade das enzimas, restabelecendo níveis basais

semelhantes ao grupo controle em todos os tecidos avaliados (Spada *et al.*, 2009; Guerra *et al.*, 2011).

Estudos com a *Euterpe Oleracea* para avaliar seu efeito sobre diversas patologias, investigação em ultraestruturas (cadeia de DNA, análise bioquímica, ou como proteção de estruturas vem sendo iniciado. Porém, a investigação combinada de efeitos fisiológicos e comportamentais ainda é escassa.

A pesquisa buscou associar as duas áreas de investigação, onde além de das interações entre doença e indivíduo voltado para a função retiniana e principalmente dos neurônios que desempenham funções da visão, buscou-se descrever as repercussões da doença, e a influência da administração de açaí na dietas dos animais diabéticos e sua influência nas alterações do comportamento do sujeito e sua relação com o ambiente, mais especificamente seu comportamento de aprendizagem.

Na tentativa inicial da pesquisa, de desenvolver o treino discriminativo para visão de cores com mosaicos pseudoisocromáticos, foi frustrada, pois não houve diferenciação de resposta ao longo das sessões. Isso mostra que provavelmente aspectos do procedimento foram ineficazes para gerar índices discriminativos, uma vez que ao longo de muitas sessões não houve melhora de desempenho em todos os grupos.

Para essa etapa da pesquisa, os equipamentos utilizados, a construção do software para exibição dos mosaicos e gerar os testes foram bem sucedidos. Os ajustes de tamanho de alvo, posição de exibição, ajuste de cores, mensuração do comprimento da onda, foram feitos mas, não foram eficazes para facilitar e ou permitir esse processo de aprendizagem nos animais do estudo.

Talvez adaptações mais precisas, como posicionamento fixo do animal na caixa para visualizar o alvo, um monitor com tela de maior precisão nas cores e medidas de cores do diagrama mais compatíveis com o limiar de sensibilidade visual dos ratos pudessem permitir respostas comportamentais esperadas para discriminação.

Em uma inspeção visual panorâmica do desempenho comportamental dos animais em cada grupo, observa-se que em todos os grupos os animais e sua maioria apresentam um padrão de respostas, com perfil de aumento de taxa de resposta em cada fase, passando para a discriminação inicialmente com respostas tanto em reforço ou extinção semelhantes e que ao longo das sessões foram se distanciando. Todos os animais atingiram $ID < 90\%$, tanto em CRF, quanto em VR2, ou seja independente do diabetes todos passaram a discriminar.

Percebeu – se uma diferenciação entre os grupos em relação tanto na taxa de resposta quanto no total de respostas acumuladas. Os grupos diabéticos apresentam uma diminuição dessas respostas a partir da transição do treino em CRF para VR2.

Na aprendizagem operante indiscriminado em CRF não houve diferença significativa, o que permitir discutir que todos animais no início do processo de aprendizagem dispunham de condições iguais e desempenho esperado para essa fase.

Após o período de indução do diabetes e término dos testes eletrorretinográficos, na fase de recuperação de CRF, houve uma manutenção da resposta de pressão a barra e ainda que nos animais dos grupos experimentais já doentes, não houve diferença de desempenho nesta etapa de treino. Isto pode permitir afirmar que nesse procedimento o desempenho dos diabéticos não mudou, ou seja, todos os grupos estavam em termos de aprendizagem sem prejuízo.

No Treino discriminativo, etapa CRF a maioria dos animais nos dois grupos tiveram aumento na taxa de respostas global (componentes S+ e S- somados) nas sessões de Treino Discriminativo, em comparação com a taxa na recuperação de CRF. Então, os animais diabéticos que não diferem dos controles em taxa de respostas em CRF e que não diferem no aumento dessa taxa quando passam para o treino discriminativo.

Na transição da fase de recuperação de CRF, para treino discriminativo em CRF, a diferença do incremento (taxa de resposta da última sessão de treino discriminativo subtraído a taxa de resposta em recuperação de CRF) não foi significativa, mas mostrou um aumento no

responder de todos animais.

Enquanto que, na transição de treino discriminativo em CRF para discriminativo em VR2 para os grupos diabéticos não houve um crescente na taxa de resposta e nas respostas acumuladas diferentemente do ocorrido no grupo controle, que apresentou um aumento nas taxas de respostas global e respostas acumuladas.

Embora a inspeção visual indique um padrão de desenvolvimento diferente entre o grupo controle e os diabéticos (com incremento marcado nas duas primeiras transições, mas não na segunda (discriminativo em CRF e discriminativo em VR2), a comparação estatística não corroborou com essa interpretação no nível dos grupos, pois essas diferenças estatisticamente não foram significativas.

Entretanto, foi possível observar que há diferença significativa nas médias de taxa de respostas na última sessão de Treino Discriminativo em VR2. Ou seja, embora não haja diferença no desempenho inicial de diabéticos e controles, eles parecem diferir no desenvolvimento da discriminação (os diabéticos terminam com taxas significativamente mais baixas que os controle).

Este achado permiti dizer que, não houve perdas nos processo de aprendizagem mas que a diminuição da capacidade física dos animais diabéticos, causados pelo próprio curso da doença associado ao período de privação de água, pode ter sido responsável por esse responder de menor magnitude. Isso se justifica até pelo fato de que esta mudança já inicia a partir das últimas fases do processo de discriminação.

Esse achado corrobora com o estudo de Machado e colaboradores, 2010, que evidenciou em seu estudo, que buscava correlacionar aprendizagem e desnutrição com ratos Wistar com diferentes dietas, avaliando o desempenho de reposta de pressão a barra. Concluíram que cobaias com dietas mais equilibradas, apresentam melhor desempenho do comportamento aprendido do que os outros desnutridos, que apresentaram escores inferiores na execução do comportamento

de pressão a barra.

O treino discriminativo realizado com ratos neste estudo, demonstrou diferença em comparação ao tempo de aprendizagem entre os grupos, onde o grupo que necessitou de um maior número de sessões para o término do treino e aquisição de critério de ID de 90% no claro/escuro foi o grupo diabetes. Enquanto que o grupo DM + açai não apresentou diferença em comparação ao grupo controle.

Esse resultado pode ser justificado pelo fato de que o diabetes trata-se de uma doença sistêmica e metabólica, esta atua diretamente na função de todos os órgãos inclusive na absorção dos nutrientes necessários para gerar energia para manutenção do organismo vivo e sua interação com o ambiente em que vive. Mais especificamente no processo da doença principalmente o metabolismo da produção das proteínas, é afetado, que é um macronutriente extremamente importante que possui efeito anticatabólico que inibe a degradação e inibe a glicogênese. Quando ocorre deficiência de insulina, quadro observado no diabetes tipo 1, os aminoácidos não são mais incorporados as proteínas musculares, gerando uma desordem nutricional no organismo (Fernandes, 2013).

Nos ratos desnutridos foram mostrados em estudo anteriores aumentos da locomoção no Campo Aberto (Brioni; Orsingher, 1988; Salas; Cintra, 1979); redução da atividade exploratória (Fraňková, 1968; Fraňková; Barnes, 1968); redução da exploração das áreas laterais em comparação com as áreas centrais da Tábua de Buracos (De Campos, 2006); maior exploração dos braços abertos no Labirinto em Cruz Elevado (Almeida; Garcia; de Oliveira, 1993; Pereira Da Silva; De Oliveira, 2005; Riul *et al.*, 1998).

Também tem sido demonstrada uma maior sensibilidade dos ratos desnutridos aos estímulos aversivos e maior resistência à extinção (Almeida; de Oliveira, 1994; De Oliveira; Almeida, 1985). desnutrição há uma predominância de comportamentos relacionados com alimentação em detrimento de comportamentos relacionados com atividades de exploração do

meio ambiente.

Alguns estudos mostraram pior desempenho dos ratos desnutridos em tarefas de discriminação visual (Stephens, 1981; Tonkiss *et al.*, 1991), em procedimentos de relação espacial, no Labirinto em Y (Barnes *et al.*, 1966) e em procedimentos de discriminação visual com macacos (Zimmermann, 1975).

O estudo de Céledon, Smart e Dobbing (1982) com ratos desnutridos na gestação e lactação mostrou piores desempenhos dos desnutridos em relação aos controles na discriminação de estímulos (barras brancas e barras pretas ou barras verticais e barras horizontais), sendo necessário mais treino para os desnutridos atingir o critério.

O estudo de Tonkiss e colaboradores (1991) com ratos adultos recuperados da desnutrição pré-natal introduzida cinco semanas antes do acasalamento e durante o período da gestação, com tarefas de discriminação de estímulos de cor (preto e branco), posição (horizontal e vertical) ou forma (círculo e quadrado) mostrou que também foi necessário mais treino para os desnutridos do que para os controles nas tarefas de discriminações. Sendo assim, enquanto a desnutrição resulta em prejuízos estruturais e neuroquímicos no SNC a estimulação (Feliciano, 2006).

O diabetes altera o metabolismo de tal forma, que gera perda tecidual pelo catabolismo, principalmente muscular, podendo levar a morte indivíduos sem tratamento (Fernades, 2013). Tal fato pôde ser observado no presente estudo, no qual os animais do estudo diabéticos apresentaram perda gradativa do peso corporal, pelagem, ressecamento de mucosa e diurese aumentada, sinais clínicos de quadro de diabetes descompensada, onde alguns evoluíram a morte no decorrer da pesquisa.

Outro estudo realizado por Bastos (2017), demonstrou que animais com doença hormonal com repercussão metabólica e que também cursa com desnutrição (hipotiroidismo)

apresentam desempenho em tarefas de aprendizagem inferior quando comparados a animais controle. Neste estudo, os animais com hipotireoidismo tiveram nº de sessões maior para passar da fase de modelagem para o treino intermitente de razão 2.

A comparação do desempenho dos ratos diabéticos e controles durante o treino da discriminativo de claro/escuro, mostrou que houve diferenças entre grupos (controle e DM) em relação as taxas de respostas tanto na condição claro quanto escuro (Figura 24). Todos os grupos ao decorrer das sessões foram capazes de atingir o critério de ID de 90%, e que apesar de ser uma razão baseada em números de respostas, é uma maneira bastante habitual de análise em estudos de discriminação. Entretanto, este tipo de análise representa apenas uma análise global da distribuição de respostas nas duas condições ambientais claro/escuro (Feliciano, 2006).

De modo geral, ratos controles e diabéticos apresentaram uma aprendizagem discriminativa quanto ao estímulo luz na condição claro/ escuro (Figura 24), mostrando que o treino foi eficiente para estabelecer a aquisição dessa aprendizagem comportamental.

Diante dos dados obtidos, o estudo pôde demonstrar a melhora na amplitude da onda b dos animais que receberam o tratamento com dieta enriquecida com açaí (*Euterpe Oleracea*) na maioria das respostas do ERG, sugerindo o efeito neuroprotetor causado pelo açaí na retina dos ratos com diabetes induzida, podendo estar relacionado com a presença das antocianinas.

Ainda que as respostas obtidas na amplitude das ondas b nos componentes do ERG, não foram superiores ao grupo controle em todas as respostas analisadas nesta pesquisa, estas foram superiores ao grupo diabético sem suplementação com açaí. Assim como na aprendizagem discriminativo, o grupo suplementado com açaí atingiu critério de ID em menor tempo de treino discriminativo.

Torna-se necessário mais estudos randomizados, controlados que esclareçam os mecanismos de atuação desta neuroproteção na retinopatia diabética com concentrações específicas dos substratos do fruto, acompanhamento dos indivíduos por mais tempo, análise

imunoistoquímica e até mesmo de ultraestrutura afim de elucidar tais evidências.

É relevante se investigar mais especificamente a redução do estresse oxidativo, desde estágios precoces da retinopatia diabética bem como seu efeito protetor, utilizando os fitoquímicos em especial o açaí, fruto nativo da região Amazônica e alto valor nutricional, pois sobre este mecanismo bioquímico, os dados ainda são inconclusivos. Faz-se imprescindível o entendimento das bases moleculares do seu efeito, a fim de se implementar novas terapêuticas adjuvantes à insulina no tratamento do Diabetes mellitus e suas complicações.

Conclusão

- Os resultados do estudo evidenciam que a utilização de dieta enriquecida com açaí produz neuroproteção contra os danos visuais, que cursam com a diminuição da amplitude da onda b de ratos Wistar com retinopatia diabética induzida;
- O procedimento utilizado para discriminação mostrou-se eficaz, pois resultou em diferenciação comportamental nas condições claro e escuro;
- A deterioração da capacidade física dos animais diabéticos influencia na magnitude do responder, mas não evidencia prejuízo na aprendizagem de discriminação claro/ escuro dos animais estudados;
- A retinopatia diabética produz alterações visuais desde o início de seu desenvolvimento e podem ser avaliadas precocemente.

Referências

- Alfradique, M.E, Bonolo, I.D, Costa, M.F. Dourado. I, Mendonça, C, S, Oliveira, V, B, Sampaio, L, F, R, Simoni, C.D & Turci, M.A. (2009). Internações por condições sensíveis à atenção primária: a construção da lista brasileira como ferramenta para medir o desempenho do sistema de saúde (Projeto ICSAP – Brasil). *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 25, n. 6.
- Almeida, S. S.; De Oliveira L. M. Acquisition and extinction of jumping two-shuttle box and bar press avoidance responses in malnourished rats: effects as shock. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v.27, p. 2443-2452, 1994.
- Almeida, S.S.; Garcia, R. A.; De Oliveira, L. M. Effects of early malnutrition and repeated testing upon locomotor and exploratory behaviors in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*, Oxford, v. 54, p. 749-752, 1993.
- American Academy of Ophthalmology. National Guideline Clearinghouse: Diabetic Retinopathy. (2004). v. 30-4-0004.
- American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Diabetes Care Jan; 33(Supplement 1): S62-S69. <http://dx.doi.org/10.2337/dc10-S062>.
- Barnes, R. H.; Cunnold, S. R.; Zimmerman, R. R.; Simmons, H.; Macleod, R.
- Bastos, Antônio Carlos da Silva. (2017). Investigação eletrofisiológica e comportamental da função visual em camundongos suíços com hipotireoidismo congênito induzido por metimazol. Dissertação. Universidade Federal do Pará.
- Baumman, I. Whoolery- Lioyd, H & Friedman, A. (2009). " natural" ingredients in cosmetic dermatology. *J. Drugs dermatol.* vol 5, pag s5-s9.
- Bernaund, Fernanda Sarmiento Rolla. Funchal & Claudia, D.Sc. (2011). Atividade Antioxidante do Açaí. *Rev Nutrição Brasil*. V. 5.N 10.p 310-316.

- Bosco A, Lerário AC, Soriano D, Santos RF, Massote P, Galvão D, Franco ACHM, Purisch S, Ferreira AR. Retinopatia diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(2):217-27.
- BRASIL, A. C. Avaliação do efeito protetor da euterpe oleracea (açai) na resposta eletrofisiológica da retina de ratos expostos ao metilmercúrio. Dissertação de Mestrado. Pará. Universidade Federal do Pará, 2014. 101p.
- Brasil, Ministério da Saúde. (2013). Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes mellitus. Brasília: Ministério da Saúde;. [Caderno de atenção básica; 16. Série A. Normas e manuais técnicos]
- Brioni, J. D.; Orsingher, O. A. Operant Behavior and reactivity to the anticonflict effect of diazepam in perinatally undernourished rats. *Physiology & Behavior*, Oxford, v. 44, p.193-198, 1988.
- Burns, M.E. et al. (2007). Dynamics of Cyclic GMP Synthesis in Retinal Rods. *Neuron*. 36: 81-91,
- Carmo -Buonfiglio D. Estudo da síntese de melatonina em retinas de ratos Wistar diabéticos [tese (Doutorado em Fisiologia e Biofísica)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.
- Catania, A.C. (1999). *Aprendizagem: Comportamento, Linguagem e Cognição*. Artmed: Porto Alegre
- Celedón, J. M.; Smart, J. L. ; Dobbing. (1982.). Effects of level of motivation on visual discrimination transfer of learning, and long-term memory in previously undernourished and control rats. *Nutrition and Behavior*, v.1, p. 89-97.
- Cho N. C., Poulsen G. L., Ver Hoeve J. N., Nork T. (2000). Selective loss of S- cones in diabetic retinopathy. *Archives of Ophthalmology*. 118: 101393-400.
- Corrêa, Zélia Maria da Silva Ralph Eagle Jr. (2005). Aspectos patológicos da retinopatia diabética. *Arq Bras Oftalmol.* n,68(3):410-4.

- Dain, Stephen. (2004). Clinical colour vision tests. *Clin Exp optom* 2004; 87; 4-5: 276-293.
- DE Oliveira, L. M. Malnutrition and environmental interaction effects upon animal behavior. *Revista Chilena de Nutrición*, Santiago, v. 13, p. 99-106, 1985.
- Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. (2014-2015). Sociedade Brasileira de Diabetes ; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio. – São Paulo: AC Farmacêutica.E. (Ed): M.I.T. Cambridge Press, 1968, p. 312-327.
- Efeito do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre o estado oxidativo e a influência nas transferências de lípidos para hdl em mulheres. Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto. 2016.
- Ewing F. M. E., Deary I. J., Strachan., W. J., Frier B. M. (1998). Seeing Beyond Retinopathy in Diabetes: Electrophysiological and Psychophysical Abnormalities and Alterations in Vision. *Endocrine Reviews*. 19: 462 – 476.
- Favacho, ASH.; Oliveira, BR.; Santos, KC.; Medeiros, BJL.; Souza, PJC.; Perazzo, FF.; Carvalho, JCT. (2011). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.21, n. 1, p. 105-114.
- Feliciano, E. A.O.; Sousa, D. D. G.; De oliveira, L. M. Medidas de aprendizagem de discriminações complexas em ratos controles e desnutridos com apresentação de estímulos sobrepostos no procedimento de comparação com o modelo. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- Fletcher, E.L., Phipps, J.A., Ward, M.M., Puthussery, T., Wilkinson-Berka, J.L. (2007). Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy. *Current Pharmaceutical Design*, 13: 2699-2712.
- Fraňková, S. Nutritional and psychological factors in development of spontaneous behavior in the rat. In: *Malnutrition, learning and behavior*. Scrimshaw, N. S. e Gordon, J.

- Galietero,, Rodríguez- A; Montés-Micó, R; Munoz, G; Albarrán-Diego, C.(2005). Blue-light filtering intraocular lens in patients with diabetes: Contrast sensitivity and chromatic discrimination. *Journal Cataract Refract Surgery*, 31: 2088-2092.
- Gomes ACM, Dourado DM. (2010). Efeito de agente indutor de diabetes no pâncreas de ratos wistar tratados com a fração aquosa das partes aéreas da planta Piper aducum. *Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente*. Vol. 13, N. 19.
- Goulart, P.R.K., Bonci, D.M.O., Galvão, O.F., Silveira, L.C.L., & Ventura, D.F. (2013). Color discrimination in the tufted Capuchin Monkey, *Sapajus* spp. *PLoS ONE*. 8(4): e62255. doi:10.1371/journal.pone.0062255
- Guimarães, F. G. Avaliação do desempenho visual em modelos de animais acometidos com diabetes e hipotireoidismo. *Dissertação de Mestrado*. Pará. Universidade Federal do Pará, 2014. 79 p.
- Hall, Jhon E. *Tratado de Fisiologia Médica*. (2011). Rio de Janeiro. Elsevier. 12^aed.
- Hammes HP, Federoff HJ, Brownlee M. (1995). Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Mol Med*. 1(5):527-34.
- Han Y, Adams AJ, Bearse MA Jr, Schneck ME. (2004). Multifocal electroretinogram and short-wavelength automated perimetry measures in diabetic eyes with little or no retinopathy. *Arch Ophthalmol*.;122(12):1809-15.
- Harazny, J., Scholz, M., Buder, T., Lausen, B & Kremers, J.(2009) . Electrophysiological deficits in the retina of the DBA/2J mouse. *Doc Ophthalmol* 119, 181-197.
- Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular bases of circadian rhythms. (2001). *Annu Rev Cell Dev Biol*.;17:215-53.

- Henriques J, Figueira J, Nascimento J, Gonçalves L, Medeiros MD, Rosa PC & Silva R. (2015). Retinopatia Diabética - orientações clínicas do Grupo de Estudos da Retina de Portugal. *Oftalmologia rev. SPO* vol. 39:4 supl. Out-Dez.
- Hovis, Jeffery K & Muntz, Alex. Simulating color vision deficiencies on clinical tests with a blue light.(2013). *Optometric Education*. Vol 38, n.12. 60-66.
- International diabetes federation. (2005). Global Guideline for Type 2 Diabetes, Clinical Guidelines Task Force Screening for Diabetic Retinopathy: An Overview.
- International Diabetes Federation. What is diabetes? IDF. [cited 2010 May 26]. Available from: <http://www.idf.org/node/1049?unode=3B96844A-C026-2FD3-87E85FD2293F42E9>
- International diabetes federation.(2015). *Idf diabetes atlas*. V. 7, p. 1-163.
- Jacobs, G.H.(1989). Within –species variations in visual capacity among squire monkeys (*Saimiri Sciureus*): *Color Vision Research*, 24, 1267- 1277.
- Jacobs, G.H.Neitz, J.,& Degan, J.F.(1991). Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature*, 353, 655-656.
- Jensen, G.S., WU,X., Patterson.K.m., Barner. J.S et al.(2008). In vitro and in vivo antioxidant and antiinflammatory capacities of an antioxidant - rich fruit and berry juice blend. Result of a pilot and randomized, double- blinded, placebo controlled crossover study. *J Agric Food Chem*. Vol 56, pag 8326- 8333.
- Joseph, J.A; Shukitt- Hale, B & Lau, F.C. (2007). Fruit Polyphenols and their effects on neuronal signaling and Behavior in senescence. *ANN NY Acad*. Vol 1100, pag 460- 485.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, editores. *Princípios da neurociência*. (2003). Pereira ACG, tradutor. 4th ed. São Paulo: Manole; 2003. 1412 p.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, editores. *Princípios da neurociência*. Pereira ACG, tradutor.

4th ed. São Paulo: Manole; 2003. 1412 p.

- Kohzaki, K.; Vingrys, A.J & Bui, B.V. (2008). Early Inner Retinal Dysfunction in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. . *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 49 (8).
- Krook, L.(1966). Influence of nutritional deprivations early in life on learning behavior of rats measured by performance in a water maze. *The Journal of Nutrition, Philadelphia*, v. 89, p. 399-410,
- Kusari, J.; Zhou,S.; Padillo,E.; Clarke, K.; Gil, D.W. Effect of Memantine on Neuroretinal Function and Retinal Vascular Changes of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats (2007). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 48 (11),
- Leandro Tadeu Ferreira¹ , Israel Hideo Saviollil , Vitor Engrácia Valentil , Luiz Carlos de Abreu. (2011). Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*. 36, (3) 182-82011.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.
- Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.
- Lopes ,J. Pedro et al, Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção (2008). *Acta Med Port*. 21(3):293-302
- Luu, C.szental, J.A. Yen Lee, Y.. Lavanya, R & Wong, T.W. (2010). Correlation between Retinal Oscillatory Potentials and Retinal Vascular Caliber in Type 2 Diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51 (1).
- Machado, Erlaine chaves et al. (2010). Correlações possíveis entre aprendizagem e estado nutricional: Modelagem do comportamento de pressão a barra em ratos Wistar com variadas dietas. V.2, n1, 341-346.*Anais II SIMPAC*.
- Mancuso, K., Neitz, M., & Neitz, J. (2006). An adaptation of the Cambridge Colour Test for use with primates. *Visual Neuroscience*, 34, 695-701.

- Marmor, m. F.; Fulton, a. B.; Holder, G. E.; Miyake, Y.;BrigelL, M.; Bach, M. (2009). Iscev Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol.* 118: 69-77.
- Martin, I.; Jones, MA.; Grotewiel, M.(2009). Manipulation of sod1 expression ubiquitously, but not in the nervous system or mescle, impacts age-related parameters in drosophila. *FEBS Lett.*, v.584, p.2308-2314.
- Menezes, EMS.Torres AT.Sabaa- Srur auo. (2008). Valor Nutricional da Polpa do Açaí (Eutrpe Oleracea, Mart) Liofilizada. *Acta Amazônia.* v 38. p 311-16.
- Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. (1996). Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest.*97 (12):2883-90.
- Mollon, J.D. & Refin, J.P. (1989). A computer –controlled colour vision test that combines the principles of chibret and stilling. *Journal of physiology.*5.414.
- Mollon, J.D.& Regan. J.P.(2000).Handbook of the Cambridge Colour Test. Ed: Cambridge Research Systems, London, UK.
- Negri G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes (2005). *Rev Bras Cienc Farm.*41(2):121-42.
- Oliveira, Edwirges, de Fátima de (2016). Efeito protetor da Euterpe Oleracea (Açaí) durante o desenvolvimento da retinopatia diabética em animais. *Iniciação Científica.* UFPA.
- Palata, Marcus . Dias, Alana Ferreira Gomes; Vieira, Marcio Fragoso; Rezende, (2010). Perfil epidemiológico e nível de conhecimento de pacientes diabéticos sobre diabetes e retinopatia diabética. *Arq Bras Oftalmol .*;73(5):414-8.
- Pan, M.H; Lai, C.S; Dunshenkov. S & HO. C.T. (2009). Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. *J Agric Food Chem.* vol 57, pg 4467- 4477.
- Parisi V, Uccioli L. (2001). Visual electrophysiological responses in persons with type 1 diabetes.

Diabetes Metab Res Rev.;17(1):12-8.

Park SH, Park JW, Park SJ, Kim KY, Chung JW, Chun MH, Oh SJ. (2003). Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia*.;46 (9):1260-8.

Park SH, Park JW, Park SJ, Kim KY, Chung JW, Chun MH, Oh SJ. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia*. 2003;46(9):1260-8.

Pérez, Vi.; Bokov, A.; Van Remmen, H.; Mele, J.; Ran, Q.; Ikeno, Y.; Richardson, A. (2009). Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim. Biophys. Acta*, v.1790, n.10, p.1005-1014.

Pokorny, J., Smith, V. C., Variest, G., & Pinkers, A.J.L.G (1979). Congenital and acquired color vision defects. Grune & Straton. New York.66.

Portinho, José Alexandre, Zimmermann, Livia Maria; Bruck, Mirian Rotnes. Beneficial. (2012). Effects Of Açaí. *International Journal of Nutrology*. V. 5. N. 1. p 15-20. jan|abril.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM, editors. *Neuroscience*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey Jr., G.C. AIN-93. (1993). Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *The Journal of Nutrition*, Philadelphia, v. 123, p.1939-1951.

Reis, Janice Sepúlveda, Veloso, Clara Araújo, Mattos, Rafael Teixeira, Purish, Saulo, Nogueira-Machado, José Augusto. (2008). Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52 (7), 1096-1105. <https://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302008000700005>

Ribeiro C, Oliveira CAM, Mello MAR (2007). Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos. *Motriz*.13(1):72-7.

- Ribeiro, Jc.; Antunes, Lm.; Aissa, A. F.; Darin, Jd.; De Rosso, Vv.; Mercadante, A.Z & Bianchi, Ml. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat. Res.*, v.695, n.1-2, p.22-28.
- Sabino, N. M. (2011). Estudo exploratório sobre os efeitos da constrição do crescimento cerebral pelo fechamento das suturas cranianas na aprendizagem discriminativa em ratos. Dissertação de mestrado. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo. 51 p.
- Santos, GM.; Maia. GA.; Sousa, PHM.; Costa, JMC.; Figueiredo, RW & Prado, G M. (2008). Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açai (*Euterpe oleracea* Mart). *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, v.58, n.2, p.187-192.
- Santos, Gerusa Matias dos et al. (2008). Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açai (*Euterpe oleracea* Mart). *Archivos latinoamericanos de nutricion*. Vol. 58 N° 2,
- Schauss, A. G.; Wu, X.; Prior, R. L. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart.(Acai). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 22, p. 8598–8603, 2006.
- Serrarbassa. P.D. Dias, A F G & Vieira, M F. (2008). Novos conceitos em retinopatia diabética: dano neurológico versus dano vascular. *Arq Bras Oftalmol*;71(3):459-63.
- Shauss, A.G Wu, X. Prior, R.L. Ou, B.,Wuang,D., Owens,J. Argawal, A., Jensen, G.S., Hart, A.N., Shanbrom.E. (2006). capacity and other bioactivities of the freeze- dried Amazonian Palm berry, *Euterpe Oleracea* Mart. (Açai). *J Agric Food Chem*. Vol 54, pag 8598-8603.
- Slatter, D. (2008). *Fundamentals of Veterinary Ophthalmology* (4th ed). Philadelphia: Saunders Elsevier.

- Sociedade brasileira de diabetes.(2015). Diretrizes da Sociedade brasileira de Diabetes: Jardim londrina, SP: Ac Farmaceutica, 2015.
- Spada PDS, Dani C, Bortolini GV, Funchal C, Henriques JAP, Salvador M. (2009). Frozen fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (acai) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rats. *J Med Food*;12:1084-8.
- Spada, PDS, Souza GGN, Bortolini, GV, Henriques JAP & Salvador M. (2008). Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. *J Med Food*;11:144–51.
- Stanford MR. (2004). The pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 88(4):444-5.
- Sun, Xiaoping et al. (2010). Açai palm fruit (*Euterpe oleracea*) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Experimental Gerontology* 45 243–251. doi:10.1016/j.exger.2010.01.008
- Sun, Xiaoping; Jeanne Seeberger; Thomas Alberico; Chunxu Wang; Charles T Wheeler; Alexander G Schauss & Sige Zou. (2010). Açai Palm Fruit (*Euterpe Oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. *Experimental Gerontology.* 45, 243-251..doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.008>
- Szél, Á., Vigh, B., Van Veen, T., Rohlich. P. (2000) Development of cone distribution patterns in mammals. In: development and organization of the retina. L. M. Chalupa & I. Finlay (eds.), New York: Plenum press. P 43 – 59.
- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46
- Tonkiss, J; Stephens, D. N. Rats undernourished as infants differ from controls in learning about a compound but not a simple discriminative stimulus. *Physiology & Behavior, Oxford,* v. 26, p. 803-808, 1981.

- Tonon, RV.; Brabet, C.; Hubinger, MD. (2009). Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*29, n.2, p.444-450.
- Udani, JK.; Singh, BB.; Singh, VJ.; Barrett, ML. (2011). Effects of açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters en a healthy overweight population: a pilot study. *Nutrition Journal*.
- Villeneuve, LM. & Natarajan, R. (2010). The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. *American Journal of Physiology*. 299: 14-25.
- Villeneuve, LM. & Natarajan,R. (2005). The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications.
- World Health Organization. (2009). Diabetes: diabetes facts. Fact sheet N° 312. 2008. November. Disponível em: [http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/) index.html
- Zanoello AM, Mazzanti CM, Gindri JK, Filappi A, Prestes D, Cecim M (2002). Efeito Protetor do *Syzygium cumini* contra Diabetes mellitus induzido por Aloxano em Ratos. *Acta Farm Bonaer.*21(1):31-6.
- Zimmerman, R. R.(1975). Behavioral deficiencies in protein-deprived monkeys In: *Nutrition and Mental Functions*. New York: George Serbian, , p. 33-61.

ANEXO I

FOLHA DE REGISTRO
TREINO CRF

Sujeito: _____

Data: _____

20 MINUTOS DE SESSÃO

Minutos	RPB's acumuladas	Outras classes de respostas
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		

20		
----	--	--

ANEXO II

FOLHA DE REGISTRO
TREINO DISCRIMINATIVO EM CRF 2ª variação

Sujeito: _____

Data: _____

Cada componente dura 30 seg: 20 COMPONENTES CRF E 10 EXT

Minutos	RPB's acumuladas	Outras classes de respostas
CRF		
EXT		
CRF		
CRF		
CRF		
EXT		
CRF		
EXT		
CRF		
CRF		
CRF		
EXT		
CRF		
EXT		
CRF		
CRF		
EXT		
CRF		
CRF		
EXT		
CRF		

EXT		
EXT		
CRF		
CRF		
CRF		
CRF		
EXT		
CRF		
CRF		
EXT		
CRF		
CRF		

ANEXO III

**FOLHA DE REGISTRO
TREINO DISCRIMINATIVO CLARO / ESCURO RAZÃO VARIÁVEL
VR2**

Sujeito: _____

Data: _____

Cada componente dura 30 seg: 20 COMPONENTES REFORÇO EM VR E 10 EXT

componentes	RPB's acumuladas	Outras classes de respostas
R2		
EXT		
R1		
EXT		
R 1		
R 2		
EXT		
R2		
R1		
R 2		
EXT		
EXT		
R2		
R1		
R 3		
EXT		
R2		
R 3		

<i>EXT</i>		
R2		
R3		
R1		
EXT		
R2		
R 3		
R3		
EXT		
EXT		
R3		
R 1		