

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS
AO DIABETES: EVIDÊNCIAS A PARTIR DE UM MODELO ANIMAL E DE UMA
AMOSTRA CLÍNICA**

LUCIANE BISOGNIN CERETTA

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2011

LUCIANE BISOGNIN CERETTA

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS ASSOCIADAS
AO DIABETES: EVIDÊNCIAS A PARTIR DE UM MODELO ANIMAL E DE UMA
AMOSTRA CLÍNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo
Sul Catarinense, para obtenção do título de Doutor
em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Quevedo

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2011

CATALOGAÇÃO

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C414a Ceretta, Luciane Bisognin.

Alterações comportamentais e neuroquímicas associadas
ao diabetes : evidências a partir de um modelo animal e de
uma amostra clínica / Luciane Bisognin Ceretta ; orientador :
João Quevedo. – Criciúma : Ed. do Autor, 2011.

195 f. : il.; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Criciúma (SC), 2011.

1. Diabetes mellitus. 2. Metabolismo energético.
3. Estresse oxidativo. 4. Fator neurotrófico derivado do
encéfalo. 5. Transtornos do humor. I. Título.

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101 -

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

*Ao meu pai (sempre presente) por todo amor, ensinamentos e
dedicação. Meu grande presente da vida foi ter sido tua filha!
Obrigada pai, minha grande referência de lealdade, honestidade e
simplicidade. Sua ausência física se faz muito sentida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente na minha vida, que sempre me abriu muitas portas e proporcionou tudo isso.

Ao professor João Quevedo, por sua paciência, pelo exemplo de persistência, coerência e dignidade. Orientador que compartilhou seu saber e permitiu que na nossa convivência o admirasse mais e mais pelos seus valores éticos, sua firmeza de caráter e sua capacidade como cientista e professor. És uma referência importante em minha vida.

A Gislaine Zilli Réus, querida colega do Neurolab, pela paciência com que soube lidar com minhas deficiências, falta de tempo, dificuldades de dedicar-me inteiramente ao trabalho. Esse resultado é nosso.

Ao Luciano Jornada, pela preciosa colaboração na análise dos dados, a quem agradeço sobretudo, a premiação de parte deste trabalho no Congresso Brasileiro de Psiquiatria de 2011. Muito Obrigado!

Aos professores avaliadores Maria Inês (obrigada pelas preciosas colaborações enquanto revisora deste trabalho), Roger, Gustavo e Fabrícia pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

Ao Emílio, coordenador do PPGCS por aliviar um pouco da minha Angústia com os prazos e por sempre me ouvir e opinar quando necessito.

Aos colegas do Curso de Enfermagem pela parceria sempre presente sobretudo na elaboração deste trabalho.

Ao Renan meu esposo e a Vitória minha filha, amores da minha vida. Obrigada pelo apoio incondicional e pela forma maravilhosa de compartilharmos a vida. Vocês são meu grande motivo para seguir em frente todos os dias.

A minha mãe amada pela sua preocupação, dedicação e crença nas nossas possibilidades.

Ao meu irmão Gustavo, pela grande parceria. Tua presença torna minha vida mais alegre.

As minhas tias Vane, Leni, Bene e Vilma pela torcida, apoio e incentivo. Meu amor pela vida acadêmica nasceu a partir dos exemplos que tive de vocês.

A Universidade do Extremo Sul Catarinense pela motivação aos seus docentes em continuarem sua trajetória acadêmica pautados na busca permanente do conhecimento e no aperfeiçoamento técnico científico.

A Secretaria Municipal de Saúde de Criciúma pela liberação do tempo necessário para cursar o doutorado.

Ao meu pai amado. Tua ausência se fez muito presente nesse processo. Perder a possibilidade de sentar contigo e conversar me causaram profunda dor, difícil de superar. Devo a ti o que sou e o que construo.

As pessoas que participaram deste estudo, diabéticos e não diabéticos, pela forma acolhedora e interessada com que receberam a pesquisa e aceitaram participar dela.

Aos bolsistas do Neurolab pela preciosa colaboração no desenvolvimento dos experimentos.

"Se eu pudesse deixar algum presente a vocês...

Deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.

Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.

Deixaria a capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para vocês se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo,

a resposta e a força para encontrar a saída."

Gandhi

RESUMO

Muitos estudos têm destacado uma relação entre diabetes e transtornos do humor. Além de alterações no metabolismo energético, estresse oxidativo e neurotrofinas. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar essas alterações em um modelo animal de diabetes e em pacientes com diabetes do tipo 2. Para isso o estudo foi dividido em 3 etapas. A primeira teve como objetivo avaliar a prevalência de transtornos do humor, risco de suicídio e a qualidade de vida de pacientes com diabetes do tipo 2. Os resultados mostraram que pacientes com diabetes tiveram uma maior prevalência de transtornos do humor, maior risco de suicídio e uma pior qualidade de vida, quando comparado a pessoas não diabéticas. A segunda parte do estudo avaliou parâmetros de memória, metabolismo energético e de estresse oxidativo em cérebro de ratos Wistar submetidos a um modelo animal de diabetes induzido por aloxano. Os resultados mostraram que esses animais não tiveram alterações na memória de reconhecimento, porém tiveram alterações na atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, creatina quinase e citrato sintase. Além de um aumento na peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, e alterações nas enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Já a terceira parte do estudo investigou os efeitos da imipramina, um antidepressivo tricíclico, no modelo animal de diabetes. Os ratos com diabetes tiveram comportamento do tipo depressivo no teste do nado forçado, e a imipramina reverteu este efeito. Além disso, a imipramina aumentou os níveis do fator neurotrófico-derivado do cérebro (BDNF) no córtex pré-frontal. Concluindo, os dados encontrados no presente estudo mostraram alterações do humor a partir de uma amostra clínica e alterações comportamentais e neuroquímicas em um modelo animal de diabetes.

Palavras chaves: Metabolismo Energético; Estresse Oxidativo; Fator Neurotrófico-Derivado do Cérebro; Transtornos Psiquiátricos; Diabetes.

ABSTRACT

Many studies have highlighted a link between diabetes and mood disorders. Also, changes in energy metabolism, oxidative stress and neurotrophins. The objective of this study was to evaluate these changes in an animal model of diabetes and in patients with type 2 diabetes. For this, the study was divided in three parts. The first was to evaluate the prevalence of mood disorders, suicide risk and quality of life in patients with type 2 diabetes. The results showed that patients with diabetes had a higher prevalence of mood disorders, increased risk of suicide and poorer quality of life, when compared to non-diabetics. The second part of the study evaluated memory, energy metabolism and oxidative stress parameters in brain of Wistar rats subjected to an animal model of diabetes induced by alloxan. The results showed that these animals had no changes in recognition memory, however there were changes in the mitochondrial respiratory chain complexes, creatine kinase and citrate synthase activities. Still, there was an increase in lipid peroxidation, protein carbonylation, and changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The third part of the study investigated the effects of imipramine, a tricyclic antidepressant, in an animal model of diabetes. Rats with diabetes had depressive-like in the forced swimming test, and imipramine reversed this effect. In addition, imipramine increased the levels of brain derived-neurotrophic factor (BDNF) in prefrontal cortex. Finally, our findings showed alterations on mood disorder in humans with type 2 diabetes. In addition, the animal model of diabetes induced by alloxan led to behavioral and neurochemical changes related with diabetes.

Keywords: Energy Metabolism; Oxidative Stress; Brain Derived-Neurotrophic Factor; Psychiatric Disorders; Diabetes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Cadeia respiratória mitocondrial	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT - Antidepressivo tricíclico.

ATP – Trifosfato de Adenosina.

BDNF – Fator Neurotrófico-derivado do Cérebro (sigla do inglês).

CAT - Catalase.

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio.

DM - Diabetes Melitus.

GDNF - Fator Neurotrófico-Derivado da Glia (sigla do inglês).

IMAO - Inibidor de Monoamina Oxidase.

ISRS - Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina.

LDL - Lipoproteína de Baixa Intensidade.

NGF - Fator Neurotrófico Neural.

NT - Neurotrofina.

OMS - Organização Mundial da Saúde.

QV - Qualidade de Vida.

RNS - Espécies Reativas ao Nitrogênio (sigla do inglês).

SDH - Succinato Desidrogenase.

SNC – Sistema Nervoso Central.

SOD - Superóxido Dismutase.

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

SUMÁRIO

PARTE I.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Diabetes.....	15
1.2 Classificação do Diabetes Melittus.....	17
1.3 Diagnóstico do Diabetes Méliittus.....	21
1.3.1 Hemoglobina Glicada.....	22
1.4 Tratamento do Diabetes Melittus.....	23
1.4.1 A Insulina no tratamento do diabetes.....	24
1.5 Diabetes e Alterações Comportamentais.....	25
1.6 Diabetes e Qualidade de Vida.....	34
1.7 Diabetes e alterações neuroquímicas.....	39
1.7.1 Metabolismo Energético.....	39
1.7.2 Estresse Oxidativo.....	43
1.7.3 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro.....	45
1.8 Modelo Animal de Diabetes induzido por aloxano.....	48
2 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA DE PESQUISA.....	51
3 OBJETIVOS.....	53
Etapa I.....	53
3.1 Objetivo Geral.....	53
3.2 Objetivos Específicos.....	53
Etapa II.....	54
3.1 Objetivo Geral.....	54

3.2 Objetivos Específicos.....	54
Etapa III	55
3.1 Objetivo Geral.....	55
3.2 Objetivos Específicos.....	55
Etapa IV	56
3.1 Objetivo Geral.....	56
3.2 Objetivos Específicos.....	56
PARTE II.....	57
4 ARTIGO I.....	57
5 ARTIGO II	81
6 ARTIGO III	103
7 ARTIGO IV.....	129
PARTE III.....	155
8 DISCUSSÃO.....	155
9 REFERÊNCIAS	164

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes

O Diabetes Mellitus (DM) é uma das principais síndromes de evolução crônica que acomete a população nos dias atuais. A sua prevalência vem crescendo significativamente com o processo de industrialização e urbanização populacional dos últimos anos. Atualmente, esta doença representa um importante problema de saúde pública com alta morbidade, mortalidade e repercussões econômicas significativas (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009), sendo uma das doenças crônicas mais onerosas para os sistemas de saúde (American Diabetes Association, 2007).

O DM é um grupo heterogêneo de distúrbios envolvendo todos os substratos energéticos (carboidratos, proteínas e gorduras), sendo caracterizado principalmente pela hiperglicemia, resultante da deficiência de secreção ou da ação da insulina. (American Diabetes Association, 2007; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009). Esta doença ocorre, frequentemente, acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial afetando, atualmente, 8% da população adulta, com aumento da incidência para mais de 20% em pessoas com mais de 65 anos de idade (Felig & Frohman, 2001). Trata-se de uma doença com critérios diagnósticos bem definidos, porém de manejo complexo, devido a abordagem terapêutica

medicamentosa associada à mudança de hábitos de vida dos pacientes (Assunção, Santos & Costa , 2002).

Em 1985, estimava-se haver 30 milhões de adultos com esta doença no mundo, esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002, com projeção de chegar a 366 milhões em 2030. Cerca de dois terços desses indivíduos com DM vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens. Estes dados permitem referir que uma epidemia de DM está em curso. (Wills, 2002).

No Brasil, em 2000, havia aproximadamente 4,5 milhões de indivíduos portadores de DM (World Health Organization, 2010), dos quais 50% desconheciam seu diagnóstico (International Diabetes Federation, 2006), com previsão de que em 2030 essa doença atinja 11 milhões de portadores da doença (World Health Organization, 2010).

Frequentemente, na declaração de óbito não se menciona o DM pelo fato de serem suas complicações, particularmente as cardiovasculares e cerebrovasculares, as causa da morte. No início do século XXI, estimou-se que se atribuíram 5,2% de todos os óbitos no mundo ao diabetes, o que torna essa doença a quinta principal causa de morte. Parcela importante desses é prematura, ocorrendo quando ainda os indivíduos contribuem economicamente para a sociedade (Roglic et al., 2000).

O Diabetes é o principal fator de risco para cardiopatias e doenças cerebrovasculares e, geralmente, ocorre associada à Hipertensão Arterial. (King, Aubert & Herman, 1998; Globalnews International Diabetes Federation, 2006).

Dados brasileiros de 2006 mostram que as taxas de mortalidade por DM (por 1000 mil habitantes) apresentam acentuado aumento com o progredir da idade, variando de 0,46 para a faixa etária de 0 a 29 anos de idade a 223,3 para a de 60 anos ou mais, ou seja, um gradiente próximo a 400 vezes (Brasil, 2010).

Existem evidências de que pessoas com o diabetes não tratado ou mal controlado desenvolvam mais complicações do que aquelas com diabetes bem controlado (Oliveira e Milech, 2004). A prevalência do diabetes, as projeções para o futuro e os fatores associados ao seu crescimento levam a uma justificada necessidade de estudar o tema quer seja nos aspectos epidemiológicos, fisiopatológicos, de diagnóstico precoce ou de tratamento.

1.2 Classificação do Diabetes Mellitus

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo do tratamento. Deste modo, os termos DM insulino dependente não devem mais ser utilizados (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

A classificação moderna do DM continua se desenvolvendo com o aumento do conhecimento sobre a epidemiologia, patofisiologia e genética. A Sociedade Brasileira de Diabetes, em suas últimas diretrizes (2009), baseada nas classificações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Associação Americana de Diabetes, assim o Caderno de Atenção Básica N.16 do Ministério da Saúde recomenda a classificação do DM em:

- DM tipo 1: caracterizada pela deficiência absoluta de insulina, resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas, tem tendência à cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença auto-imune e aqueles nos quais a

causa da destruição das células beta não é conhecida (causa idiopática). Corresponde de 5% a 10% do total de casos. A forma rapidamente progressiva é comumente observada em crianças e adolescentes, porém pode ocorrer também em adultos. A forma lentamente progressiva ocorre geralmente em adultos e é referida como diabetes latente auto-imune do adulto (LADA – Latent autoimmune diabetes in adults).

- DM do tipo 2: resultante, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como durante infecções graves. O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito a partir dos 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo, mais raramente em adolescentes. Abrange 90% a 95% do total de casos;

- DM gestacional: caracterizado pela diminuição da tolerância à glicose, de magnitude variável, diagnosticada pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir após o parto. Abrange os casos de DM e de tolerância à glicose diminuída detectados na gravidez.

- Outros tipos de DM: pertencem a essa classificação formas menos comuns de DM cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados, como: defeitos genéticos funcionais da célula beta; defeitos genéticos na ação da insulina; doenças do pâncreas exócrino; endocrinopatias; DM induzido por fármacos ou agentes químicos; infecções; formas incomuns de diabetes imunomediado; outras síndromes genéticas geralmente associadas ao diabetes.

Pré-Diabetes:

A hiperglicemia no DM tipo 2 geralmente se desenvolve de forma gradual, não sendo suficiente nos estágios iniciais para promover o aparecimento dos sintomas clássicos, podendo o paciente permanecer com a doença sem diagnóstico por vários anos, tendo como consequência o desenvolvimento de uma complicação que muitas vezes é detectada no momento do diagnóstico do DM tipo 2. A causa deste desenvolvimento gradual é a evolução da doença que se inicia com uma leve resistência à ação da insulina podendo culminar com a deficiência na produção de insulina (Oliveira e Milech , 2004).

O processo fisiopatológico do DM tipo 2, decorrente de uma condição genética, caracterizada pela resistência insulínica, em que o nível de insulina é normal, mas não é eficaz em sua função de promover a utilização periférica da glicose (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009). Uma segunda condição genética é a insuficiência insulínica, situação na qual existe efetivamente uma redução de sua secreção pelo pâncreas e que, geralmente, ocorre depois de alguns anos de evolução da doença (Pedrosa et al., 2006).

As pessoas com esta forma do DM não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, porém podem necessitar de tratamento com insulina para a obtenção de um controle metabólico adequado (American Diabetes Association, 2008; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

O estágio intermediário entre a homeostase normal da glicose e o DM é chamado pré-diabetes, e pode ser dividido em duas categorias: glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. A glicemia de jejum alterada refere-se às concentrações de glicemia de jejum que são inferiores ao critério diagnóstico para o DM, porém mais elevadas que o valor de referência normal. A tolerância à glicose

diminuída representa uma anormalidade da regulação da glicose no estado pós-sobrecarga, que é diagnosticada através do teste oral de tolerância a glicose (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

A evolução para o DM ocorre ao longo de um período de tempo variável, passando pelos estágios intermediários: glicemia de jejum alterada (evidências precoces de disfunção de célula beta) e tolerância à glicose diminuída (na presença de glicemia de jejum normal, representariam quadro de resistência insulínica). Na presença de ambos os estágios, haveria um quadro misto, com maior risco para progressão para diabetes e doença cardiovascular. Qualquer dos estágios, pré-clínicos ou clínicos, pode caminhar em ambas as direções, progredindo para o estado diabético ou revertendo para a normalidade da tolerância à glicose (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

Independentemente do tipo de diabetes, uma das maiores preocupações dos profissionais de saúde é a prevenção de complicações, devido a sua gravidade e repercussões para o paciente, família e sociedade.

As complicações do DM são classificadas em agudas e crônicas. Entre as complicações agudas encontram-se a cetoacidose diabética e o coma hiperosmolar não cetótico, complicações estas de fácil manejo clínico, mas que podem ter consequências sérias se não tratadas a tempo (Pedrosa et al., 2006).

As complicações crônicas do DM incluem as alterações macrovasculares, microvasculares e as neuropatias (Sacco et al., 2007).

As complicações macrovasculares manifestam-se, principalmente, nas artérias coronarianas, cerebrais e periféricas de extremidades inferiores, tendo prognóstico agravado pelo fato de a aterosclerose desenvolver-se em idade precoce

nos portadores de DM (Pedrosa et al., 2006). Os portadores de DM tipo 2 apresentam maior risco de desenvolvimento de complicações cardiovasculares (40%) e de morrerem por estas complicações do que os não diabéticos (Bianchi, 2008; Howard et al., 2006).

As complicações microvasculares resultam de alterações dos níveis glicêmicos, que provocam um espessamento da membrana basal dos capilares, e estão relacionadas a retinopatia, nefropatia e neuropatia (De Luccia, 2003).

1.3 Diagnóstico do Diabetes Mellitus

Os critérios diagnósticos estão baseados nas recomendações das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2009) e incluem valores de glicemia de jejum medidos no soro ou plasma.

Os critérios aceitos para o diagnóstico do DM são três:

- 1) sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual acima de 200 mg/dL (realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição);
- 2) glicemia de jejum ≥ 126 (em caso de pequenas elevações da glicemia o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do testes em outro dia;
- 3) glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose acima de 200 mg/dL. O grupo de indivíduos que apresentam valores de glicemia acima do normal, mas abaixo dos valores determinados para o diagnóstico de DM, são incluídos nas categorias de glicemia de jejum alterada (glicemia entre 100 mg/dL e 126 mg/dL) e tolerância à glicose diminuída (após o teste de sobrecarga de 75 g de glicose, o

valor de 2 horas encontra-se entre 140 mg/dL e 199 mg/dL) (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

1.3.1 Hemoglobina Glicada

A hemoglobina glicada (termo bioquimicamente correto), também conhecida como hemoglobina glicosilada, glicohemoglobina ou HbA1c, refere-se a um conjunto de substâncias formadas em reações entre a hemoglobina normal do adulto (HbA) e alguns açúcares (Grupo Interdisciplinar de padronização da hemoglobina glicada, 2007 ; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

Os níveis de HbA1c refletem a glicemia média de um indivíduo durante os dois ou três meses anteriores à data de realização do teste, tendo assim grande utilidade na avaliação do nível de controle glicêmico e da eficácia do tratamento vigente (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009). Dependendo do método laboratorial utilizado para análise, os valores de hemoglobina podem variar de 3% a 6% da HbA total em pessoas normais até 20% ou mais em diabéticos mal controlados. O exame de hemoglobina glicada foi definido como padrão ouro na monitorização do tratamento hipoglicemiante e pela relação direta comprovada entre a glicemia média do paciente e o surgimento de complicações crônicas da doença, mas não é um exame adequado para o diagnóstico do diabetes (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

Os testes de HbA1c devem ser realizados pelo menos duas vezes ao ano para todos os pacientes diabéticos e quatro vezes por ano (a cada três meses) para pacientes que se submeterem a alterações do esquema terapêutico ou que não

estejam atingindo os objetivos recomendados com o tratamento vigente (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

Os níveis recomendados de HbA1c são inferiores a 7%, segundo a American Diabetes Association (2008), pois valores superiores a este estão associados a um risco progressivamente maior de complicações crônicas, como retinopatia, nefropatia e neuropatia.

Em 2009, a Sociedade Brasileira de Diabetes adotou em suas novas diretrizes para o controle glicêmico do diabetes tipo 2 a meta de HbA1c < 6,5%, em concordância com as recomendações da União Européia, da Federação Internacional de Diabetes e da American Association of Clinical Endocrinologists (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

1.4 Tratamento do Diabetes Melitus

O tratamento do DM inclui as seguintes estratégias: educação; modificações do estilo de vida, que incluem suspensão do fumo, aumento da atividade física e reorganização dos hábitos alimentares; e, uso de medicamentos (Fauci et al., 1998). Desse modo, compreende-se que o tratamento para o diabetes pode ser não medicamentoso e medicamentoso. O tratamento medicamentoso pode ser efetuado por meio de antidiabéticos orais e também da insulina.

Os medicamentos antidiabéticos devem ser empregados quando não se tiver atingido os níveis glicêmicos desejáveis após o uso das medidas dietéticas e do exercício. A natureza progressiva do DM, caracterizada pela piora gradual da glicemia de jejum ao longo do tempo, faz com que haja necessidade de aumentar a dose dos medicamentos e acrescentar outros no curso da doença. A combinação de

agentes com diferentes mecanismos de ação é comprovadamente útil. O arsenal utilizado com a finalidade de diminuir a hiperglicemia inclui diversos medicamentos com vários mecanismos de ação diferentes (Felig e Frofman, 2001)

De modo geral e de acordo com o mecanismo de ação principal, pode-se subdividir os antidiabéticos orais em aqueles que incrementam a secreção pancreática de insulina (sulfoniluréias e glinidas); os que reduzem a velocidade de absorção dos glicídios (inibidores das alfa-glicosidases); os que diminuem a produção hepática de glicose (biguanidas); e/ou os que aumentam a utilização periférica de glicose (glitazonas).

1.4.1 A Insulina no tratamento do diabetes

A insulina é um hormônio sintetizado nas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. A parte endócrina do pâncreas (2% da massa total do órgão) é formada por 500.000 a um milhão de ilhotas de Langerhans, dentro das quais, as células-beta constituem 60-80% do todo (Felig e Frohman, 2001). As células β das ilhotas pancreáticas sintetizam insulina a partir de um precursor de 110 aminoácidos de cadeia simples, denominado pré-pro-insulina.

A insulina é a mais efetiva medicação hipoglicemiante conhecida e pode reduzir a HbA1c aos níveis de controle desejáveis a partir de quaisquer níveis de HbA1c iniciais. Não existem doses máximas acima das quais seu efeito terapêutico não ocorra, nem contra indicações ao seu uso (Nathan et al., 2006).

A ação da insulina é essencial para regular a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose,

principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica (Carvalho, Zecchin & Saad, 2002).

Os tecidos-alvo importantes para a regulação da homeostasia da glicose pela insulina são o fígado, o músculo e o tecido adiposo, mas ela também exerce potentes efeitos reguladores sobre outros tipos celulares, sendo o principal hormônio responsável pelo controle de captação, da utilização e do armazenamento dos nutrientes celulares. As ações anabólicas da insulina incluem estimulação da utilização e do armazenamento intracelular de glicose, aminoácidos e ácidos graxos, enquanto inibe processos catabólicos como a degradação de glicogênio, lipídios e proteínas. A insulina exerce essas funções gerais ao estimular o transporte de substratos e íons para dentro das células, ao promover a translocação de proteínas entre compartimentos celulares, ao ativar e inativar enzimas específicas e ao modificar as quantidades de proteínas, alterando a taxa de transcrição gênica e de tradução de mRNA específico (Davis & Granner, 2003).

Recomenda-se que a terapêutica com insulina seja iniciada quando, a despeito de doses máximas de duas drogas orais utilizadas por alguns meses, o paciente mantiver níveis de HbA1c maiores que 7% (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

1.5 Diabetes e Alterações Comportamentais

O DM dos tipos 1 e 2 são estados hiperglicêmicos e hipoinsulinêmicos crônicos que podem modificar funções do Sistema Nervoso Central (SNC) (Bellusch et al., 1991; Lustamn et al., 1992). Em pacientes diabéticos, situações extremas de

hiperglicemia ou hipoglicemia são geralmente acompanhadas de perda da consciência, convulsão e coma (Wilson et al., 1998). O impacto do DM no SNC tem sido estudado mais intensamente na última década do século passado, a partir de estudos de Mccall (1992) que descreve a encefalopatia diabética (Biessels et al., 2002). Além das bem conhecidas consequências, como o aumento do risco de acidente vascular pela aterosclerose, o diabete é associado a déficits cognitivos e alterações estruturais e neurofisiológicas no cérebro (Biessels et al., 2002). Manifestações Psiquiátricas parecem acompanhar esta encefalopatia, uma vez que a prevalência da depressão é de 39% nos diabéticos, o que é 2 a 3 vezes mais elevado que na população não diabética (Téllez-zenteno & Cardiel, 2002).

A hipoglicemia aguda, resultante da administração de doses elevadas de agentes hipoglicemiantes, está relacionada com o aumento da liberação de aminoácidos excitatórios, como o glutamato que, associado a pouca disponibilidade de adenosina trifosfato (ATP) e consequente redução da recaptção desse neurotransmissor para as células gliais, pode produzir dano neuronal irreversível, uma vez que esse aminoácido é citotóxico (Cox & Henneberry, 1989).

Pesquisas sobre transtornos mentais concomitantes às doenças orgânicas crônicas, em particular o DM, têm indicado presença de depressão, ansiedade e abuso de substâncias (álcool e sedativos) nestes pacientes (Wells, Golding & Burnam, 2009).

Algumas pesquisas indicam maior prevalência de transtornos de humor e ansiedade nos diabéticos, outros não apontam o diabetes como fator de risco maior do que o encontrado em outras doenças crônicas (Thomas et al., 2003). Entretanto,

a maioria dos estudos focaliza a depressão e sua relação com o diabetes (Rubin & Peyrot, 2001).

A presença de transtornos psiquiátricos no DM poderia ser um dos fatores que dificultaria o controle metabólico e facilitaria a evolução da doença. Além disso, a presença de uma síndrome depressiva e de sintomas alimentares parece influenciar negativamente o controle metabólico da doença. Parece importante investigar a presença de um transtorno psiquiátrico em pacientes com diabetes, sobretudo naqueles que não conseguem um controle metabólico satisfatório. Pesquisadores tem demonstrado que estas complicações reduzem a qualidade de vida dos pacientes e aumentam a utilização dos serviços de saúde (Fincke et al., 2005; UKPDS, 1999). Outras evidências tem apontado associação entre transtornos psiquiátricos e diabetes, sobretudo alcoolismo, ansiedade e depressão, sendo que a elevada prevalência de transtornos psiquiátricos em pacientes diabéticos já vem sendo descrita há pelo menos um século e pode influenciar o curso desta doença (Clavijo et al., 2006).

Há evidência de que os pacientes com DM apresentam uma maior prevalência de fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos porém há escassez de estudos em nosso meio. Além disso, o conhecimento da prevalência destes fatores é essencial para o bom manejo clínico dos pacientes, pois a maior parte dos componentes da síndrome pode ser tratada por meio de medidas comportamentais e/ou intervenções farmacológicas.

Clavijo et al. (2006) desenvolveram estudos para verificar a frequência de transtornos psiquiátricos em pacientes diabéticos tipo 2, comparado a um grupo de não-diabéticos e evidenciaram que a frequência de risco de suicídio e episódio

hipomaníaco passado foi significativamente maior entre diabéticos do que entre os não-diabéticos na área estudada. Os achados de frequência de transtornos psiquiátricos foram altos em ambos os grupos, sendo que no dos diabéticos predominaram os diagnósticos de depressão e ansiedade.

Rocha & Bezerra (2006) comentam que a relação entre transtornos psiquiátricos e comorbidades como obesidade, dislipidemia e diabetes tem cada vez mais sido avaliada no contexto da síndrome metabólica.

Lutsman (1992) vem pesquisando há 16 anos a relação entre os transtornos psiquiátricos e o diabetes, e refere que a pessoa com diabetes pode desenvolver praticamente qualquer transtorno psiquiátrico, sendo que os mais comuns são a ansiedade e a depressão.

Estudos encontraram evidências de associação entre transtornos do humor e diabetes. Pacientes com transtorno afetivo bipolar são mais obesos que a população em geral, com estudos mostrando um consumo maior de alimentos ricos em açúcares e carboidratos e reduzida prática de atividade física. No entanto também não há evidências de que a obesidade possa elevar o risco para o desenvolvimento desse transtorno (Teixeira, Moreira & Rocha, 2005).

Outro ponto importante é que a ligação fisiopatológica comum entre obesidade, diabetes e transtornos do humor pode ser a hipercolesterolemia. Ela é observada tanto em pacientes com diabetes quanto naqueles com transtornos bipolar e unipolar (Talbot & Nowen, 2000).

A Hipercolesterolemia leva a obesidade visceral que é observada em pacientes com depressão grave, e esta leva ao aumento da resistência à insulina e ao DM do tipo 2 (Parker et al., 2003, Talbot & Nowen, 2000).

Pacientes com diabetes necessitam modificar hábitos alimentares e aderir a esquemas terapêuticos restritivos, tais como aplicações regulares de insulina e monitorização glicêmica diária. Além disso, estes pacientes devem lidar com o fato de ter que conviver durante toda a vida com uma doença que é responsável por complicações clínicas que prejudicam a saúde do indivíduo. Todas essas variáveis poderiam repercutir no estado de humor dos pacientes diabéticos (Moreira et al., 2003), o que favorece a instalação de estados ansiosos, situações estressantes e estados de depressão. Tais situações são facilmente evidenciadas na prática clínica no atendimento a pacientes diabéticos.

A maioria dos estudos focaliza a depressão e sua relação com o diabetes, não sendo investigado com a mesma importância esta relação com outros transtornos mentais (Rubin, 2001).

Abrahamian et al (2009) comenta que a depressão é comum em pacientes com DM e tem um impacto negativo sobre o auto-cuidado e a adesão ao tratamento, sendo predisponente para o desenvolvimento de complicações. O tratamento eficaz da depressão tem sido associada com a melhoria nos parâmetros metabólicos. A depressão parece elevar o risco de desenvolver DM do tipo 2 enquanto o tipo 1 pode estar biológica e/ou psicologicamente ligado à etiopatogenia da depressão (Parker, et al. 2003).

Krabe et al (2006) relatam que o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) se apresentou diminuído em pacientes diabéticos o que pode ser um fator predisponente para a depressão e que os níveis do BDNF em mulheres apresentou-se mais elevado que em homens.

Boulanger (2009) em estudo para avaliar o impacto social e econômico do diabetes associado à depressão concluiu que estes são elevados devido à elevada incidência de hospitalizações destes pacientes diabéticos que apresentam comorbidades como a depressão. Lin et al (2009) comentam que pacientes diabéticos que apresentam comorbidades psiquiátricas como a depressão apresentaram maior taxa de mortalidade.

Além disso, resultados controversos têm correlacionado a resistência à insulina como fator de proteção para o desenvolvimento da depressão (id Ibid).

Na última década, passou-se a estudar a depressão como um dos fatores etiológicos do diabetes (Rubin e Peyrot, 2002) e alguns estudos evidenciaram que a depressão prediz a ocorrência posterior de diabetes (Eaton et al., 1996; Kawakami et al., 1999).

Mais especificamente, sintomas depressivos poderiam prejudicar a adesão ao tratamento, piorar o controle metabólico e aumentar o risco de complicações do DM. A depressão apresenta alterações neuroquímicas e hormonais que teriam efeitos hiperglicemiantes e poderiam acarretar distúrbios no metabolismo glicêmico. Em contrapartida, o DM tem efeitos neuroquímicos sobre os sistemas centrais serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos, levando a uma diminuição da função monoaminérgica, à semelhança do que ocorre na depressão (Leedom, 2001). A sobreposição de alterações fisiopatológicas de ambas as condições poderia explicar a ocorrência frequente de sintomas depressivos em pacientes diabéticos.

Em uma metanálise recente, avaliando estudos que utilizaram grupos-controle normais, a prevalência de depressão em pacientes diabéticos foi de 11% a 31%,

enquanto que a presença de diabetes aumentou em duas vezes o risco de depressão em relação aos grupos controle, independentemente se fosse do tipo 1 ou 2 (Anderson et al., 2001). Pacientes com depressão também têm maior risco de desenvolver diabetes tipo 2 (Eaton et al., 1996).

A presença de depressão também amplifica a percepção dos sintomas do diabetes, ou seja, pacientes diabéticos deprimidos sentem mais sintomas do que os não-deprimidos, mesmo com a gravidade do diabetes controlada (Ciechanowski et al., 2002). Finalmente, pacientes com comorbidade depressão e diabetes apresentam pior controle glicêmico e maior prevalência de complicações múltiplas do diabetes, como retinopatia, nefropatia, neuropatia, disfunção sexual e complicações macrovasculares (de Groot et al., 2001).

A depressão é também uma doença crônica grave que está associada com mais incapacidade funcional do que muitas outras doenças crônicas.

A depressão é uma síndrome psiquiátrica altamente prevalente na população em geral; estima-se que acometa 3% a 5% desta. Já em populações clínicas, a incidência é ainda maior, uma vez que a depressão é encontrada em 5% a 10% dos pacientes ambulatoriais e 9% a 16% de internados (Katon, 2003).

A presença de depressão piora diversos fatores relacionados à saúde em pacientes clínicos. Estudos recentes descreveram maior mortalidade associada a sintomas depressivos em pacientes idosos com doenças clínicas crônicas (Cooper et al., 2002; Unützer et al., 2002). Pacientes com doenças clínicas e depressão têm maior risco de não aderirem às recomendações médicas (Dimatteo et al., 2000).

Algumas evidências sugerem as alterações do transporte de glicose em regiões específicas do cérebro poderiam ocorrer em pacientes diabéticos, favorecendo o desencadeamento da depressão (Musselmann et al., 2003).

Dadas as implicações da comorbidade entre depressão e diabetes, é imprescindível a avaliação cuidadosa da sua ocorrência nos pacientes diabéticos. As implicações clínicas de quadros depressivos são evidentes. A ausência de tratamento ou tratamento inadequado elevam o risco a uma ordem de magnitude semelhante ao risco apresentado pela elevação da pressão arterial não tratada ou tratada de forma inadequada (Adler et al. 2000).

Infelizmente, estudos demonstram que a depressão é subdiagnosticada, em especial nos pacientes com diabetes. Estima-se que apenas um terço dos pacientes diabéticos com depressão recebe diagnóstico adequados (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

Apesar da impressão clínica de que o tratamento dos sintomas depressivos pudesse interferir com a evolução clínica do DM, ainda não existe, até o momento, um consenso definitivo em relação a esta questão. Um outro aspecto a ser destacado é que o próprio tratamento do DM parece interferir com a presença e a evolução de sintomas depressivos. Deste modo, as intervenções terapêuticas direcionadas ao DM poderiam resultar em uma melhora do quadro depressivo associado (Moreira, et al 2003) e a remissão do quadro depressivo poderia contribuir com a diminuição dos riscos de morbidade e mortalidade (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009).

O tratamento farmacológico com agentes antidepressivos é o pilar fundamental da terapêutica da depressão.

Antidepressivos constituem uma classe heterogênea de medicações, que são utilizadas para o tratamento de transtornos alimentares, transtornos de ansiedade, do humor e também síndromes hiperalgênicas (Bacaltchuk & Hay, 2003; Krueger et al., 2004).

O tratamento farmacológico para depressão usualmente envolve o aumento da transmissão monoaminérgica no SNC. Desde a descoberta que os fármacos que aumentam a transmissão monoaminérgica melhoram o humor, ocorreu um grande investimento para a síntese de novas drogas com mecanismo similar. A imipramina por exemplo, foi descoberta por acaso. (referência)

Este antidepressivo tricíclico (ADTs) estava em testes devido à possível propriedade sedativa por se tratar de um derivado iminodibenzílico. Entretanto, Kuhn (1958) observou que a imipramina não apresentava propriedades sedativas, mas melhorava o humor de pacientes deprimidos.

O tratamento farmacológico para depressão usualmente envolve o aumento da transmissão monoaminérgica no sistema nervoso central (SNC). Desde a descoberta que os fármacos que aumentam a transmissão monoaminérgica melhoram o humor, ocorreu um grande investimento para a síntese de novas drogas com mecanismo similar, fazendo surgir outros grupos de antidepressivos como os inibidores da monoamino oxidase (IMAOs) e os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), estes últimos considerados a primeira linha no tratamento da depressão. (referência)

IMAOs, ADTs e ISRS podem produzir aumentos imediatos na neurotransmissão monoaminérgica, entretanto o efeito na melhora do humor requer semanas de tratamento (Berton & Nestler, 2006). Sabe-se hoje que o aumento

agudo de monoaminas nas fendas sinápticas produzido pelos antidepressivos leva secundariamente a processos de neuroplasticidade que podem ser responsáveis pelo efeito antidepressivo (Nestler et al., 2002; Pittenger & Duman, 2008).

Alguns antidepressivos possuem efeitos sobre a glicemia e requerem atenção especial quando utilizados em pacientes com diabetes.

O estudo de Derijks et al. (2008) avaliou a correlação entre o uso de antidepressivos em pacientes diabéticos e a taxa de internação por hipoglicemia nestes. Não foi observado aumento de risco para hipoglicemia com antidepressivos. No entanto, houve uma tendência maior em pacientes que fizeram uso de medicações com maior afinidade serotoninérgica e, naqueles que usaram por mais de três anos, o risco para internação por hipoglicemia foi três vezes maior.

Diante do exposto é possível inferir que pode haver associação importante entre diabetes e transtornos psiquiátricos, sobretudo a depressão, e que o tratamento da depressão em pacientes diabéticos torna-se imprescindível para prevenir recaídas e minimizar morbidade e mortalidade.

1.6 Diabetes e Qualidade de Vida

As informações sobre Qualidade de Vida (QV) têm sido utilizadas para avaliar a eficácia de determinados tratamentos de doenças, os agravos à saúde e o impacto físico e psicossocial (Seidl & Zanon, 2004; WHOQOL, 1995). O Grupo de Qualidade de Vida da OMS define o termo QV como: *“a percepção do indivíduo de sua posição na vida, no contexto da cultura e do sistema de valores em que vive e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações”* (Minayo et al., 2000).

A QV está relacionada aos elementos que a sociedade considera como padrão de conforto e bem-estar, variando com a época, os valores, os espaços e as diferentes histórias, com foco na promoção da saúde (Buss, 2000).

A primeira década do século XXI oferece um alto grau de sofisticação tecnológica ao monitoramento destas doenças. Portanto, para a garantia da QV, é importante investir na prevenção do DM, evitando agravos, hospitalização e consequentes gastos públicos (Peixoto et al, 2004).

Minayo et al. (2000) destacam que termo QV está diretamente relacionado ao grau de satisfação encontrado na vida familiar, amorosa, social e ambiental e à própria estética existencial, ou seja, capacidade de sintetizar todos os elementos que a sociedade considera como sendo padrão de bem-estar. Pode-se acrescentar que tais considerações também englobam conhecimentos e experiências, valores individuais e coletivos, aspectos culturais e sociais.

De acordo com o WHOQOL – group (World Health Quality of Life) a qualidade de vida é a percepção do indivíduo de sua posição na vida no contexto da cultura e sistema de valores nos quais ele vive e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações (WHOQOL, 1995).

Para que haja a promoção da qualidade de vida é fundamental conter o avanço da doença e trabalhar seus aspectos preventivos e de adaptação dos pacientes ao tratamento farmacológico quando existe assim como ao monitoramento diário da glicemia capilar. A Organização Pan-Americana da Saúde, a Declaração das Américas, a Federação Internacional da Diabetes e outras organizações nacionais e internacionais se reuniram no dia 14 de novembro de 2007 para colocarem em prática ações efetivas de prevenção, atenção, conscientização,

acompanhamento, vigilância, controle dos principais atores e determinantes do risco para diabetes, assim como para a melhoria da qualidade de vida dos diabéticos (PAHO, 2007).

Há instrumentos de avaliação que podem indicar aspectos da qualidade de vida, como o utilizado para medir o grau de depressão, ansiedade e os vários fatores que envolvem o bem estar.

A presença ou ausência de DM pode interferir na qualidade de vida, assim como Latini et al. (2006) concluíram em seu estudo que os indivíduos com DM apresentaram uma queda maior na qualidade de sua vida que os sujeitos não portadores de diabetes.

Há dois tipos de classificações mais utilizados para mensurar as questões relacionadas com a qualidade de vida, a genérica e a específica. Um exemplo muito usado na primeira classificação é o Grupo de Qualidade de Vida, The Whoqol Group (1995), que se baseia na construção subjetiva da qualidade de vida, multidimensional composta por elementos positivos e negativos (Fleck, 2000).

As mensurações específicas estão relacionadas a situações da qualidade de vida cotidiana dos indivíduos subsequente a experiência de doenças, agravos ou intervenções médicas, e que devem ser utilizadas nesse caso de portadores de diabetes, pois irá tratar de situações cotidianas relacionadas a uma enfermidade crônica. Existem muitos indicadores subjetivos da convivência com doenças e lesões, como sentimentos de vergonha e culpa, que trazem consequências negativas sobre a percepção da qualidade de vida por parte dos indivíduos acometidos e suas famílias (Minayo et al., 2000). Nota-se, no entanto, a necessidade de saber quais aspectos os portadores de DM relatam ter maior

influência em sua qualidade de vida, uma vez que muitos são dependentes de tratamento farmacológico incluindo o tratamento com a insulina com aplicações diárias e há presença de alguns sintomas característicos quando a doença está mal controlada. De uma forma geral, os estudos existentes sugerem que a presença de complicações crônicas está associada a uma diminuição significativa na qualidade de vida.

Todavia, também existem estudos, ainda que escassos, que encontram uma relação significativa entre a presença de determinadas complicações crônicas e uma melhoria em alguns domínios da qualidade de vida e que verificaram que as sequelas parecem explicar muito pouco da variância desta variável (Hanestad, 1993).

Hahl et al (2002) desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a qualidade de vida de doentes com DM e de descrever a influência que os sintomas das complicações crônicas da doença têm nessa variável, tendo verificado que a elevada prevalência de sintomas das complicações crônicas combinada com o seu significativo impacto negativo parecem causar uma diminuição da qualidade de vida dos doentes e da utilidade destes, quer do ponto de vista individual, quer social.

No trabalho de Anderson et al. (2001) mais de uma centena de artigos foram analisados a partir da relação entre diabetes, qualidade de vida e desgaste psicológico, mais especificamente sobre o manejo do DM e qualidade de vida. Os autores constataram que os fatores que parecem intervir no controle glicêmico e na qualidade de vida são os sintomas de hiperglicemia e de hipoglicemia, tipo de tratamento, satisfação com o tratamento, presença de complicações e características psicossociais. O desgaste psicológico é muito semelhante no DM dos

tipos 1 e 2, mas as dificuldades diárias são diferentes, os diabéticos tipo 1 estão preocupados, principalmente, com o impacto potencial do DM em suas carreiras e na capacidade de planejar sua vida diária e em encontrar formas de lidar com a doença para ajustá-la ao estilo de vida que levam em função de serem diabéticos.

Em pacientes com DM e outras doenças crônicas a presença de depressão tem mostrado ter efeitos adversos sobre a vida social e o funcionamento físico assim como sobre a qualidade de vida. Da mesma forma, tratar a depressão tem efeitos positivos sobre aquelas condições (Anderson et al., 2001). Papelbaum et al. (2001) abordam a ocorrência de desordens psiquiátricas em pacientes diabéticos.

Anderson et al. (2001) concluem, também, que as dificuldades diárias e os transtornos relacionados ao auto-cuidado do DM contribuem de forma significativa para o desgaste psicológico, independente da ansiedade e depressão que se desenvolvem a longo prazo, relacionados ao caráter crônico do DM. Os portadores desenvolvem uma sensação de derrota por conviver com o DM e, também, um sentimento de incapacidade e impotência em relação à prevenção de complicações sérias. Portanto, é necessário melhorar a forma de administração de insulina e os esquemas de tratamento além de realizar intervenções educativas que habilitem no auxílio dos pacientes em melhorar a qualidade de vida (Fischer & Skovlund, 1999).

O principal objetivo do tratamento do DM é a melhoria do controle glicêmico através do equilíbrio entre a dieta e os níveis de insulina endógena ou exógena. Entretanto, embora sejam estes apenas dois fatores de controle, sua consecução nem sempre é fácil porque há uma necessidade de disciplina estrita na sua aplicação. A longo prazo processa-se, geralmente, uma fadiga na continuidade dos esquemas dietéticos e da aplicação de insulina, constatando-se altos níveis de

ansiedade entre os pacientes, no desejo de controlarem as aplicações do remédio e pelo temor das complicações que advém da cronicidade da doença (Fischer & Skovlund, 1999).

Por fim, um estudo desenvolvido por Silva et al. (2003) identificou que de uma forma geral, os resultados sugerem que, entre os indivíduos com DM, aqueles que sofrem de complicações crônicas demonstram ter uma qualidade de vida inferior à dos que não sofrem de sequelas da doença.

Destaca-se, também que o questionário utilizado para avaliar a qualidade de vida é importante na prática clínica, pois ajuda no processo de decisão da terapêutica a ser utilizada.

1.7 Diabetes e alterações neuroquímicas

1.7.1 Metabolismo Energético

Os seres vivos precisam de energia para realizar várias funções, como, por exemplo, o transporte ativo de íons e moléculas, neurotransmissão, síntese de macromoléculas e outras biomoléculas a partir de precursores simples e para a contração muscular. A energia necessária para realizar essas funções é obtida com a oxidação de substâncias pela respiração celular. O ATP é o principal combustível da célula na maioria dos processos que precisam de energia, sendo a energia liberada pela hidrólise de ATP, que impulsiona uma série de reações (Lehninger et al., 2007).

1.7.1.1 Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa

A cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa ocorrem nas mitocôndrias. A cadeia respiratória é formada por uma série de complexos protéicos, onde ocorre a transferência de elétrons doados por NADH e FADH₂. O fluxo de elétrons do NADH e FADH₂ até O₂ se dá através de complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna, essa transferência de elétrons é impulsionada por um crescente potencial redox entre as coenzimas NADH e FADH₂, os complexos enzimáticos e o oxigênio, o aceptor final da cadeia respiratória (Lehninger et al., 2007; Berg et al., 2008).

A cadeia respiratória é composta de quatro complexos (I, II, III e IV). O complexo I, conhecido como NADH desidrogenase ou NADH: ubiquinona oxidoreductase, transfere elétrons do NADH para a ubiquinona, formando ubiquinol. Essa reação faz com que quatro prótons sejam bombeados para o espaço intermembrana. O complexo II, também denominado de succinato: ubiquinona oxirredutase, é formado pela enzima succinato desidrogenase (SDH) e três subunidades hidrofóbicas. Esse complexo participa do ciclo de Krebs e transfere elétrons do succinato para a ubiquinona e também forma ubiquinol. O complexo III, ou citocromo c oxirredutase, transfere elétrons do ubiquinol para o citocromo c, reação que serve para o bombeamento de mais quatro prótons para o espaço intermembrana. O complexo IV, mais conhecido como citocromo c oxidase, transfere elétrons do citocromo c reduzido para o oxigênio, reduzindo-o a H₂O. Nessa etapa os últimos dois prótons são bombeados (Wallace, 1999; Murray, 2002; Voet et al., 2008).

O gradiente eletroquímico formado pelo bombeamento de prótons durante a cadeia respiratória mitocondrial é utilizado como força-motriz para o complexo V, ou ATP sintase, formar ATP (fosforilação oxidativa). Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos está acoplada ao processo de fosforilação do ADP, ou seja, quando o potencial de membrana é dissipado pelo fluxo de prótons a favor do gradiente eletroquímico, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase, que atua como uma bomba de prótons ATP-dependente (Voet et al., 2008).

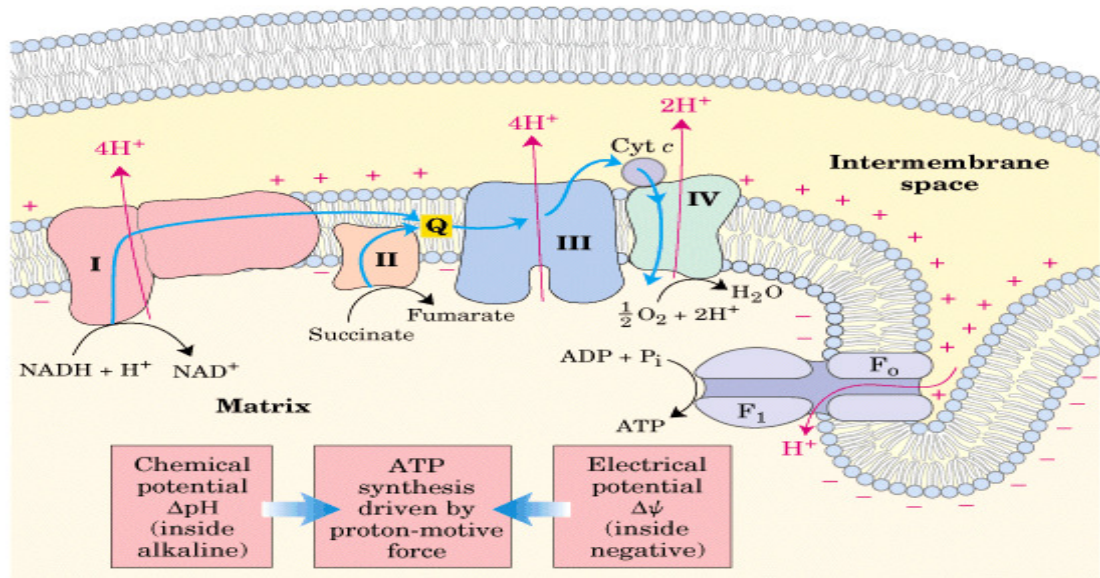


Figura 1: Cadeia respiratória mitocondrial (Nelson & Cox, 2000).

Além da regeneração do ATP, a mitocôndria é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de defesas antioxidantes nas células (Cadenas & Davies, 2000), gerando ânions superóxido no espaço intermembrana pelo vazamento de elétrons que se combinam com oxigênio molecular no complexo III em um processo que é dependente do potencial de membrana, e na matriz, através do complexo I (Han et al., 2001). Além disso, a mitocôndria participa ativamente da

homeostase de cálcio (Nicholls & Akerman, 1982). Neste contexto, alterações na função mitocondrial levam a uma rápida queda na produção de energia e morte celular (Ankarcrona et al., 1995). Além disso, a diminuição do metabolismo energético pode levar a apoptose através da liberação de citocromo *c* (Liu et al., 1996; Heales et al., 1999).

Acredita-se que a diminuição no metabolismo energético pode estar envolvido na fisiopatologia de diversas doenças dentre as quais o diabetes (Brennan et al., 1985; Beal et al., 1992; Heales et al., 1999; Blass, 2001).

Por fim, achados recentes indicam que portadores de DM do tipo 2 apresentam células β com anormalidades no metabolismo da glicose e na estrutura e função mitocondrial o que resulta em produção de ATP e de glicose prejudicada comprometendo a produção de insulina (Marchetti, et al, 2010).

A creatina quinase é uma enzima muito importante para o homeostase, a qual exerce diversas funções integradas, tais como controle metabólico e transferência de energia dos sítios produtores para os de consumo. É bem descrito na literatura que uma inibição na atividade da creatina quinase está implicada na fisiopatologia de muitas doenças (Khuchua et al., 1998; Schlattner & Wallimann, 2000). A citrato sintase é uma outra enzima que é inibida quando há grandes concentrações de ATP, acetil CoA e NADH, nos casos em que o suprimento de energia é muito alto (Sheperd & Garland, 1960). Além disso, essa enzima têm sido usada como um marcador quantitativo da presença intacta da mitocôndria (Marco et al., 1974). Desse modo, essas enzimas podem também desempenhar um papel importante na fisiopatologia da diabetes.

1.7.2 Estresse Oxidativo

Os radicais livres são gerados em diversos processos metabólicos celulares, tanto como segundos mensageiros de rotas enzimáticas, quanto como produtos indesejados de rotas metabólicas diversas para produção de ATP. Por outro lado, existe uma variedade de mecanismos através dos quais o organismo mantém controle sobre os radicais gerados. Quando esses mecanismos não são eficientes para controlar o nível de radicais livres, ocorre o que é chamado de estresse oxidativo.

O estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) ocasionando um potencial dano oxidativo em todas as biomoléculas, incluindo lipídios, proteínas e o DNA (Dalle-Donne et al., 2006; Halliwell & Gutteridge, 1999).

O estresse oxidativo provoca alterações, por diversos mecanismos, na fisiologia da célula, podendo acarretar morte celular. Este fenômeno parece desempenhar um papel importante no avanço de sintomas de diversas doenças crônicas dentre as quais está o diabetes (Imaeda et al., 2001; Ceriello et al., 2000).

Inúmeras pesquisas relataram que o estresse oxidativo é um colaborador no desenvolvimento e progressão da diabetes e suas complicações (Imaeda et al., 2001). Diversos mecanismos podem contribuir para o aumento do estresse oxidativo nos pacientes diabéticos, especialmente a exposição crônica à hiperglicemia.

Evidências apontam que a hiperglicemia pode levar a uma elevada produção de ROS e de nitrogênio (RNS) pelo sistema respiratório mitocondrial (Nishikawua &

Arake, 2007) com auto-oxidação da glicose. A hiperglicemia pode promover um desequilíbrio oxidativo importante, favorecendo a produção de radicais livres e redução das defesas antioxidantes. Tais modificações oxidativas no diabetes afetaria diversas funções celulares, metabolismo e expressão gênica, o que pode causar outras condições patológicas (Young & Woodside, 2001).

O sistema imunológico é especialmente vulnerável a danos oxidativos porque muitas células do sistema imunológico, tais como neutrófilos, produzem ROS e RNS como parte dos mecanismos de defesa do organismo para destruir patógenos invasores. Neutrófilos de pacientes diabéticos têm demonstrado atividade subnormal, atividade em fagocitose, quimiotaxia, e resposta fungicida associado com a glicose alta (Galacher et al, 1995; Alba Loureiro et al, 2006).

Especificamente na relação com o diabetes, um fator que tem sido unificador entre diabetes e disfunção mitocondrial é a existência de dano oxidativo celular. Vários estudos têm mostrado que o diabetes é na verdade um estado de estresse oxidativo. Os mecanismos pelos quais ocorre o estresse oxidativo e a geração de ROS aumenta em diabéticos não estão completamente elucidados. Devido ao fato de que a mitocôndria é uma das principais fontes celulares de ROS, acredita-se que a disfunção mitocondrial em tecidos diabéticos em grande parte contribui para o dano oxidativo presente em tecidos diabéticos. Uma das principais consequências do dano oxidativo é a produção de produtos de peroxidação lipídica, incluindo aldeídos, a partir de fosfolípidios das membranas biológicas, como resultado de reações envolvendo radicais livres. Os produtos da peroxidação lipídica gerados são altamente tóxicos para as células e podem causar modificações estruturais e funcionais de proteínas celulares. Com base nestas considerações sustenta-se a

hipótese de que os defeitos mitocondriais nos diabéticos, especificamente na cadeia transportadora de elétrons, é uma importante fonte de ROS (Lashin, 2005).

1.7.3 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

Os fatores neurotróficos compõem duas principais famílias: a das neurotrofinas (NTs) e a do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), cujos componentes podem atuar de forma isolada ou conjuntamente nos processos de regeneração das fibras nervosas lesadas. NTs são uma família de proteínas que regulam diversos aspectos do desenvolvimento e funções neuronais, incluindo a formação de sinapses e plasticidade sináptica (Chao, 2003). Os principais componentes da família, entre os mamíferos, são o fator de crescimento neuronal (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT-4/5).

Os fatores neurotróficos são proteínas solúveis endógenas que regulam a sobrevivência, o crescimento, a plasticidade morfológica e a síntese de novos neurônios com funções diferenciadas, por isso, podem estar relacionadas as diferentes manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes diabéticos, tendo em vista as mudanças ocorridas no metabolismo da glicose, sobretudo nas condições de hiperglicemia. O BDNF é a proteína mais abundante no cérebro e responsável pelo desenvolvimento e manutenção do sistema neuronal, sendo produzido principalmente pela glia e núcleo dos neurônios. Atua como modulador da plasticidade sináptica do sistema nervoso central e periférico e dos neurotransmissores, regulando a excitabilidade neuronal (Zhao et al. 2005; Szapacs et al., 2004; Shimizu et al., 2003; Bimonte 2003). O BDNF tem grande expressão no

hipocampo, neocórtex, amígdala e cerebelo e faz modulação de diversas funções sinápticas, induzindo estímulo à maturação, nutrição, crescimento e integridade neuronal.

As neurotrofinas, em especial o BDNF, parecem estar implicados na base fisiopatológica de diversas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. Evidências clínicas e pré-clínicas indicam que o BDNF desempenha papel fundamental na plasticidade neuronal e memória. O BDNF parece mediar os principais processos dependentes de estímulo externo, isto é, aprendizado, experiências, memórias, ou seja, as suas características o tornam um potencial mediador neurobiológico dos efeitos das experiências de vida. Ainda, a exposição ao estresse diminui os níveis de BDNF em modelos animais (Murakami et al., 2005).

As modificações na expressão do BDNF podem ocorrer por uma série de respostas a eventos tais como crises epiléticas (Marini et al., 2007), uso de glicocorticóides e diabetes (Kumamaru et al., 2008), esteróides sexuais (Beglioumini et al, 2007), hipóxia cerebral (Tapia-Arancibia et al., 2004; Marini et al., 2007) e exercícios físicos (Lou et al., 2008).

Em animais o BDNF está envolvido com a resistência a insulina. Já se descobriu que o BDNF reduz a ingestão de alimentos e diminui a glicemia em modelos animais de ratos diabéticos obesos, e que BDNF tem uma ação hipoglicemiante independente da alteração do apetite (Ono et al, 1997; Nakagawa et al. 2000).

Autores também tem analisado o efeito do BDNF sobre a sinalização da insulina em ratos e demonstrou-se que o BDNF aumenta a insulina estimulando a ativação de fosfatidilinositol (PI) 3-quinase em tecidos periféricos, incluindo

fígado, músculo esquelético e tecido adiposo (Strachan, 1997). Desse modo compreende-se que o BDNF afeta o metabolismo da glicose e possivelmente a sensibilidade a insulina.

Ainda, encontra-se que os medicamentos redutores do colesterol (estatinas) supostamente aumentam os níveis de BDNF (Chen, Zhang et al, 2005; Wu et al, 2008). Outro aspecto que merece destaque é que o gênero pode afetar os níveis de BDNF. As mulheres mostraram ter maior nível de BDNF no plasma e sangue total do que os homens, o que pode ser afetado pelo peso corporal (Lommatzsch et al., 2005; Trajkovska et al., 2007).

Nos seres humanos, o diabetes tipo II está associado com deficiência da função cognitiva, incluindo a aprendizagem, memória e processamento da velocidade (Strachan et al., 1997; Awad et al., 2004). Um estudo longitudinal de grande base populacional mostra que a taxa de declínio cognitivo é acelerado em idosos com diabetes do tipo 2 (Allen et al., 2004). Há boas evidências de que a sensibilidade à insulina e BDNF podem afetar a cognição e a integridade neural em animais e seres humanos.

Estudo desenvolvido por Krabe et al. (2006) que buscou identificar a relação entre BDNF e diabetes tipo II encontrou que há uma produção cerebral de BDNF, e que esta é inibida durante condições hiperglicemiantes em seres humanos. Isto pode explicar a constatação concomitante de baixos níveis circulantes de BDNF em indivíduos com diabetes tipo 2, e a associação entre baixo BDNF plasmático e a gravidade da resistência a insulina. Encontraram também uma significativa associação inversa entre BDNF e glicemia, mas nenhuma associação entre BDNF e insulina plasmática. Os resultados deste estudo confirmam os de outros estudos

com modelos animais (Ono et al., 1997; Kernel et al., 2000) que sustentam a hipótese de que o BDNF desempenha um papel na resistência à insulina e no balanço de energia.

Resultados dos estudos conduzidos por Krabe et al (2006), permitiram aos autores sugerirem que os níveis de BDNF circulantes são regulados em resposta a níveis plasmáticos de glicose.

De acordo com dados de coorte, onde a glicose alta foi associada com baixos níveis de BDNF no plasma, a saída cerebral de BDNF foi inibida quando os níveis de glicose no sangue estavam elevados durante condições extremas. Em contraste, a produção cerebral de BDNF não se alterou durante condições hiperinsulinêmicas-euglicêmicas analisadas por meio do clamp glicêmico, indicando que altos níveis de glicose, mas não de insulina, têm uma influência negativa sobre a saída de BDNF no cérebro. (Krabe et al., 2006).

A correlação negativa entre o plasma da glicose elevada e da gravidade da resistência à insulina, por um lado e os níveis circulantes de BDNF no outro sublinha a importância clínica de estudos efetuando estas análises (id ibid).

1.8 Modelo animal de diabetes induzido por aloxano

Dentre os modelos experimentais de diabetes encontra-se a aplicação de aloxano cuja injeção intravenosa destrói seletivamente as células β pancreáticas, sendo captadas rapidamente pelos transportadores de glicose (GLUT2) e causando formação de radicais livres após uma série de reações que culminam com a lesão celular (Malaisse et al., 1982; Lenzen, 2008).

O aloxano proporciona discreta redução glicêmica cerca de 30 minutos após sua injeção, como resultado de estimulação da secreção de insulina e consequente aumento da insulinemia (Lenzen, 2008).

Contudo, após 60 minutos da injeção ocorre hiperglicemia decorrente de decréscimo da insulinemia persistindo nas próximas 4 horas, ocorrendo nessa fase as primeiras alterações morfológicas das células β , como dilatação do retículo endoplasmático rugoso e das mitocôndrias, além de diminuição do complexo de Golgi, dos grânulos e do conteúdo de insulina. No período de 4 a 8 horas ocorre grande aumento da insulinemia, como consequência de ruptura da membrana celular (id *ibid*).

Posterior e permanentemente segue a hiperglicemia, que ocorre de forma crescente entre 9 a 144 horas, estabilizando-se em seguida. Esta fase é alcançada com a completa desgranulação e perda de integridade das células β , ocorrendo aumento da presença de macrófagos no pâncreas (Boquist, 1977; Szkudelki, 2001; Lenzen, 2008).

Estas breves alterações são de fundamental importância para o desenvolvimento do quadro diabético no animal que, em longo prazo, incluem redução no peso, polifagia, polidipsia e alterações no sistema imunológico. Os avanços em pesquisas biomédicas estão acoplados ao desenvolvimento de modelos animais das doenças humanas. Como em todas as condições clínicas, a aproximação entre a doença e as ações de medicamentos corretivos em animais de laboratório é essencial para o desenvolvimento de terapias eficazes (Lenzen, 2008).

Neste trabalho experimental utiliza-se o aloxano por via endovenosa, cuja atividade diabetogênica foi inicialmente notada por Dunn et al. (1943), quando

estudava os efeitos do ácido úrico e seus derivados na produção da lesão renal em coelhos.

O aloxano administrado por via endovenosa, na dose de 42 mg/kg de peso corporal, produz nos animais diabetes, com o desenvolvimento de alterações clínicas e laboratoriais, bem definidas, incluindo, respectivamente, elevação da ingestão hídrica e da diurese, valores glicêmicos acima de 300 mg/dl e glicose urinária maior que 3000 mg/dl.

Desse modo, entende-se que o modelo animal de diabetes induzido por aloxano encontra-se bem estabelecido e validado e que permite a mimetização da doença para o estudo da fisiopatologia e novos alvos terapêuticos.

2 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA DE PESQUISA

O aumento da incidência de diabetes é uma das maiores preocupações atuais em saúde pública, sendo projetado em cálculos epidemiológicos que o número de diabéticos chegue a aproximadamente 366 milhões no ano de 2030, caso não haja intervenções (Wild et al., 2004; Sociedade Brasileira de Diabete, 2009). Desta forma tornam-se imprescindíveis estudos envolvendo modelos experimentais de Diabetes DM, que forneçam informações que possam ser úteis no desenvolvimento de procedimentos mais eficazes na prevenção e no tratamento da doença. O modelo diabético induzido pelo aloxano é reconhecido pela similaridade ao quadro diabético insulino-dependente (Lenzen, 2008).

Do mesmo modo, torna-se imprescindível analisar o comportamento do diabetes e sua relação com outras doenças, dentre as quais os transtornos psiquiátricos, sobretudo a depressão por meio de estudos epidemiológicos. Estas são questões cruciais na tentativa de ampliar o conhecimento sobre as intrincadas relações que se estabelecem com os pacientes diabéticos e os problemas advindos disso.

As diretrizes para tratamento e acompanhamento do DM, recentemente lançadas pela Sociedade Brasileira de Diabete, apontam dados epidemiológicos que demonstram aumento de 5 a 6 vezes na população diabética nos últimos 17 anos, estimando-se cerca de 8 milhões de pessoas portadoras de diabetes no Brasil (Sociedade Brasileira de Diabete, 2009). Estes dados reforçam a importância de estudos básicos que contribuam para prevenção e tratamento do DM.

Outra questão que se torna imprescindível é o conhecimento sobre como vivem as pessoas diabéticas, sobretudo aquelas que dependem do uso de insulina, o que implica na qualidade de vida. Conhecer os mecanismos que mais interferem na qualidade de vida destes pacientes é instrumento potente para a condução do tratamento e a orientação para o auto-cuidado.

A prática clínica no atendimento diário a pacientes diabéticos permite identificar situações que produzem inquietação relativas sobretudo as evidências na associação de diabetes e alguns transtornos psiquiátricos sobretudo os transtornos do humor, com especial ênfase sobre a depressão.

Frente a essa realidade, torna-se imprescindível a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes e de suas complicações, à procura de um tratamento capaz de contribuir com as alterações endócrino-metabólicas causadas pela doença e, principalmente, as lesões crônicas.

Neste particular, os estudos experimentais sobre o diabetes têm sido extremamente necessários, assim como estudos epidemiológicos, na tentativa de se desenvolver novas e cada vez mais potentes estratégias terapêuticas para o diabetes o que justifica a realização desta pesquisa.

3 OBJETIVOS

Etapa I

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a prevalência de transtornos psiquiátricos, risco de suicídio e qualidade de vida em pacientes diabéticos tipo II em tratamento com insulina.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a prevalência de transtornos psiquiátricos em pacientes diabéticos tipo II em tratamento com insulina, comparando com controles não diabéticos;

- Avaliar o risco de suicídio em pacientes diabéticos tipo II em tratamento com insulina, comparando com controles não diabéticos;

- Avaliar a qualidade de vida em pacientes diabéticos tipo II em tratamento com insulina, comparando com controles não diabéticos;

- Avaliar se a prevalência de transtornos psiquiátricos, risco de suicídio e qualidade de vida em pacientes diabéticos tipo II em tratamento com insulina estão associadas a aderência ao tratamento e a níveis glicêmicos.

Etapa II

3.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros do metabolismo energético em um modelo animal de diabetes induzido por aloxano.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade da enzima citrato sintase em tecido cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por aloxano;

- Avaliar a atividade da enzima creatina quinase em tecido cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por aloxano;

- Avaliar a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (I, II, III, III e IV) em tecido cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por aloxano.

Etapa III

3.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros de memória e de estresse oxidativo em um modelo animal de diabetes induzido por aloxano.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a memória de reconhecimento através do teste de reconhecimento de objetos em ratos Wistar submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por aloxano;

- Avaliar a produção de TBARS e de superóxido em partículas mitocondriais de tecido cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por aloxano;

- Avaliar os níveis de TBARS e carbonilação de proteínas em tecido cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por aloxano;

- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT em tecido cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por aloxano.

Etapa IV

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos comportamentais e moleculares da administração de imipramina em um modelo animal de diabetes induzido por aloxano.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos antidepressivos da imipramina através do teste do nado forçado em modelo animal de diabetes induzido por aloxano;

- Avaliar os efeitos nos níveis de BDNF da administração de imipramina em tecido cerebral de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por aloxano.

PARTE II

4 ARTIGO I

Artigo submetido para publicação no periódico Diabetes Care, 2011.

Increased incidence of depression and risk of suicide in type 2 diabetic patients

Luciane B. Ceretta, Gislaine Z. Réus, Helena M. Abelaira, Luciano K. Jornada, Magada T. Schwalm, Neiva J. Hoepers, Cristiane D. Tomazzi, Karina G. Gulbis, Renan A. Ceretta e João Quevedo

INCREASED INCIDENCE OF DEPRESSION AND RISK OF SUICIDE IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

Luciane B. Ceretta¹, Gislaine Z. Réus^{1*}, Helena M. Abelaira¹, Luciano K. Jornada¹, Magada T. Schwalm², Neiva J. Hoepers², Cristiane D. Tomazzi², Karina G. Gulbis³, Renan A. Ceretta⁴ and João Quevedo¹

¹Laboratório de Neurociências and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC;

²Laboratório de Fisiopatologia and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC;

³Departamento de Enfermagem, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC;

⁴Departamento de Odontologia, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC.

Short Title: Diabetes and psychiatric disorders

***Corresponding author:**

Gislaine Z. Réus, PhD
Laboratório de Neurociências,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde,
Universidade do Extremo Sul Catarinense,
88806-000 Criciúma, SC, Brazil
Fax: +55 48 3431 2736.
E-mail: gislainezilli@hotmail.com

Abstract

Objectives: The study evaluated the association of mood disorders, risk of suicide and quality of life in patients with type 2 diabetes.

Research Design and Methods: We used cross section study with 996 patients with type 2 diabetes, (using insulin for over 1 year) and 2.145 individuals without diabetes and evaluate the presence of different mood disorders, suicide risk and quality of life.

Results: We showed an association between type 2 diabetes and depressive episode, recurrent depressive episode, dysthymia, mood disorder with psychotic symptoms and suicide risk. In diabetics patients the recurrent depression and depression with psychosis were associated with high levels of glycosylated hemoglobin and non-adherence to insulin treatment, dysthymia was associated with high blood glucose and the presence of suicide risk the high fasting glucose was the risk factor. Patients had lower mean scores in the domains, physical, psychological and environment, but had higher scores in the item social relations.

Conclusions: The data demonstrated, a worse quality of life, a high comorbidity of type 2 DM with depressive disorders and suicide risk, and poor control of DM is a factor for more severity of mood disorders.

Introduction

Diabetes Mellitus (DM) is a public health problem and it is estimated that there are over 150 million people affected worldwide (1). There are two most common forms of diabetes, type 1 and type 2. Type 2 DM is the most abundant endocrine disease, its pathophysiology is very complex and it is related to the development of insulin resistance in liver and peripheral tissues accompanied by a defect in insulin secretion by pancreatic beta cells thus leading to a hyperglycemic state (2,3).

In addition, the risk for developing type 2 DM increases with age, obesity and cardiovascular diseases (4). Nevertheless, recent studies have shown a relationship between diabetes and psychiatric disorders. In fact, a survey showed that the prevalence of depression is approximately 10% higher in diabetic patients (5). On the other hand, chronic hypercortisolemia may lead to insulin resistance, which may explain the association between DM and depression and vice versa (6).

Interestingly, Knol et al. (7) showed that depression increases the risk for type 2 DM by 37%. Ali et al. (8) showed that the prevalence of unipolar depression in patients with type 2 DM is 10.9-32.9%. Also in 2006, Barnard et al. (9) pointed to a prevalence of 7.8-12% of major depressive disorder and depressive symptoms in diabetic adults.

In diabetic patients with depression is associated with poorer glycemic control, more complications of the disease, and reduced quality of life and increased mortality (10-12). Recently, a longitudinal study following diabetic patients who had comorbidity with depression showed that over 40% of these patients developed major depressive disorder after two years after the initial period (13), the study also

attributed the anxiety in these patients as a predictor factor for the onset of major depression.

In addition, one study showed that treatment with antidepressant reduced the severity of depression in diabetic patients (14). It was also recently shown that treatment with antidepressant imipramine reversed depressive-like behavior in animals subjected to a model of diabetes (15). Recent publications also indicate a current prevalence of diabetes among individuals with schizophrenia and affective disorders. It has been found a relationship of insulin resistance, diabetes and metabolic syndromes with psychosis and affective disorders (16).

Exercise as a public health tool has largely been built around its plausible impact on physical health, including a positive impact on the prevention and management of type 2 diabetes (17). There is a growing interest in its potential to influence other aspects of quality of life such as mental health and general well-being. The effects of physical activity on overall quality of life are well established in the general population and have been analyzed on various dimensions of Quality of Life-BREF (WHOQOL-BREF) including physical and social functioning; subjective well-being, emotion and mood; self esteem and self-perception; cognitive performance; and sleep quality (17).

Studies relating the prevalence of mood disorders, suicide risk and quality of life in diabetic patients has been poorly characterized, usually describing only major depression or a syndrome suggestive of depression. The objective of this study was to evaluate the presence of different mood disorders, suicide risk and quality of life in patients with type 2 DM with insulin treatment, compared to controls without diabetes. In addition, the study also linked the presence of psychiatric disorders and quality of

life with adherence to treatment, with levels of glucose and glycosylated hemoglobin (Hb1C) in diabetic patients.

Research Design and Methods

Ethic aspects

The study was planned according to the resolution 196/96 of the National Health Council, being submitted and approved by the Ethics in Research – CEP University of Southern Santa Catarina - UNESC, on the protocol number 310/2009. After the presentation and identification of the researcher, each volunteer received information about the procedures, as well as the purposes of the study, their freedom to accept to participate or not and ensuring their anonymity.

Study Design

This is a cross-sectional study with control, where cases were composed of a sample of individuals with type 2 diabetes from outpatient facilities of the public system in the southern municipality of Santa Catarina, named in the study as patients. The group called the population was composed of people from the community who did not have diabetes.

Study Population and Sampling

The city where the study was conducted has 192,308 inhabitants, according to the latest population census (IBGE), from those 1,332 are registered in the municipal health department as type 2 diabetics. For inclusion in the study, we selected 1.007

diabetics over 18 years of age, with more than 5 years of diagnosis and undergoing treatment with insulin for at least 1 year. Later were subsequently excluded 3 illiterate and 8 who refused to participate in the study leaving a final sample of 996 patients. The study was development between March and November, 2010.

For each patient we adopted 2 or 3 controls (population group), as available in the localities, preferably neighbors of the same street. It was used, sex matching, age (3 years more or less), and home in the same neighborhood. It was considered for the non-diabetic group two fasting glucose levels below 126 mg/dL held until six months before the survey, lack of medical history (current or past) of DM and / or without the classic symptoms of hyperglycemia (polyuria, polyphagia, polydipsia and weight loss). At first, it was allocated 2.262 controls, excluding 117 with glucose levels above the normal standards, which were referred to the health service, leaving a final sample of 2.145 controls.

Data Collection Methods and Instruments

Data collection was performed by previously trained interviewer, performed individually with volunteers in their homes. The survey included information on socio-demographic data (age, gender, marital status and education), history of high blood pressure (hypertension), acute myocardial infarction (AMI) and stroke (CVA), and laboratory data of blood glucose fasting glycated hemoglobin (Hb1C), total cholesterol and low density lipoproteins (LDL). The cut-off points adopted for the results of these examinations were 110mg/dl for blood glucose, total cholesterol 200mg/dl, 100mg/dl LDL cholesterol and 9% Hb1C.

For analysis of psychiatric problems and as criteria for mood disorders and suicide risk was used the Portuguese version of the Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI) (18). The instrument is a standardized interview compatible with DSM-IV (APA) and ICD-10 (WHO), which has the convenience of being brief (15 to 30 minutes with trained professionals) and can be used in clinical and research practice after a short training (1 to 3 hours) (18). In the data analysis of the interview were studied only the current frames (to avoid memory bias) for Depressive Episode, Recurrent Depressive Episode, Dysthymia and Psychotic Mood Disorder. The suicide risk was assessed for its presence or absence, as well as mild moderate or severe degree. The instrument used to assess the quality of life was the WHOQOL-BREF questionnaire, validated into Portuguese (19). This questionnaire proposed by the World Health Organization (WHO) consists of 26 questions, 2 general and other 24 addressing four domains (physical, psychological, social relationships and environment). The punctuation adopted for general items and domains allowed a variation from 0 to 100, the higher the score the better the quality of life index.

Statistical Analysis

After data collection the data were tabulated and analyzed with statistical software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 16.0. Statistical analysis of qualitative data was first in bivariate order, through the chi-squared or Fisher's exact test (when applicable). Once the variables total cholesterol, LDL, hypertension, myocardial infarction and stroke were not paired in two groups, multivariate analysis was performed by Poisson regression to reduce the risk of bias.

For comparisons with the scores of the WHOQOL it was employed Student's t test or one-way ANOVA. The level of significance was 5%.

Results

A general description of the data groups of patients (n = 996) and control (n = 2.145) is seen in Table 1. There was no statistically significant difference between the distribution of age, gender, marital status and education. On the other hand, there was no matching data in the laboratory and of the three clinical comorbidities studied. The patients with type 2 DM had a higher prevalence of elevated total cholesterol and LDL, as well as referred presence of hypertension, myocardial infarction and stroke.

In the MINI it was found higher rates of problems among patients. As shown in Table 2, it was found an association between type 2 diabetes and depressive episode (adjusted PR = 1.5, p <0.001), recurrent depressive episode (adjusted PR = 1.5, p <0.001), dysthymia (adjusted PR = 2.3, p <0.001), mood disorder with psychotic symptoms (adjusted PR = 1.02, p <0.001) and risk of suicide (adjusted PR = 1.1, p <0.001). It is also evident that the occurrence of mood swings was a frequent event in patients with a prevalence of 66.7% for major depressive episode, 2 / 3 not being the first episode (44.7% recurrent depressive episode), 2.7% of this sample with psychotic symptoms and 91.7% of individuals with symptoms that the instrument classifies as dysthymia. As to the likelihood of suicide, mentioned earlier in relation to presence, there was also an association between endocrine disorders and the severity of risk. It was obtained for high risk OR = 60.7 (IC95% 8,2-448,8, p <0.001),

moderate OR = 5.3 (IC95% 2,4-11,9, p <0.001) and mild OR = 6.0 (IC95%4,0-8,9 , p <0.001).

In Table 3 there is data only from the patients group, referring in general to the adequate control of the disease or not. Although depressive episode was not associated with glycemic control and Hb1C, the recurrent Hb1C were associated with higher Hb1C (OR = 1.3, p <0.05). The same occurred with psychotic symptoms (OR = 4.1, p <0.05). Dysthymia was associated with high blood glucose (OR = 1.6, p <0.05).

In evaluating the quality of life (Figure 2), patients had lower mean scores in the domains: physical [36.5 (13.6) X 56.0 (4.9), p <0.001], psychological [42.6 (8.6) X 47.9 (8.6), p <0.001] and Environment [40.0 (8.6) X 49.2 (8.3), p <0.001], but had higher scores in the item Social Relations [50.2 (16.9) X35, 7 (27.9), p <0.001]. Table 4 shows the comparison between the control of metabolic disease and quality of life. Fasting plasma glucose <110mg/dl and glycosylated hemoglobin <9% were associated with better quality of life in the physical domain (both p <0.001), however the other three domains were not associated with glycemic control and Hb1C patients (p> 0.05).

4. Conclusions

Depression is the most prevalent mood disorder. It is estimated that 121 million people are affected globally (20). Recently some studies have shown a high prevalence of this disorder among diabetic patients (21). Furthermore, depression is associated with poor glycemic control, which can lead to an increased risk and

related complications in diabetes (21, 22). Depression and diabetes are among the most chronic diseases that cause disability and mortality (22).

In this study we used the MINI as a tool for evaluation, and our findings showed a higher occurrence of depressive episode, recurrent depressive episode, dysthymia, and mood disorder with psychotic symptoms in patients with type 2 diabetes. Concurrent with our study, other authors have also shown a relationship between diabetes and psychiatric disorders. A retrospective cohort study reported a high prevalence of depression in diabetic patients (23). Moreover, Lustman et al. (22) found that depression was significantly associated with hyperglycemia in patients with DM type 1 and type 2.

Bot et al. (13) in a longitudinal study, using MINI as a research tool showed that 40% of diabetic patients who had depression as a comorbidity developed major depressive disorder within two years after the initial period of the study. The authors also attributed anxiety as an important factor related to depression (13). Similar to our study Golden et al. (24) showed that patients with type 2 DM are 52% more likely to develop major depressive disorder than the general population. On the other hand, another study in which it was compared the prevalence of mental disorders among 141 diabetic patients and 4028 subjects without diabetes, Kruse et al. (25) found that people with diabetes did not differ in respect to depression according to DSM-IV. Differences in these studies may be attributed to the number of patients or sample size.

In this study it was not observed differences in relation to age, gender, marital status and education between diabetic and non-diabetic patients in the studied population. However, another study showed that depressive symptoms in patients

with diabetes were associated with some factors, for example, it was higher in women, youth and persons with low education (26).

The results of the present work also showed that diabetic patients had elevated total cholesterol and LDL, as well as a greater presence of hypertension, myocardial infarction and stroke. Interestingly, Clouse et al. (27) showed that in diabetic women, major depression was an independent risk factor that accelerated the development of heart disease. In addition, we showed that depression was a predictor of the incidence of heart disease among 4538 people with 60 years of age with systolic hypertension (28). In fact, in both diabetic and depressed patients there is a higher prevalence of heart disease, (29) so it would be important to monitor and treat the mood disorders in patients with DM.

High levels of Hb1C and non-adherence to insulin found in this study were associated with recurrent depression, as well as psychotic symptoms. Furthermore, dysthymia was associated with non-adherence and elevated blood glucose levels. According to the American Association of Diabetes (30) patients with diabetes should maintain low glycated hemoglobin levels, blood pressure and LDL. Completing these data, published data have suggested that the presence of depression in diabetic patients has been linked as a possible cause of an inadequate metabolic control. Papelbaum et al. (31) reported high levels of glycated hemoglobin in patients with type 2 DM, also diagnosed with recurrent depression compared with patients who did not have mood disorders.

In the literature, there are few studies correlating diabetes with the risk of suicide. In the present data we showed a higher incidence of suicide risk. Moreover, the presence of suicide risk was associated with elevated fasting glucose. Also, Roy

et al. (32) in a study examining suicide and its correlates in type 1 diabetics 412 African-American, showed that the population studied had a raised risk of attempting suicide, compared with 404 African-American without diabetes. Pompili et al (33) evaluated the perceived quality of life and its association with suicide risk in 100 Italian patients with type 1 and 2 diabetes. The authors related that patients with diabetes showed greater hopelessness and suicide ideation than internal medicine outpatients. Moreover, poor quality of life was related to low self-efficacy, high hopelessness and suicidality (33).

In the present study we also showed that patients with type 2 diabetes perceive a poor quality of life caused by their physical limitations, psychological and environment. Still, fasting plasma glucose and glycosylated hemoglobin were associated with better quality of life in the physical domain. However, the social relation was better in diabetics patients. This result may be related, at least in part, by the fact that patients in the present study participate in therapeutic groups operating both in health facilities to which they belong and in health clinics at the university to which they are met. It is known that integration, the exchange of experiences and above all the others living with diabetes relieves the burden of disease to the extent that activities associated with leisure activities, health information presents significant adherence of diabetics. Very recently, Ijzerman et al. (34) also related reduction in quality of life in people with type 2 diabetes. Furthermore, patients with type 2 diabetes improved in fasting blood sugar, LDL, HDL and quality of life following 8 weeks of aerobic exercise training (35).

Recent studies also have shown that patients with major depression are more likely to develop diabetes (32). This association may be explained by the fact that

individuals with depression often have a higher caloric intake and do little physical activity which may contribute to obesity (34). Nevertheless, depressive symptoms with activation of the hypothalamic pituitary adrenal (HPA), changes in the immune system, which can lead to insulin resistance and lead to development of DM (36). Another important fact is that antidepressants, antipsychotics and mood stabilizers may contribute to weight gain, hyperglycemia and hypertension (37). The chronic hypercortisolemia may lead to insulin resistance, which may explain the association between DM and depression and vice versa (6). It has also been recently shown that diabetic patients have alterations in the levels of the-derived neurotrophic factor in the brain (BDNF), which is classically known to be altered in depression (38). Abnormal levels of this neurotrophin may also explain the association between DM and depression (15).

It is important to state that, this study has some limitations, the MINI is not used as a clinical diagnosis, being used for a rapid diagnostic interview. Moreover, it was not evaluated the association of the use of antidepressants by patients. However, it is known that antidepressant treatment reduced the severity of depression in diabetic patients (14).

In conclusion the present study demonstrated a high prevalence of depressive disorders, suicide risk and poor quality of life in patients with type 2 diabetes in treatment with insulin. In addition, inadequate control of DM was shown to be a factor for more severe disorders and suggests further studies to investigate the biological basis of the association of mood disorders among diabetic patients.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq-Brazil – J.Q.), from the Instituto Cérebro e Mente (J.Q.) and UNESCO (J.Q.). J.Q. is recipients of CNPq (Brazil) Productivity Fellowships. G.Z.R. and C.D.T. are holders of a CAPES studentship. L.B.C. and J.Q. designed, organized and coordinated the study. L.B.C., M.T.S., N.J.H., C.D.T., K.G.G. and R.A.C. participated in data collection and interviews. L.J.K., G.Z.R. and H.M.A. contributed to data analysis, interpretation of data and wrote the manuscript. The authors report no conflict of interest.

References

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diab Care* 1998;21:1414–31
2. Giuffrida FM, Reis AF. Genetic and clinical characteristics of maturityonset diabetes of the young. *Diabetes Obes Metab*. 2005;7:318–26.
3. Robles GI, Singh-Franco D. A review of exenatide as djunctive therapy in patients with type 2 diabetes. *Drug Des Devel Ther*. 2009;21:219–40
4. Srinivasan M, Bhagra S. Diabetes and mortality risk after acute coronary syndromes. *JAMA*. 2007;298:2367.
5. Egede LE, Simpson K. Epidemiology, treatment and costs of depression in adults with Type 2 diabetes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2003;3:251–62.
6. Pouwer F, Kupper N, Adriaanse MC. Does emotional stress cause type 2 diabetes mellitus? A review from the European Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium. *Discov Med*;2010;9:112-8.
7. Knol M, Twisk J, Beekman A, Heine R, Snoek F, Pouwer F. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetologia* 2006;49:837-45.

8. Ali S, Stone MA, Peters JL, Davies MJ, Khunti K. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabet Med* 2006;23:1165–73.
9. Barnard KD, Skinner TC, Peveler R. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 1 diabetes: systematic literature review. *Diabet Med* 2006;23:445–8.
10. de Groot M, Anderson R, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. Association of depression and diabetes complications: a metaanalysis. *Psychosom Med*. 2001;63:619-30.
11. Egede LE, Nietert PJ, Zheng D. Depression and all-cause and coronary heart disease mortality among adults with and without diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:1339–45.
12. Lustman PJ, Clouse RE. Depression in diabetic patients: the relationship between mood and glycemic control. *J Diabetes Complications* 2005;19:113–22.
13. Bot M, Pous Pouwer F, Ormel J, Slaets JPS, de Jonge P. Original Article: Education and psychological aspects Predictors of incident major depression in diabetic outpatients with subthreshold depression. *Diabet.Med.* 2010;27;1295–301.
14. Khazaie H, Rahimi M, Tatari F, Rezaei M, Najafi F, Tahmasian M. Treatment of depression in type 2 diabetes with Fluoxetine or Citalopram? *Neurosciences* 2011;16:42-5.
15. Ceretta LB, Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Zappellini G, Aguiar BW, Pfaffenseller B, Lersh C, Kapczinski F, Quevedo J. Imipramine treatment reverses depressive-like behaviour and increases brain-derived neurotrophic factor protein levels in the prefrontal cortex in diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; in press.
16. Regenold WT, Thapar RK, Marano C, Gavirneni S, Kondapavuluru PV. Increased prevalence of type 2 diabetes mellitus among psychiatric in patients with bipolar I affective and schizoaffective disorders independent of psychotropic drug use. *J Affect Disord*. 2002;70:19–26.
17. Zanuso S, Balducci S, Jimenez A. Physical activity, a key factor to quality of life in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;1:24-28.
18. Amorim P. Mini International Neuropsychiatric Interview(MINI): validação de entrevista breve para os transtornos mentais. *Rev Bras Psiquiatr* 2000;22:106-15.
19. Fleck MPA, Louzada S, Xavier M, Chachamovich E, Vieira G, Santos L et al. Application of the Portuguese version of the instrument for the assessment of quality of life of the World Health Organization (WHOQOL-100). *Rev Saude Publica*. 1999;33:198-205.

20. Sattler R, Rothstein JD. Targeting an old mechanism in a new disease – protection of glutamatergic dysfunction in depression. *Biol Psychiatry*. 2007;61:137-8.
21. Nau DP, Aikens JE, Pacholski AM. Effects of gender and depression on oral medication adherence in persons with type 2 diabetes mellitus. *Gend Med* 2007;4:205-213.
22. Lustman PJ, Anderson RJ, Freedland KE, de Groot M, Carney RM, Clouse RE. Depression and poor glycemic control. *Diabetes Care*. 2000;23:934-42.
23. O'Connor PJ, Crain AL, Rush WA, Hanson AM, Fischer LR, Kluznik JC. Does diabetes double the risk of depression? *Ann Fam Med*. 2009;74:328-35.
24. Golden SH, Lazo M, Carnethon M, et al. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. *JAMA*. 2008;299:2751-9.
25. Kruse RL, Lemaster JW, Madsen RW. Fall and balance outcomes after an intervention to promote leg strength, balance, and walking in people with diabetic peripheral neuropathy: "feet first" randomized controlled trial. *Phys Ther*. 2010;90:1568-79.
26. Golden SH. A review of the evidence for a neuroendocrine link between stress, depression and diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 2007;3:252-9.
27. Clouse RE, Lustman PJ, Freedland KE, Griffith LS, McGill JB, Carney RM. Depression and coronary heart disease in women with diabetes. *Psychosom Med* 2003;65:376–83.
28. Abramson J, Berger A, Krumholz HM, Vaccarino V. Depression and risk of heart failure among older persons with isolated systolic hypertension. *Arch Intern Med* 2001;161:1725–30.
29. O'Neil A, Williams ED, Stevenson CE, Oldenburg B, Berk M, Sanderson K. Co-morbid cardiovascular disease and depression: sequence of disease onset is linked to mental but not physical self-rated health. Results from a cross-sectional, population-based study. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 2011; in press.
30. American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care*. 2007;1:S1–103.
31. Papelbaum M, Moreira RO, Coutinho W, Kupfer R, Zagury L, Freitas S, Appolinario JC. Depression, glycemic control and type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr*. 2011;3:26.
32. Roy A, Roy M, Janal M. Suicide attempts and ideation in African-American type 1 diabetic patients. *Psychiatry Res* 2010;179: 53–56
33. Pompili M, Pompili DL, Innamorati M, De Pisa E, Amore M, Ferrara C, Tatarelli R, Girardi P. Quality of Life and Suicide Risk. *Psychosomatics* 2009; 50:16–23.

34. Jzerman H, Schaper NC, Melai T, Meijer K, Willems PJB, Savelberg HHCM. Lower extremity muscle strength is reduced in people with type 2 diabetes, with and without polyneuropathy, and is associated with impaired mobility and reduced quality of life T. *Diabetes Res Clin Pract*. doi:10.1016/j.diabres.2011.10.026.
35. Bello AI, Owusu-Boakye E, Adegoke BOA, Adjei DN. Effects of aerobic exercise on selected physiological parameters and quality of life in patients with type 2 diabetes mellitus *Inter J Gen Med* 2011;4:723–727
36. Goodman E, Whitaker RC. A prospective study of the role of depression in the development and persistence of adolescent obesity. *Pediatrics* 2002;110:497-504.
37. Andersohn F, Schade R, Suissa S, Garbe E. Long-term use of antidepressants for depressive disorders and the risk of diabetes mellitus. *Am J Psychiatry* 2009;166:591-8.
38. Rao AA, Sridhar GR, Srinivas B, Das UN. Bioinformatics analysis of functional protein sequences reveals a role for brain-derived neurotrophic factor in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Med Hypotheses* 2008;70:424–49.

Tables

Table 1- Distribution of groups in terms of sociodemographic and clinical variables.

Variables	Factor	Patients (n=996)	Population (n=2145)	Test	Value
Age	Mean	55,0 a.	55,8 a.	t=	0,07
	S.D.	12,4 a.	12,6 a.		
Gender	Male	43,4 %	40,8 %	X ²	0,18
	Female	56,6 %	59,2 %	=1,83	
Marital Status	Single	12,0 %	12,3 %	X ²	0,73
	Married	46,0 %	43,8 %	=2,01	
	Stable	10,7 %	11,6 %		
	Separate	14,7 %	16,0 %		
	Widower	16,6 %	16,4 %		
Education	Incomplete Primary	6,6 %	7,3%	X ²	0,83
	Complete Primary	48,5 %	48,0 %	=2,11	

		Incomplete	19,1	18,2		
	Middle		%	%		
		Complete	16,4	16,0		
	Middle		%	%		
		Incomplete	2,4	2,2%		
	Superior		%			
		Complete	7,0	8,2%		
	Superior		%			
Cholesterol	Cholesterol	< 200mg/dl	35,3	47,4	X^2	0
			%	%	=40,47	,001*
Cholesterol	Total	≥ 200mg/dl	64,7	52,6		
			%	%		
Cholesterol	Cholesterol	< 100mg/dl	25,7	64,2	X^2	0
			%	%	=403,2	,001*
LDL	LDL	≥ 100mg/dl	74,3	35,8		
			%	%		
Hypertension	Hypertension	Present	63,4	35,8	X^2	0
			%	%	=209,3	,001*
Hypertension		Absent	36,6	64,2		
			%	%		
AMI	AMI	Present	9,8	6,7%	X^2	0
			%		=9,69	,002*
AMI		Absent	90,2	93,3		
			%	%		
Stroke	Stroke	Present	10,4	1,1%	X^2	0
			%		=154,0	,001*
Stroke		Absent	89,6	98,9		
			%	%		

AMI= Acute Myocardial Infarction; * p<0,05 comparison between patients and controls.

Table 2- Distribution of groups in the presence of mood boards adjusted by multivariate Poisson regression presented in prevalence and prevalence ratios (IC 95%)

Presence of:		P atients (n=996)	Pop ulation (n=2 145)	Adjuste d Ratio	P
Major Episode	Depressive	6 6,7%	24,0 %	1,5(1,44 -1,56)	0 ,001*
Recurrent Episode	Depressive	4 4,7%	6,7 %	1,5(1,42 -1,61)	0 ,001*
Symptoms Dysthymia	of	9 1,7%	5,5 %	2,35(2,3 0-2,40)	0 ,001*
Psychotic Disorder	Mood	2, 7%	0,2 %	1,02(1,0 1-1,03)	0 ,001*
Risk of Suicide Present		1 3,2%	2,1 %	1,1(1,08 -1,13)	0 ,001*

*p<0,05 comparison between patients and controls.

Table 3: Distribution among the 996 patients and the association between fasting glucose control, glycosylated hemoglobin with current prevalence of psychiatric problems and quality of life.

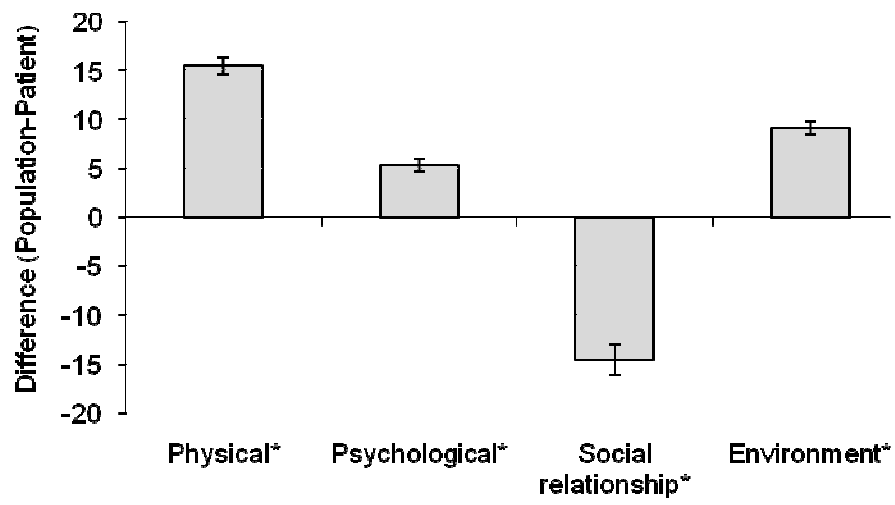
		Stati stically	Glucose	Hb1C
Psychiatric Disorder				
Major Episode	Depressive	OR(C I95%)	1,2 (0,90- 1,56)	1,2 (0,93- 1,58)
Recurrent Episode	Depressive	OR(C I95%)	1,2 (0,93- 1,58)	1,3(1,01- 1,68)*
Symptoms Dysthymia	of	OR(C I95%)	1,6 (1,02- 2,54)*	1,3 (0,81- 2,04)
Psychotic Disorder	Mood	OR(C I95%)	0,7 (0,23- 2,30)	4,1 (1,09- 15,1)*
Risk of Suicide Present		OR(C I95%)	2,3 (1,56- 3,23)**	1,0 (0,69- 1,46)
WHOQOL-BREF				
Physical Domain		MD(C I95%)	2,6(0,78- 4,41)**	7,6(5,96- 9,24)**
Psychological Domain		MD(C I95%)	-0,8(- 0,37-1,89)	0,5(-0,63- 1,61)
Social Domain		MD(C I95%)	-2,2(- 0,03-4,39)	-1,6(- 3,72-0,61)
Environment Domain		MD(C I95%)	-0,9(- 0,30-2,04)	-1,3(- 2,41-0,20)

OR= Odds Ratio; MD= Mean Differece (Controlled-Noncontrolled); CI= Confidence Interval ; *p<0,05; ** p<0,01

Legend of figure

Figure 1: Distribution of mean difference (column) and 95% confidence interval (dash) for scores in four domains of WHOQOL-BRIEF between patients (n = 996) and population (n=2145), *p<0,001.

Figure 1



5 ARTIGO II

Artigo publicado no periódico Metabolic Brain Disease, 2010

Brain energy metabolism parameters in an animal model of diabetes

Luciane B. Ceretta, Gislaine Z. Réus, Gislaine T. Rezin, Giselli Scaini; Emílio
L. Streck e João Quevedo

BRAIN ENERGY METABOLISM PARAMETERS IN AN ANIMAL MODEL OF DIABETES

Luciane B. Ceretta^a, Gislaine Z. Réus^a, Gislaine T. Rezin^b, Giselli Scaini^b;

Emílio L. Streck^b and João Quevedo^{a*}

^aLaboratório de Neurociências and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil;

^bLaboratório de Fisiopatologia Experimental and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil;

***Corresponding author:**

Prof. João Quevedo, MD, PhD
Laboratório de Neurociências,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde,
Universidade do Extremo Sul Catarinense,
88806-000 Criciúma, SC, Brazil
Fax: +55 48 3443 4817.
E-mail: quevedo@unesc.net

Abstract

A growing body of evidence has indicated that altered mitochondrial function may be involved in mechanism for the development of diabetic complications. Thus, we investigated whether animal model of diabetes induced by alloxan alters energy metabolism parameters. Wistar rats received one single injection of alloxan (250 mg/kg) and after fifteen days we evaluated mitochondrial respiratory chain complexes I, II, II-III and IV, creatine kinase and citrate synthase activities in prefrontal cortex, hippocampus and striatum. We observed that animal model of diabetes induced by alloxan increased complexes I and IV activities in hippocampus, complexes II and II-III activities in prefrontal cortex and striatum and complex IV in prefrontal cortex; however decreased complex IV activity in striatum. Moreover, diabetes rats decreased creatine kinase activity in striatum and increased citrate synthase activity in hippocampus. In conclusion, this study indicates that the alteration in mitochondrial function is probably involved in the pathophysiology of diabetes.

Keywords: mitochondrial respiratory chain; creatine kinase; citrate synthase; diabetes

Introduction

Diabetes mellitus (DM) comprises a group of chronic metabolic disorders characterized by hyperglycemia as a result of complete lack of insulin, a relative lack of insulin or insulin resistance (Robles and Singh-Franco, 2009). Type 1 and type 2 diabetes mellitus are the more common forms of diabetes (Giuffrida and Reis, 2005).

The prevalence of DM has increased in recent years, principally due to the great number of patients with type 2 diabetes, which is related to the prevalence of obesity and sedentary lifestyle (Zimmet et al., 2001; Junior et al., 2009). DM affects more than 150 million people worldwide and is expected to double over the next 20 years, almost exclusively due to an increase in the prevalence of type-2 diabetes mellitus (King et al., 1998).

Even though cardiovascular complications are a major cause of morbidity and mortality in patients with diabetes, this disease has also been associated with several cancers (Wideroff et al., 1997; El-Serag et al., 2001; Hassan et al., 2002; Jamal et al., 2009). Moreover DM is associated neurodegeneration (De La Monte, 2009), with moderate cognitive deficits and neurophysiological and structural changes in the brain (Biessels et al., 2002). Psychiatric manifestations seem to accompany this encephalopathy, since the prevalence of depression is as high as 39% in diabetic patients, much higher than in the general population (Gavard et al., 1993; Téllez-Zentero and Cardiel, 2002). Oxidative stress may play a role in the development of diabetes complications (Imaeda et al., 2001; Behr et al., 2008; Forgiarini et al., 2009) and oxidative stress may play a central role in the individual susceptibility to diabetic nephropathy (Ceriello et al., 2000). It is well known that the reactive oxygen species

cause damage in the mitochondrial oxidative phosphorylation system and that reactive oxygen species itself is vulnerable the mitochondrial dysfunction (Adam-Vizi, 2005; Navarro and Boveris, 2007). In addition, mitochondria function is altered in the pathophysiology of diabetes (Ritov et al., 2005; Friederich et al., 2009; Hernández-Alvarez et al., 2009; Ritov et al., 2009; Robol et al., 2009).

Many experimental models have so far been developed to determine the possible pharmacological targets of the disease and to better evaluate diabetes associated complications (Srinivasan and Romarao, 2007; Franconi et al., 2008). Experimental diabetes models can be induced by chemicals that selectively destroy the insulin-producing β -cells in the pancreas. One of the most used chemicals is alloxan (AL, 2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) (Szkudelski, 2001; Behr et al., 2008).

In this context, the main objective of our study was to evaluate the effects of animal model of diabetes induced by alloxan in the citrate synthase, mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities.

Experimental Procedures

Animals

Male Adult Wistar rats (60 days old) were obtained from UNESC (Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil) breeding colony. They were housed five per cage with food and water available *ad libitum* and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM). All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care and with approval by local Ethics Committee under protocol number 16/2010.

Diabetes Induction

Diabetes was induced in rats by using a single intraperitoneal injection of alloxan from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) dissolved in saline physiological (0.9% NaCl) solution (150 mg/kg), whereas the control group received only saline injection (Behr et al., 2008). Both groups were injected after an 18-h fasting period (60–70 mg/dL blood glucose). Fasting animals are more susceptible to alloxan probably due to partial protection by increased blood glucose (Szkudelski, 2001). All induced rats showed hyperglycemia (400–600 mg/dL) 48 h after alloxan administration. During the experiment, the blood glucose level was monitored daily with commercial kit by performing a small puncture at the tail. This methodology is quick and noninvasive, subjecting the rats to a negligible stress. At the end of the study, rats with glycemia between 400 and 600 mg/dL were considered diabetic (Behr et al., 2008). Fifteen days after induction, all rats were weighted and killed by decapitation, and the skulls were removed immediately after the death of animals and hippocampus, prefrontal cortex and striatum and kept at -70°C .

Tissue and homogenate preparation

Hippocampus, prefrontal cortex and striatum were homogenized (1:10, w/v) in SETH buffer, pH 7.4 (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 50 IU/ml heparin). The homogenates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min and the

supernatants were kept at -70°C until it will be used for enzyme activity determination. Protein content was determined by the method described by Lowry et al (1951), using bovine serum albumin as standard.

Respiratory chain enzyme activities

NADH dehydrogenase (complex I) was evaluated by the method described by Cassina and Radi (1996) by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at 420 nm. The activity of succinate: Cytochrome *c* oxidoreductase (complexes II–III) were determined according to the method of Fischer et al. (1985), measured by Cytochrome *c* reduction from succinate. The activity of Cytochrome *c* oxidase (complex IV) was assayed according to the method described by Rustin et al. (1994), measured by following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced Cytochrome *c* at 550 nm. The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes were expressed as nmol/min x mg protein.

Creatine Kinase Activity

Creatine kinase activity was measured in brain homogenates pre-treated with 0.625 mM lauryl maltoside. The reaction mixture consisted of 60 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 7 mM phosphocreatine, 9 mM MgSO_4 and approximately 0.4–1.2 μg protein in a final volume of 100 μl . After 15 min. of preincubation at 37°C , the reaction was started by the addition of 0.3 μmol of ADP plus 0.08 μmol of reduced glutathione. The reaction was stopped after 10 min. by the addition of 1 μmol of hydroxymercuribenzoic acid. The creatine formed was estimated according to the colorimetric method of Hughes (1962). The color was developed by the addition of

100 μ L 2% α -naphthol and 100 μ L 0.05% diacetyl in a final volume of 1 mL and read spectrophotometrically after 20 minutes at 540 nm. Results were expressed as nmol/min x mg protein.

Citrate synthase activity

Citrate synthase activity was assayed according to the method described by Shepherd and Garland (1969). The reaction mixture contained 100 mM Tris, pH 8.0, 100 mM acetyl CoA, 100 mM 5,5'-di-thiobis-(2- nitrobenzoic acid), 0.1% triton X-100, and 2–4 μ g supernatant protein and was initiated with 100 μ M oxaloacetate and monitored at 412 nm for 3 min at 25°C. Results were expressed as nmol TNB/min x mg protein.

Statistical analysis

Data were analyzed by Student's t-test for unpaired data and are expressed as mean \pm standard deviation. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software version 16.0.

Results

As depicted in Fig. 1, complex I activity increased in hippocampus of rats diabetes induced (Fig. 1A; $p < 0.05$). Moreover, complexes II and II-III activities were significantly increased in prefrontal and striatum of rats diabetes induced, compared to control group (Fig. 1B; C; $p < 0.05$). In addition, alloxan increased complex IV activity in prefrontal cortex and hippocampus; however in the complex IV activity was

inhibited in striatum of rats diabetes induced compared to control group (Fig. 1D; $p < 0.05$).

The animal model of diabetes induced by alloxan inhibited creatine kinase activity in striatum of rats (Fig. 2; $p < 0.05$).

The citrate synthase activity increased in hippocampus of rats submitted to animal model of diabetes by alloxan (Fig. 3; $p < 0.05$).

Discussion

In the present study we evaluated the effects of the animal model of diabetes induced by alloxan on mitochondrial respiratory chain complexes I, II, II-III and IV, creatine kinase and citrate synthase activities in prefrontal cortex, hippocampus and striatum. We showed that alloxan increased complexes I and IV activities in hippocampus, complexes II and III activities in prefrontal cortex and striatum and complex IV in prefrontal cortex; however decreased complex IV activity in striatum. Moreover, diabetes rats decreased creatine kinase activity in striatum and increased citrate synthase activity in hippocampus from diabetic animals induced by alloxan.

The use of alloxan to induce diabetes in experimental animal models has been extensively studied, and is quite well characterized now (Szkudelski, 2001; Behr et al., 2008). The alloxan mechanism of action is in part characterized by the involvement of reactive oxygen species and consequently oxidative stress (Heikkila et al., 1976). In fact, the reactive species of thiobarbituric acid (TBARS) index was increased in the liver of rats that received a single intraperitoneal injection of alloxan (150 mg/kg) (Behr et al., 2008). Additionally, Haeser et al. (2007) also showed

increases of TBARS in plasma and hippocampus and decreases of total antioxidant reactivity in plasma from diabetic animals induced by streptozotocin. In fact, free radicals are frequently associated with aging and disease, and mitochondria are a major source and target of these damaging molecular oxidants (Dickinson et al., 2009).

Diabetes is a metabolic disease characterized by a chronic hyperglycemic status that may modify central nervous system functions (Bellush et al., 1991). Several studies have showed relationship between diabetes and mitochondrial function (Edwards et al., 2010; Liu et al., 2009; Lu et al., 2009; Ritov et al., 2009; Schiff et al., 2009). The role of mitochondria in disease pathogenesis came from a report by Luft and colleagues almost 50 years ago of a patient with severe hypermetabolism and weight loss (Luft et al., 1962).

The primary role of mitochondria is to convert the products of carbohydrate, protein, and fat metabolism to CO₂ and H₂O, using key enzymes of the electron transport chain (Johannsen and Ravussin, 2009).

Tissues with high energy demands, such as the brain, contain a large number of mitochondria, being therefore more susceptible to reduction of the aerobic energy metabolism (Beal, 1992). In the present study we demonstrated that animal model of diabetes induced changes in mitochondrial respiratory chain complexes.

Mitochondrial dysfunction has also been implicated in the pathogenesis of insulin resistance related to type 2 diabetes (Johannsen and Ravussin, 2009). Much of this study has been done in isolated mitochondria from muscle biopsy tissue of insulin-resistant individuals, and has demonstrated reduced levels of mRNA for mitochondrial genes (Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003; Morino et al., 2005;

Heilbron et al., 2007), decreased mtDNA (Ritov et al., 2005; Boushel et al., 2007), lower protein expression of respiratory chain subunits (Heilbronn et al., 1999; Lu et al., 2009), reduced oxidative enzyme activities and decreased mitochondrial size and density (Kelley et al., 1999; Heilbronn et al., 2007; Morino et al., 2005; Ritov et al., 2005). Impaired basal and insulin-stimulated mitochondrial metabolism in vivo was also demonstrated in patients with type 2 diabetes (Schrauwen-Hinderling et al., 2007; Szendroedi et al., 2009). In addition, decreased muscle mitochondrial activity has been reported in type 2 diabetes patients and in mouse model of diabetes (Schiff et al., 2009). Moreover, Ritov et al., (2010) showed that the specific activity of NADH-oxidase and NADH-oxidase/citrate synthase and NADH-oxidase/beta-HAD ratios were reduced by 2-3 folds in both type 2 diabetes and obesity patients.

In this study we also showed increase in citrate synthase activity in the hippocampus of rats and decrease in creatine kinase activity in the striatum of rats submitted to animal model of diabetes.

Creatine kinase is important for normal energy homeostasis by exerting several integrated functions, such as temporary energy buffering, metabolic capacity, energy transfer and metabolic control and it is well described that inhibition of creatine kinase activity has been implicated in the pathogenesis of a number of diseases, especially in the brain (Khuchua et al., 1998; Schlattner and Wallimann, 2000). Citrate synthase is an enzyme that inhibited by high amounts of ATP, acetyl CoA and NADH, when the cell energy supply is high. This regulation ensures that Krebs cycle will not oxidise an excess of pyruvate and acetyl CoA when ATP concentrations in the cell are high (Sheperd and Garland, 1960). In addition, citrate

synthase has been used as a quantitative enzyme marker for the presence of intact mitochondria (Marco et al., 1974).

In conclusion, considering that mitochondrial respiratory chain complexes, creatine kinase and citrate synthase play an important role in brain energy metabolism and that mitochondrial dysfunction is probably involved in the pathophysiology of diabetes.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq-Brazil – JQ, ELS), from the Instituto Cérebro e Mente (JQ) and UNESC (JQ and ELS). JQ and ELS are recipients of CNPq (Brazil) Productivity fellowships. GZR is holder of a FAPESC/CAPES studentship.

Reference List

- Adam-Vizi, V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid. Redox Signal.* 7:1140-1149.
- Beal, M.F. (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurological illnesses? *Ann. Neurol.* 31:119–130.
- Behr, G.A., da Silva, E.G., Ferreira, A.R., Cerskib, C.T.S., Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F. (2008). Pancreas b-cells morphology, liver antioxidant enzymes and liver oxidative parameters in alloxan-resistant and alloxan-susceptible Wistar rats: a viable model system for the study of concepts into reactive oxygen species. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22:657–666.

- Bellush, L.L., Reid, S.G., North, D. (1991). The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. *Physiol. Behav.* 50: 973–981.
- Biessels, G.J., Van Der Heide, L.P., Kamal, A., Bleys, R.L., Gispen, W.H. (2002). Aging and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* 441:1–14.
- Boushel, R., Gnaiger, E., Schjerling, P., Skovbro, M., Kraunsoe, R., Dela, F. (2007). Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle. *Diabetologia* 50:790-796.
- Cassina, A., Radi, R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 328: 309–316.
- Ceriello, A., Morocutti, A., Mercuri, F., Quagliaro, L., Moro, M., Damante, G., Viberti, G.C. (2000). Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* 49:2170–2177.
- De La Monte, S. (2009). Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB reports* 42:475-481.
- Dickinson, B.C., Srikun, D., Chang, C.J. (2009). Mitochondrial-targeted fluorescent probes for reactive oxygen species. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14:1–7.
- Edwards, J.L., Quattrini, A., Lentz, S.I., Figueroa-Romero, C., Cerri, F., Backus, C., Hong, Y., Feldman, E.L. (2010). Diabetes regulates mitochondrial biogenesis and fission in mouse neurons. *Diabetologia.* 53:160-169.
- El-Serag, H.B., Richardson, P.A., Everhart, J.E. (2001). The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States Veterans. *Am. J. Gastroenterol.* 96:2462-2467.
- Fischer, J.C., Ruitenbeek, W., Berden, J.A., Trijbels, J.M., Veerkamp, J.H., Stadhouders, A.M., Sengers, R.C., Janssen, A.J. (1985). Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin. Chim. Acta* 153:23–26.
- Franconi, F., Seghieri, G., Canua, S., Straface, E., Campesi, I., Malorni, W. (2008). Are the available experimental models of type 2 diabetes appropriate for a gender perspective? *Pharmacol. Res.* 57:6–18.
- Frier, B.C., Williams, D.B., Wright, D.C. (2009). The effects of apelin treatment on skeletal muscle mitochondrial content. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297:1761-1768.
- Gavard, J.A., Lustman, P.J., Clouse, R.E. (1993). Prevalence of depression in adults with diabetes. *Diabetes Care* 16:1167–1178.
- Giuffrida, F.M., Reis, A.F. (2005). Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Obes. Metab.* 7:318–326.

- Haeser, A.S., Sittac, A. Barschakc, A.G., Deonc, M., Bardenb, A.T., Schmittb, G.O., Landgraff, S., Gomeze, R., Barrose, H.M.T., Vargasa, C.R. (2007). Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test: the clonazepam effect. *Brain Res.* 1154:137-143.
- Hassan, M.M., Hwang, L.Y., Hatten, C.J., Swaim, M., Li D., Abbruzzese, J.L., Beasley, P., Patt, Y.Z. (2002). Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 36:1206-1213.
- Heikkila, R.E., Winston, B., Cohen, G., Barden, H. (1976). Alloxan induced diabetes, evidence for hydroxyl radicals as a cytotoxic intermediate. *Biochem. Pharmacol.* 25:1085–1092.
- Heilbronn, L.K., Gan, S.K., Turner, N., Campbell, L.V., Chisholm, D.J. (2007). Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92:1467-1473.
- Heilbronn, L.K., Gan, S.K., Turner, N., Campbell, L.V., Chisholm, D.J. (2007). Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92:1467-1473.
- Hernández-Alvarez, M.I., Chiellini, C., Manco, M., Naon, D., Liesa, M., Palacín, M., Mingrone, G., Zorzano, A. (2009). Genes involved in mitochondrial biogenesis/function are induced in response to bilio-pancreatic diversion in morbidly obese individuals with normal glucose tolerance but not in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 52:1618-1627.
- Hughes, B.P. (1962). A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin. Chim. Acta* 7:597–604.
- Imaeda, V., Aoki, T., Kondo, Y., Hori, M., Ogata, M., Obayashi, H., Hasegawa, G., Nakamura, N., Tokuda, K., Nishino, H., Yoshikawa, T., Kondo, M., (2001). Protective effects of fluvastatin against reactive oxygen species induced DNA damage and mutagenesis. *Free Radic. Res.* 34:33–44.
- Jamal, M.M., Yoon, E. Vega, K.J., Hashemzadeh, M., Chang, K.J. (2009). Diabetes mellitus as a risk factor for gastrointestinal cancer among American veterans. *World J. Gastroenterol.* 15:5274-5278.
- Johannsen, D.L., Ravussin, E. (2009). The role of mitochondria in health and disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9:780–786.
- Junior, L.A.F., Kretzmann, N.A., Porawski, M., Dias, A.S., Marroni, N.A.P. (2009). Experimental diabetes mellitus: oxidative stress and changes in lung structure. *J. Bras. Pneumol.* 35:788-791.

- Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V., Ritov, V.B. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944-2950.
- Khuchua, Z.A., Qin, W., Boero, J., Cheng, J., Payne, R.M., Saks, V.A., Strauss, A.W. (1998). Octamer formation and coupling of cardiac sarcomeric mitochondrial creatine kinase are mediated by charged N-terminal residues. *J. Biol. Chem.* 273:22990–22996.
- King, H., Aubert, R.E., Herman, W.H. (1998). Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414–1431.
- Liu, S., Okada, T., Assmann, A., Soto, J., Liew, C.W., Bugger, H., Shirihai, O.S., Abel, E.D., Kulkarni, R.N. (2009). Insulin signaling regulates mitochondrial function in pancreatic beta-cells. *PLoS One.* 4:7983.
- Lowry, O.H., Rosebough, N.G., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
- Lu, H., Koshkin, V., Allister, E.M., Gyulhandanyan, A.V., Wheeler, M.B. (2009). Molecular and metabolic evidence for mitochondrial defects associated with β -cell dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes.* 53:448-459.
- Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., Afzelius, B. (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J. Clin. Invest.* 41:1776-1804.
- Marco, R., Pestaña, A., Sebastian, J., Sols, A. (1974). Oxaloacetate metabolic crossroads in liver. Enzyme compartmentation and regulation of gluconeogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 3:53-70.
- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M.J., Patterson, N., Mesirov, J.P., Golub, T.R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E.S., Hirschhorn, J.N., Altshuler, D., Groop, L.C. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34:267-273.
- Morino, K., Petersen, K.F., Dufour, S., Befroy, D., Frattini, J., Shatzkes, N., Neschen, S., White, M.F., Bilz, S., Sono, S., Pypaert, M., Shulman, G.I. (2005). Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J. Clin. Invest.* 115:3587-3593.
- Navarro, A., Boveris, A. (2007). The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292:670-686.
- Patti, M.E., Butte, A.J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, J., Costello, M., Saccone, R., Landaker, E.J., Goldfine, A.B., Mun, E., DeFronzo, R., Finlayson, J., Kahn, C.R., Mandarino, L.J. (2003). Coordinated

reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100:8466-8471.

Rabol, R., Højberg, P.M., Almdal, T., Boushel, R., Haugaard, S.B., Madsbad, S., Dela, F. (2009). Effect of hyperglycemia on mitochondrial respiration in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:1372-1378.

Ritov, V.B., Menshikova, E.V., He, J., Ferrell, R.E., Goodpaster, B.H., Kelley, D.E. (2005). Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 54:8-14.

Ritov, V.B., Menshikova, E.V., Azuma, K., Wood, R.J., Toledo, F.G., Goodpaster, B.H., Ruderman, N.B., Kelley, D.E. (2009). Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* in press.

Robles, G.I., Singh-Franco, D. (2009). A review of exenatide as adjunctive therapy in patients with type 2 diabetes. *Drug Des. Devel. Ther.* 21:219-240.

Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., Munnich, A. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228:35–51.

Schiff, M., Loublier, S., Coulibaly, A., Bénit, P., Ogier de Baulny, H., Rustin, P. (2009). Mitochondria and diabetes mellitus: untangling a conflictive relationship? *J Inherit Metab Dis.* 32:684-698.

Schlattner, U., Wallimann, T. (2000). Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. *J. Biol. Chem.* 275: 17314–17320.

Schrauwen-Hinderling, V.B., Kooi, M.E., Hesselink, M.K., Jeneson, J.A., Backes, W.H., van Echteld, C.J., van Engelshoven, J.M., Mensink, M., Schrauwen, P. (2007). Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects. *Diabetologia* 50:113-120.

Shepherd, D., Garland, P.B. (1969). The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 114:597--610.

Srinivasan, K., Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: An overview *Indian. J. Med. Res.* 125:451-472.

Szendroedi, J., Schmid, A.I., Chmelik, M., Toth, C., Brehm, A., Krssak, M., Nowotny, P., Wolzt, M., Waldhausl, W., Roden, M. (2007). Muscle mitochondrial ATP synthesis and glucose transport/ phosphorylation in type 2 diabetes. *PLoS Med.* 4:154.

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50:536–546.

Télléz-Zentero, J.F., Cardiel, M.H. (2002). Risk factors associated with depression in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch. Med. Res.* 33:53–60.

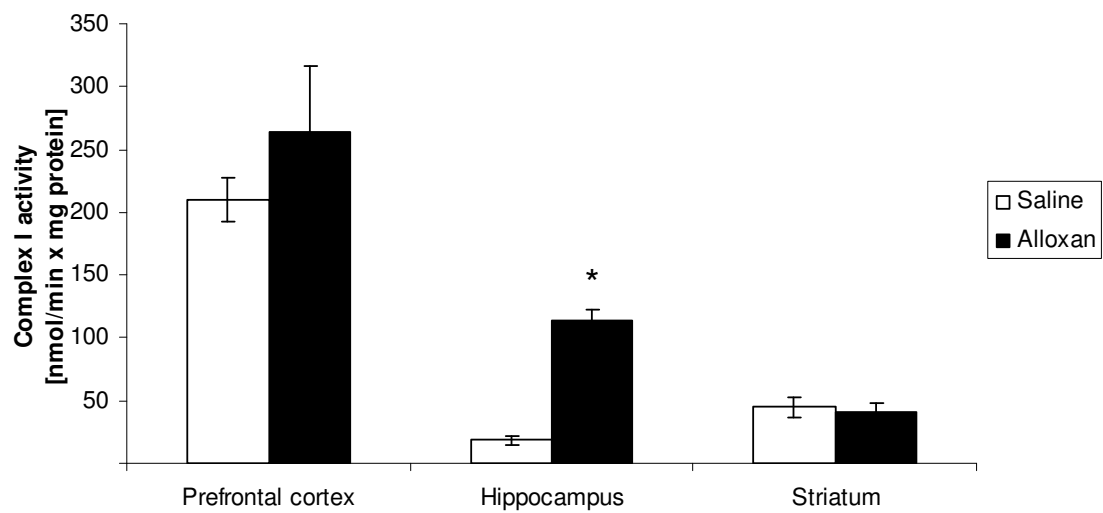
Wideroff, L., Gridley, G., Mellekjaer, L., Chow, W.H., Linet, M., Keehn, S. Borch-Johnsen, K., Olsen, J.H. (1997). Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. *J. Natl. Cancer Inst.* 89:1360-1365.

Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787.

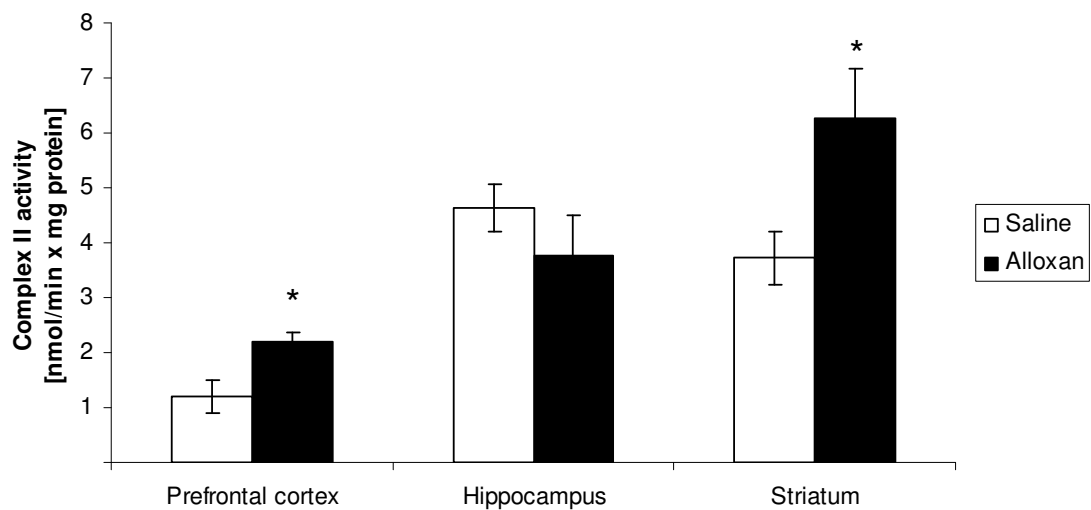
FIGURES

Figure 1

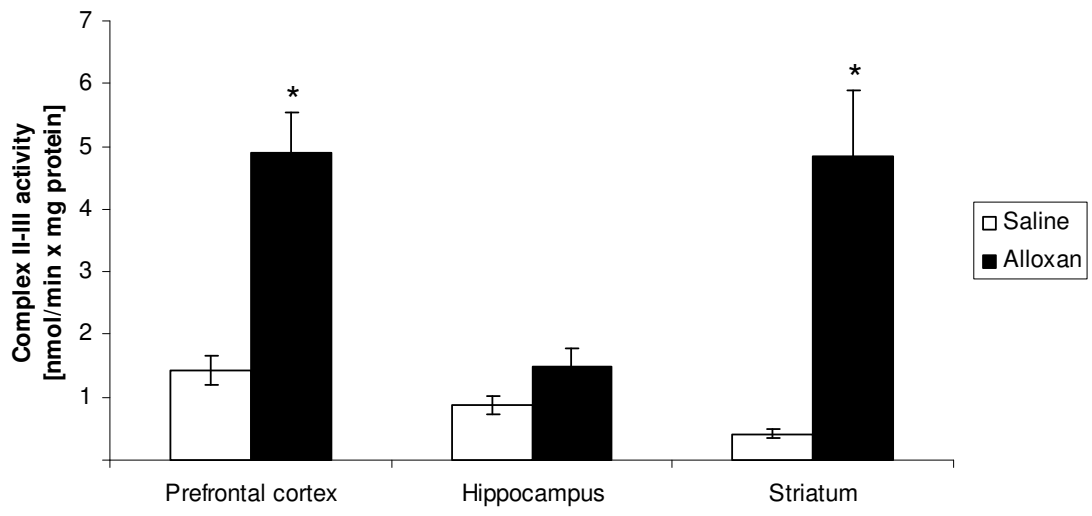
A



B



C



D

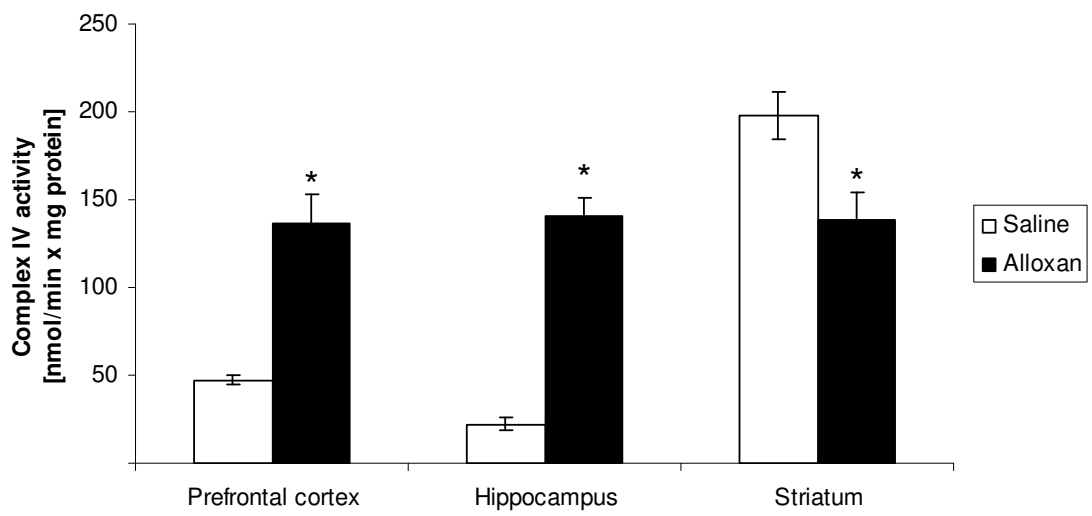


Figure 2

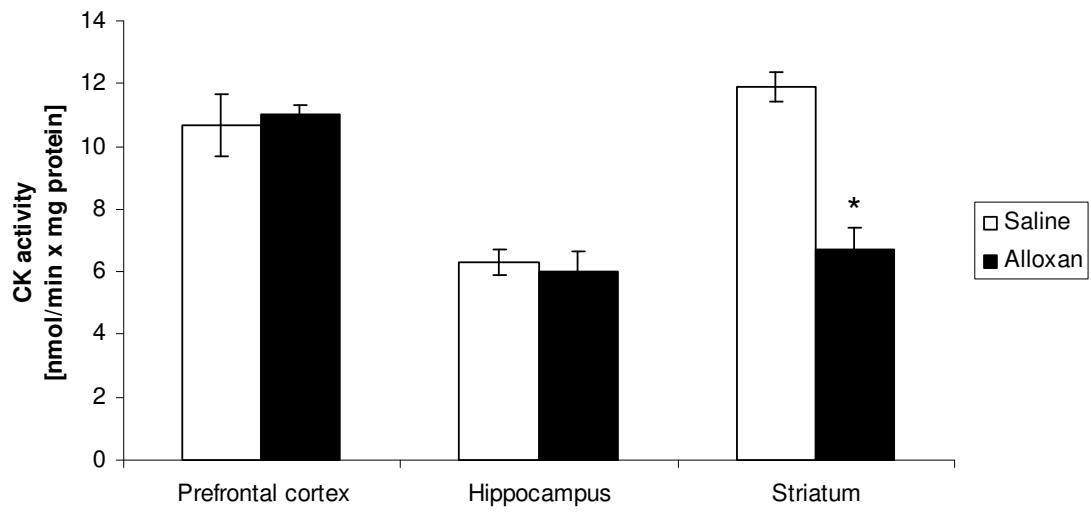
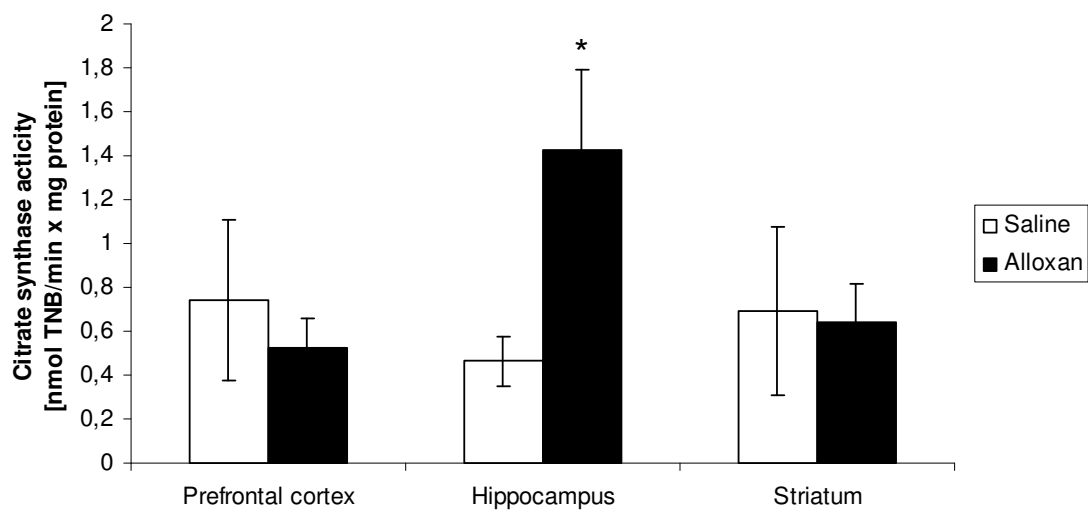


Figure 3



LEGEND OF FIGURES

Figure 1: Complex I (A); II (B); III (C) and IV (D) activities in prefrontal cortex, hippocampus and striatum of rats subjected to animal model of diabetes induced by alloxan. Values are expressed as mean±S.D. (n = 5). Different from saline; * $p < 0.05$, according to Student t-test.

Figure 2: Creatine kinase activity in prefrontal cortex, hippocampus and striatum of rats subjected to animal model of diabetes induced by alloxan. Values are expressed as mean±S.D. (n = 5). Different from saline; * $p < 0.05$, according to Student t-test.

Figure 3: Citrate synthase activity in prefrontal cortex, hippocampus and striatum of rats subjected to animal model of diabetes induced by alloxan. Values are expressed as mean±S.D. (n = 5). Different from saline; * $p < 0.05$, according to Student t-test.

6 ARTIGO III

Artigo submetido para publicação no periódico Experimental Diabetes Research, 2011.

Animal model of diabetes induces oxidative damage and imbalance on antioxidant enzymes in the rat brain, but does not induce memory impairment

Luciane B. Ceretta, Gislaine Z. Réus, Helena M. Abelaira, Karine F. Ribeiro, Giovanni Zappellini, Francine F. Felisbino, Amanda V. Steckert, Felipe Dal-Pizzol e João Quevedo

**ANIMAL MODEL OF DIABETES INDUCES OXIDATIVE DAMAGE AND
IMBALANCE ON ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE RAT BRAIN, BUT DOES NOT
INDUCE MEMORY IMPAIRMENT**

Luciane B. Ceretta^a, Gislaine Z. Réus^{a*}, Helena M. Abelaira^a, Karine F.
Ribeiro^a; Giovanni Zappellini^a, Francine F. Felisbino^b, Amanda V. Steckert^{a,b}, Felipe
Dal-Pizzol^b, and João Quevedo^a

^aLaboratório de Neurociências and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil;

^bLaboratório de Fisiopatologia Experimental and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil.

***Corresponding author:**

Gislaine Z. Réus, PhD
Laboratório de Neurociências,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde,
Universidade do Extremo Sul Catarinense,
88806-000 Criciúma, SC, Brazil
Fax: +55 48 34312736.
E-mail: gislainezilli@hotmail.com

Abstract

Diabetes mellitus is associated with pathological changes in the central nervous system (SNC), as well alterations in oxidative stress. Thus, the main objective of this study was to evaluate the effects of the animal model of diabetes induced by alloxan on memory and oxidative stress. Diabetes was induced in Wistar rats by using a single injection of alloxan (150 mg/kg), and fifteen days after induction, the rats memory was evaluated through the use of the object recognition task. The levels of superoxide and thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production were measured in submitochondrial particles, TBARS and carbonyl oxidation, and the activity of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in the rat brain were also measured. The results showed that the animal model of diabetes induced by alloxan did not alter recognition memory. However, in diabetic rats there was an increase in the superoxide levels in the prefrontal cortex, in the TBARS in the prefrontal cortex and in the amygdala in the submitochondrial particles. Also, there was an increase in the protein oxidation in the hippocampus and striatum and in the TBARS oxidation in the striatum and amygdala. The SOD activity was decreased in diabetic rats in the striatum and amygdala. However, the CAT activity was increased in the hippocampus from diabetic rats. In conclusion, our findings illustrate that the animal model of diabetes induced by alloxan did not alter recognition memory, but it produced oxidants and an imbalance between SOD and CAT activities, which could contribute to pathophysiology of diabetes.

Keywords: oxidative stress, antioxidant enzyme, memory, diabetes.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a heterogeneous metabolic disorder characterized by hyperglycemia [1]. In type 1 diabetes (DM1), which generally develops at a young age (children, early adulthood), the principal defect is an auto immune-mediated destruction of pancreatic cells, leading to insulin deficiency [2]. In type 2 diabetes (DM2) the principal defect is insulin resistance, leading to a relative insulin deficiency [3]. In both the human and animal models, DM is associated with pathological changes in the central nervous system (CNS) that lead to cognitive and affective deficits and to an increased risk for brain vascular complications [3]. In the animal models of diabetes, several brain alterations have been described, such as increased hippocampal astrocytic reactivity, impaired synaptic plasticity, vascular changes, decreased dendritic complexity and disturbed neurotransmission [4].

Recently, a significant body of evidence accumulated to indicate that diabetes has detrimental effects on brain function. A number of investigations have been performed to indicate that memory loss is a consequence of both type I and type II diabetes [5]. Some authors have also reported a reduction in the length and a simplification of the dendritic trees of the hippocampal pyramidal cells in diabetic rodents [4]. There is evidence from the animal models showing that changes in dendritic morphology, probably associated with synaptic disturbances, correlate with alterations in memory and learning abilities [6]. Mitochondria are the principal source of reactive oxygen species (ROS) in cells, as the result of imperfectly coupled electron transport. Oxidative stress is widely accepted as playing a key mediatory role in the development and progression of diabetes and its complications due to the

increased production of free radicals and impaired antioxidant defenses [7]. Several mechanisms can contribute to increased oxidative stress in diabetic patients, especially the chronic exposure to hyperglycemia. Accumulated evidence points out that hyperglycemia can lead to elevated ROS and reactive nitrogen species (RNS) production by the mitochondrial respiratory system [8], glucose autoxidation [9], activation of the polyol pathway [10], formation of advanced glycation end-products (AGEs) [11], antioxidant enzyme inactivation [12] and imbalance of glutathione redox status [13]. Hyperglycemia can promote an important oxidative imbalance, favoring the production of free radicals and the reduction of antioxidant defenses. At high concentrations, ROS/RNS can lead to damage of the major components of the cellular structure, including nucleic acids, proteins, amino acids and lipids [14]. Such oxidative modifications in the diabetes condition would affect several cell functions, metabolism and gene expression, which can cause other pathological conditions [15].

Studies linking diabetes, memory and oxidative stress in brain tissue have not been fully characterized. In this context, the main objective of our study was to evaluate the effects of the animal model of diabetes induced by alloxan on the object recognition task and on the parameters of oxidative stress in the hippocampus, striatum, prefrontal cortex and amygdala.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Male Adult Wistar rats (60 days old) were obtained from the UNESC (Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil) breeding colony. They were housed five per cage with food and water available *ad libitum* and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care and with approval by the local Ethics Committee under protocol number 16/2010.

2.2 Diabetes Induction

Diabetes was induced in rats by using a single intraperitoneal injection of alloxan from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) dissolved in saline physiological (0.9% NaCl) solution (150 mg/kg), whereas the control group received only saline injection [16]. Both groups were injected after an 18-h fasting period (60–70 mg/dL blood glucose). Fasting animals are more susceptible to alloxan probably due to partial protection by increased blood glucose [17]. All induced rats showed hyperglycemia (400–600 mg/dL) 48 h after alloxan administration. During the experiment, the blood glucose level was monitored daily with commercial kits by performing a small puncture at the tail. This methodology is quick and noninvasive, subjecting the rats to a negligible level of stress. At the end of the study, rats with

glycemia between 400 and 600 mg/dL were considered diabetic [18]. Fifteen days after induction, all rats were submitted to the object recognition task.

2.3 Object recognition task

The object recognition task took place in a 40×60 cm open field surrounded by 50 cm high walls made of ply wood with a frontal glass wall. The floor of the open field was divided into 12 equal rectangles by black lines. All animals (alloxan or saline; n=10-15 animals per group) were submitted to a habituation session where they were allowed to freely explore the open field for 5 min. No objects were placed in the box during the habituation trial. Twenty-four hours after habituation, training was conducted by placing the individual rats in the open field for 5 min, in which two identical objects (objects A1 and A2; both being cubes) were positioned in two adjacent corners, 10 cm from the walls. In a short-term recognition memory test given 1.5 h after training, the rats explored the open field for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B, a rectangle). In a long-term recognition memory test given 24 h after training, the rats explored the open field for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (C, a pyramid with a square-shaped base) object. All objects had similar textures (smooth), colors (blue), and sizes (weight 150–200 g) but distinctive shapes. A recognition index calculated for each animal was calculated in the test session, it reports the ratio $TB/(TA + TB)$ (TA = time spent exploring the familiar object A; TB = time spent exploring the novel object B) and it reports the ratio $TC/(TA + TC)$ (TA = time spent exploring the familiar object A; TC = time spent exploring the novel object C). Between trials, the objects were washed with 10%

ethanol solution. Exploration was defined as sniffing (exploring the object 3–5 cm away from it) or touching the object with the nose and/or forepaws [19].

2.4 Oxidative stress parameters

Immediately after the object recognition task, the animals were sacrificed by decapitation and the brain areas; the prefrontal cortex, amygdala, hippocampus and striatum (n=4-6 animals per group) were dissected according to the stereotaxic atlas [20] in ice-cold buffer in a Petri dish, and submitochondrial particles were prepared in parallel from the four brain regions of each animal. For biochemical analysis in total tissue, the brain structures were rapidly frozen and stored at -70°C.

2.4.1 Mitochondrial isolation

Rat brain homogenates were centrifuged at 700g for 10 min to discard nuclei and cell debris and the pellet was washed to enrich the supernatant that was centrifuged at 700g for 10 min. The obtained pellet, washed and resuspended in the same buffer, was considered to consist mainly of intact mitochondria able to carry out oxidative phosphorylation. The operations were carried out at 0–2°C. Submitochondrial particles (SMP) were obtained by the freezing and thawing (three times) of isolated mitochondria. For superoxide production measurements, SMP were washed twice with 140 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) and suspended in the same medium [21].

2.4.2 Superoxide production in submitochondrial particles of the rat brain

Superoxide production was determined in washed brain SMP using a spectrophotometric assay based on superoxide-dependent oxidation of epinephrine to adrenochrome at 37°C ($\epsilon_{480\text{nm}} = 4.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The reaction medium consisted of 0.23 M mannitol, 0.07 M sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), SMP (0.3–1.0 mg protein/ml), 0.1 μM catalase, and 1 mM epinephrine. NADH (50 μM) and succinate (7 mM) were used as substrates and rotenone (1 μM) and antimycin (1 μM) were added as specific inhibitors, respectively, to assay O_2^- production at the NADH dehydrogenase and at the ubiquinone–cytochrome b region. Superoxide dismutase (SOD) was used at 0.1–0.3 μM final concentration to give assay specificity [22].

2.4.3. Thiobarbituric acid reactive species formation

To determine oxidative damage in lipid, we measured the formation of Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction, as previously described [23]. The samples were mixed with 1 ml of trichloroacetic acid 10% and 1 ml of thiobarbituric acid 0.67%, and then heated in a boiling water bath for 30 min. Malondialdehyde equivalents were determined in tissue and in submitochondrial particles of the rat brain spectrophotometrically by the absorbance at 532 nm.

2.4.4. Carbonyl protein formation

The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups content based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described [24]. Proteins were precipitated by the addition of 20%

trichloroacetic acid and were redissolved in DNPH. The absorbance was monitored spectrophotometrically at 370 nm.

2.4.5. Superoxide dismutase activity

This method for the assay of superoxide dismutase (SOD) activity is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on O_2^{-2} ; a substrate for SOD [25]. The inhibition of autoxidation of this compound thus occurs when SOD is present, and the enzymatic activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm, using a double-beam spectrophotometer with temperature control. A calibration curve was performed using purified SOD as the standard, in order to calculate the specific activity of SOD present in the samples. A 50% inhibition of pyrogallol autoxidation is defined as 1 unit of SOD, and the specific activity is represented as units per mg of protein.

2.4.6. Catalase activity

The catalase (CAT) activity was assayed using a double-beam spectrophotometer with temperature control. This method is based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H_2O_2 , 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1– 0.3 mg protein/ml [26]. One CAT unit is defined as 1 mol of hydrogen peroxide consumed per minute, and the specific activity is reported as units per mg protein.

2.4.7. Protein determination

All biochemical measures were normalized to the protein content with bovine albumin as standard [27].

2.5 Statistical analysis

In the open field test, the differences between training test sessions were analyzed by the paired Student's *t*-test. Data for recognition indexes are reported as median \pm interquartile ranges (25 and 75). Comparisons among groups were performed using the Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test when necessary. The oxidative stress parameters were analyzed by Student's *t*-test for unpaired data and are reported as mean \pm S.E.M.P values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

As depicted in Fig. 1 in the object recognition task, no statistical differences were observed in the saline or alloxan groups in the training session ($p > 0.05$). In the control rats, 1.5h after the training session (short-term recognition memory), we observed an increase in the recognition index compared to the training session, and 24h after the training session (long-term recognition memory) there was an increase in the recognition index, compared to the training session and with short-term memory ($p < 0.05$; Fig. 1). In the diabetic rats induced by alloxan, there was an increase in the recognition index after 24 h, but not 1.5 h after the training session ($p < 0.05$; Fig. 1).

In diabetic rats, there was an increase in the superoxide submitochondrial particles in the prefrontal cortex ($p < 0.05$; Fig. 2A) and an increase in the TBARS submitochondrial particles in the prefrontal cortex and amygdala (Figure 2B). In diabetic rats it was shown that there was an increase in the carbonyl proteins in the hippocampus and striatum ($p < 0.05$; Fig. 3A) and an increase in the TBARS oxidation in the striatum and amygdala ($p < 0.05$; Fig. 3B). The SOD activity was decreased in diabetic rats in the striatum and amygdala ($p < 0.05$; Fig. 4A). However, the CAT activity was increased in the hippocampus from diabetic rats ($p < 0.05$; Fig. 4B).

4. Discussion

Experimental diabetes models can be induced by chemicals that selectively destroy the insulin-producing β -cells in the pancreas [28]. One of the most used chemicals is alloxan. This drug induces diabetes by intracellular generation of ROS formed in a cyclic reaction involving alloxan and its reduced product called dialuric acid [16], with subsequent inhibition of insulin synthesis and secretion.

Recently, a significant body of evidence has accumulated to indicate that diabetes has detrimental effects on brain function. A number of investigations have been performed to indicate that memory loss is a consequence of both type I and type II diabetes [29, 3]. However, the exact mechanism(s) as to how diabetic conditions could affect memory activity remains to be fully characterized. In the present study our results showed that in diabetic rats, there was an increase in the recognition index 24 h after the training session, indicating that diabetic rats did not

alter recognition memory, when subjected to the object recognition task. Contrary to this, another study showed a significant reduction of memory formation, evaluated in the passive avoidance test in streptozotocin-induced diabetic mice [5]. The authors suggest that the overexpressed β -amyloid precursor might be one of the underlying factors causing memory deficit. Differences between these studies could be related with the animal model of diabetes and tests used to evaluate memory.

Although some studies have shown that oxidative stress induces significant deficits in cognitive performance (learning ability and memory retention) [30], in the present findings we did not show this correlation. We recently demonstrated that brain derived-neurotrophic factor (BDNF) levels did not alter in the hippocampus from alloxan-induced diabetic rats [31]. BDNF is a neurotrophin which has an important role in hippocampal-dependent forms of memory [32]. Thus, the findings of the present study on recognition memory could be related, at least in part, because the animal model of diabetes induced by alloxan did not alter BDNF levels.

Uncontrolled ROS production could lead to damage in cellular macromolecules (DNA, lipids and protein) and other small antioxidant molecules [33], contributing to the progress of diabetic complications. Still, research indicates that obesity and hyperglycemia are associated with increases in the ROS production [34,35]. In the present study we observed an increase in the superoxides in the prefrontal cortex and an increase in the TBARS in the prefrontal cortex and amygdala in submitochondrial particles. Diabetes causes mitochondrial superoxide overproduction and this increased superoxide production is the major mediator of diabetes tissue damage [36]. The mitochondria are an organelle and have the ability to generate superoxides at complexes I and III [37,38]. In addition to this, in brain

tissue, complex I and III has been attributed to major ROS production [39,40]. In fact, studies from our group demonstrated that in alloxan-induced diabetic rats there were alterations in the mitochondrial respiratory chain [18]. Thus we suggest that alloxan-induced diabetic-like symptoms may provide a useful animal model to test the hypothesis of the involvement of oxidative stress in diabetes.

Our results also showed an increase in carbonyl protein in the hippocampus and amygdala, and an increase in TBARS oxidation in the striatum and amygdala from diabetic animals. Recently, Chang et al. [41] showed an increase in the carbonyl protein in the renal tissues from diabetic animals induced by streptozotocin. Additionally, similar to us, the TBARS index was increased in the liver of rats that had received a single injection of alloxan (150 mg/kg) [28]. Also, there was shown to be an increase in the TBARS in the plasma and hippocampus from diabetic animals induced by streptozotocin [42].

The present findings showed that SOD activity decreased in the striatum and amygdala. On the other hand, the CAT activity increased in the hippocampus in diabetic animals. The SOD is a protective enzyme that can selectively scavenge the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) by catalyzing its dismutation to hydrogen peroxide (H_2O_2) [43]. The CAT catalyzes degradation of H_2O_2 to water and O_2 . Another study showed that SOD and CAT activities were increased in the livers from alloxan-induced diabetic rats [29]. Also, Amer et al. [44] demonstrated that polymorphisms of glutathione S-transferase (an antioxidant enzyme) genes GSTM1 and GSTT1 were associated with an increased risk of type-2 DM. Interestingly, Di Naso et al. [45] reported that exogenous antioxidant copper zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) decreased liver peroxidation and increased nitric oxide synthase (NOS) in diabetic

rats. Moreover, Gibson et al. [46] showed that N-acetylcysteine (NAC), a biosynthetic precursor of the antioxidant glutathione, reduced thrombotic propensity in type-2 diabetes patients, suggesting that this effect occurred by increasing the platelet antioxidant status as a result of elevated glutathione synthesis.

The precise mechanisms involved in the decreased SOD and increased CAT activities in diabetic rats, as observed in this study cannot be explained, but it is important to note that an increase in antioxidant concentrations can be considered as a compensatory response to oxidative stress [47]. Another study from our group also showed a decrease in the SOD and an increase in the CAT activities in the brain of rats submitted to chronic the mild stress procedure [48]. In fact, studies have reported a relationship between diabetes and stress [49,50] inclusively, alloxan-induced diabetic rats presented depressive-like behaviour [18].

The cause of overall oxidative imbalance demonstrated in our study may be due to mitochondrial dysfunction. Recently, it was shown that alloxan-induced diabetic rats presented alterations in the mitochondrial respiratory chain, creatine kinase and citrate synthase activities [18]. However, mitochondrial alteration could occur by oxidative imbalance. In fact, ROS causes damage in the mitochondrial oxidative phosphorylation [51]. In addition, Bhattacharya et al. [52] reported decreased mitochondrial membrane potential, enhanced cytochrome c release, reciprocal regulation of the Bcl-2 family, and increases of caspases 3 and 9 in alloxan-induced diabetes. The authors also showed that treatment with D-saccharic acid 1,4-lactone, a derivative of D-glucaric acid which has antioxidant properties, counteracted these changes [53].

5. Conclusions

To our knowledge our data describes for the first time, the effects of the animal model of diabetes induced by alloxan on memory and oxidative stress parameters in the rat brain. In conclusion, alloxan-induced diabetes did not alter recognition memory, but induced oxidative damage and an imbalance between antioxidant enzymes, contributing, at least in part, to the pathophysiology of diabetes.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq-Brazil – JQ and FDP), from the Instituto Cérebro e Mente (JQ) and UNESCO (JQ and FDP). JQ and FDP are recipients of CNPq (Brazil) Productivity Fellowships. GZR and AVS are holders of a CAPES studentship. Finally, we are grateful to Luciano K. Jornada for assisting in the statistical analysis.

References

- [1] G.I. Robles, D. Singh-Franco, "A review of exenatide as adjunctive therapy in patients with type 2 diabetes," *Journal of Drug Design, Development and Therapy*, vol. 21 pp. 219–240, 2009.
- [2] G.J Biessels, L.P. Van der Heide, A. Kamal, R.L. Bleys, W.H. Gispen "Ageing and diabetes: implications for brain function," *European Journal of Pharmacology*, vol. 441 pp. 1–14, 2002.
- [3] G.J Biessels, W.H. Gispen "The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models?," *Neurobiology Aging*, vol. 1 pp. 36–41, 2005.
- [4] A. Magarinos, B. McEwen "Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97 pp. 11056–11061, 2000.
- [5] S.W Jung, O.K. Han, S.J. Kim "Increased expression of β amyloid precursor gene in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice with memory deficit and anxiety induction," *Journal of Neural Transmission*, vol. 11 pp. 1411-1418, 2010.
- [6] B. Kolb, J. Cioe, W. Comeau "Contrasting effects of motor and visual spatial learning tasks on dendritic arborization and spine density in rats," *Neurobiology Learning and Memory*, vol. 90 pp. 295-300, 2008.
- [7] A. Ceriello "New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy" *Diabetes Care*, vol. 26 pp. 1589–1596, 2003.
- [8] T. Nishikawa, E. Araki E "Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications," *Antioxidants Redox Signalling*, vol. 9 pp. 343–53, 2007.
- [9] M. A. Yorek "The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease," *Free Radical Research*, vol. 37 pp. 471–480, 2003.
- [10] N.E. Cameron, M.A. Cotter, T.C. Hohman TC "Interactions between essential fatty acid, prostanoid, polyol pathway and nitric oxide mechanisms in the neurovascular deficit of diabetic rats" *Diabetologia*, vol. 39 pp. 172–182, 2009.
- [11] V.M. Monnier "Intervention against the Maillard reaction in vivo" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 419 pp. 1–15, 2003.
- [12] A.C. Maritim, R.A. Sanders, J.B. Watkins III (2003) "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review," *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, vol.17 pp. 24–38, 2003.

- [13] H. Kaneto, J. Fujii, K. Suzuki, H. Kasai, R. Kawamori, T. Kamada T, et al. "DNA cleavage induced by glycation of Cu, Zn-superoxide dismutase," *Biochemical Journal*, vol. 304 pp. 219–25, 1994
- [14] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, J. Telser "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 139 pp. 44–84, 2007.
- [15] I.S. Young, J.V. Woodside "Antioxidants in health and disease," *Journal of Clinical Pathology*, vol.54 pp. 176–86, 2001.
- [16] G.A. Behr, E.G. da Silva, A.R. Ferreira, C.T.S Cerskib, F. Dal-Pizzol, J.C.F Moreira "Pancreas b-cells morphology, liver antioxidant enzymes and liver oxidative parameters in alloxan-resistant and alloxan-susceptible Wistar rats: a viable model system for the study of concepts into reactive oxygen species," *Fundamental & Clinical Pharmacology*, vol. 22 pp. 657–666, 2008.
- [17] T. Szkudelski "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas," *Physiological Research*, vol. 50 pp. 536–546.
- [18] L.B. Ceretta, G.Z. Réus, G.T. Rezin, G. Scaini, E.L. Streck, J. Quevedo "Brain energy metabolism parameters in an animal model of diabetes," *Metabolic Brain Disease*, vol. 25 pp. 391–396, 2010.
- [19] T. Barichello, M.R. Martins, A. Reinke, L.S. Constantino, R.A. Machado, S.S. Valvassori, J.C. Moreira, J. Quevedo, F. Dal-Pizzol "Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 40 pp. 831-837, 2011.
- [20] G. Paxinos, C. Watson "The rat brain: stereotaxic coordinates," *Second ed. Australia: Academic Press*, 1986.
- [21] A. Boveris, N. Oshino, B. Chance "The cellular production of hydrogen peroxide," *Biochemistry Journal*, vol 8 pp. 617–627, 1972.
- [22] A. Boveris "Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria," *Methods in Enzymology*, vol. 105 pp. 429–435, 1984.
- [23] H.H. Draper, M. Hadley M "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation," *Methods in Enzymology*, vol. 186 pp. 421-431, 1990.
- [24] R.L. Levine, J.A. Williams, E.R. Stadtman, E. Shacter "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins," *Methods in Enzymology*, vol. 233 pp. 346-357, 1994.
- [25] J.V. Bannister, L. Calabrese "Assays for superoxide dismutase," *Analytical Biochemistry: Methods in the Biological Sciences*, vol. 32 pp. 279–312, 1987.
- [26] H. Aebi "Catalase in vitro," *Methods Enzymology*, vol. 105 pp. 121–126, 1984.

- [27] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *Journal of Biological Chemical*, vol. 193 pp. 265-267, 1951.
- [28] T. Szkudelski "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas" *Physiological Research*, vol. 50 pp. 537-46, 2001. Review.
- [29] J. Beauquis, F. Homo-Delarche, M.H. Giroix, J. Ehses, J. Coulaud J et al. "Hippocampal neurovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations in spontaneously type 2 diabetic GK rats," *Experimental Neurology* vol. 222 pp. 125–134, 2010.
- [30] K. Fukui, N. Omoi, T. Hayasaka, T. Shinkai, S. Suzuki, K. Abe, S. Urano "Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 959 pp. 275–284, 2002.
- [31] L.B. Ceretta, G.Z. Réus, R.B. Stringari, K.F. Ribeiro, G. Zappellini, B.W. Aguiar, B. Pfaffenseller, C. Lersch, F. Kapczinsk, J. Quevedo "Imipramine treatment reverses depressive-like behaviour and increases brain-derived neurotrophic factor protein levels in the prefrontal cortex in diabetic rats," *Diabetes Metabolic Research Review*, in press, 2011.
- [32] Lu. Bai, K. Martinowic "Cell biology of BDNF and its relevance to schizophrenia," *Novartis Foundation Symposium*, vol. 289 pp. 119–195, 2008.
- [33] B. Halliwell "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)," *Free Radicals Research*, vol. 4 pp. 261-272, 1999.
- [34] M. Brownlee "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications" *Nature*, vol. 414 pp. 6865813– 6865820, 2001.
- [35] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro M et al. "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome," *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 114 pp. 1752–1761, 2004.
- [36] F. Giacco, M. Brownlee "Oxidative stress and diabetic complications," *Circulation Research*, vol. 107 pp. 1058-70, 2010.
- [37] A. Boveris, E. Cadenas, A.O. Stoppani "Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide," *Biochemical Journal*, vol. 156 pp. 435–444, 1976.
- [38] J.F. Turrens, A. Boveris "Generation, of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria," *Biochemical Journal*, vol. 191 pp. 421–427, 1980.
- [39] A.P. Kudin, N.Y. Bimpong-Buta, S. Vielhaber, C.E. Elger, W.S. Kunz "Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria," *Journal of Biological Chemical*, vol. 279: pp. 4127–4135, 2004.

- [40] D. Malinska, B. Kulawiak, P. Alexei, R. Kovacs, C. Huchzermeyer et al. "Complex III-dependent superoxide production of brain mitochondria contributes to seizure-related ROS formation," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1797 pp. 1163–1170, 2010.
- [41] C.C. Chang, C. Chieh-Yu, W. Yang-TZU, H. Piung-Pang, Y. Tzung-Hai, H. Li-Man "Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase," *Journal of Biomedical Science*, vol. 18 pp. 47, 2011.
- [42] C. Wayhs, V. Manfredini, A. Sitta, M. Deon et al "Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect," *Metabolic Brain Disease*, vol. 25 pp. 297-304, 2010.
- [43] I. Fridovich "Superoxide dismutases: regularities and irregularities," Harvey Lectures, vol. 79 pp. 51–75, 1983
- [44] M.A. Amer, M.H. Ghattas, D.M. Abo-Elmatty, S.H. Abou-El-Ela "Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk," *Genetics and Molecular Research*, vol. 31 pp. 10-14.
- [45] F.C. Di Naso, A. Simões Dias, M. Porawski, N.A. Marroni "Exogenous superoxide dismutase: action on liver oxidative stress in animals with streptozotocin-induced diabetes," *Doklady Biochemistry and Biophysics*, vol. 440 pp. 216-218, 2011.
- [46] K.R. Gibson, T.J. Winterburn, F. Barrett, S. Sharma, S.M. MacRury, I.L. Megson, "Therapeutic potential of N-acetylcysteine as an antiplatelet agent in patients with type-2 diabetes," *Cardiovascular Diabetologia*, vol. 121 pp. 10:43, 2011.
- [47] T.M. Michel, J. Thomas, D. Martin, K. Nara, S. Zwerina, T. Tatschner, H.G. Weijers, E. Koutsilieri "Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutase levels in brains of patients with schizophrenic psychosis," *Neuronal Journal Transmission*, vol. 11 pp. 1191–1201, 2004.
- [48] G. Lucca, C.M. Comim, S.S. Valvassori, G.Z. Réus, F. Vuolo, F. Petronilho, F. Dal-Pizzol, E.C. Gavioli, J. Quevedo "Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain," *Neurochemistry International*, vol. 54 pp. 358–362, 2009.
- [49] S.H. Golden, M. Lazo, M. Carnethon et al. "Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes," *JAMA*, vol. 299 pp. 2751–2759, 2008.
- [50] C. Shen, P. Findley, R. Banerjea, U. Sambamoorthi "Depressive disorders among cohorts of women veterans with diabetes, heart disease, and hypertension," *Journal of Womens Health*, vol. 19 pp. 1475–1486, 2010.

[51] V. Adam-Vizi "Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and nonelectron transport chain sources," *Antioxidants Redox Signalling*, vol. 7 pp. 1140–1149, 2005.

Legends of figures

Figure 1: Effects of the animal model of diabetes induced by alloxan on the object recognition task. Results are reported as median \pm interquartile ranges of the recognition indexes in training and short and long-term memory retention test trials. N=10-15 per group, *p < 0.05 different from training session and # p < 0.05 different from training from 1.5 h retention, according to Kruskal–Wallis test.

Figure 2: Effects of the animal model of diabetes induced by alloxan on the superoxide (A) and TBARS (B) levels in submitochondrial particles in the hippocampus, striatum, prefrontal cortex and amygdala. Results are reported as mean \pm S.E.M. N=4-6 per group, *p < 0.05 different from saline, according to Student t-test.

Figure 3: Effects of the animal model of diabetes induced by alloxan on the TBARS levels (A) and carbonyl formation (B) levels in the hippocampus, striatum, prefrontal cortex and amygdala. Results are reported as mean \pm S.E.M. N=4-6 per group, *p < 0.05 different from saline, according to Student t-test.

Figure 4: Effects of the animal model of diabetes induced by alloxan on the superoxide dismutase (A) and catalase (B) activities in the hippocampus, striatum, prefrontal cortex and amygdala. Results are reported as mean \pm S.E.M. N=4-6 per group, *p < 0.05 different from saline, according to Student t-test.

Figures

Figure 1

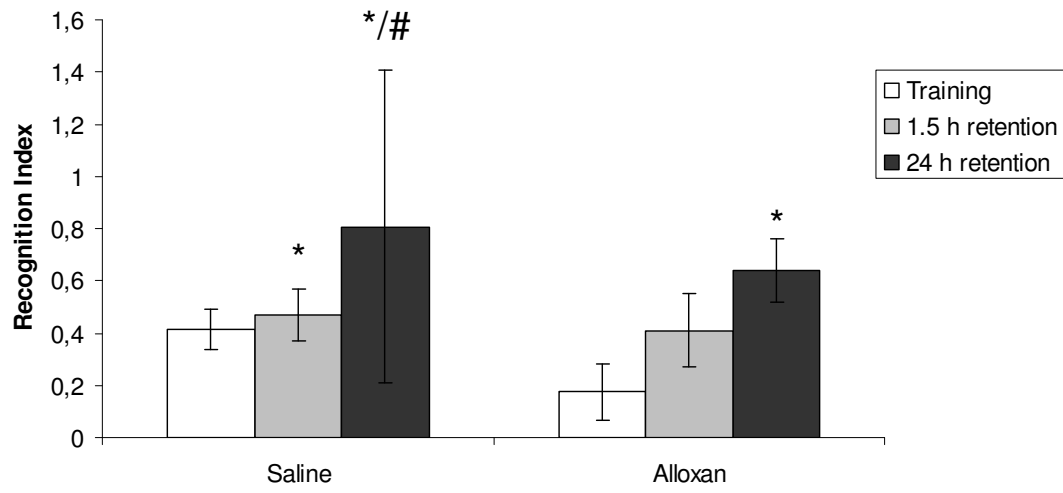
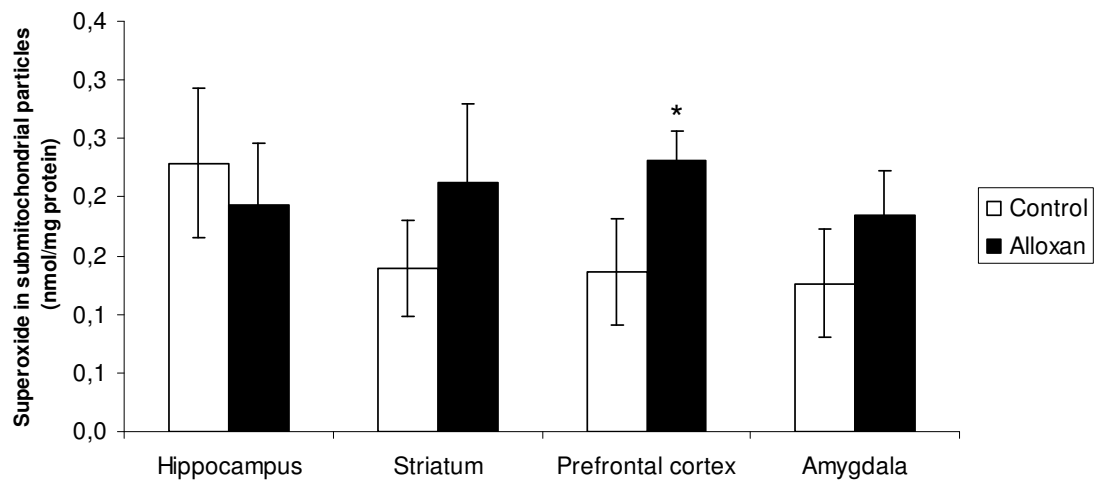


Figure 2

A



B

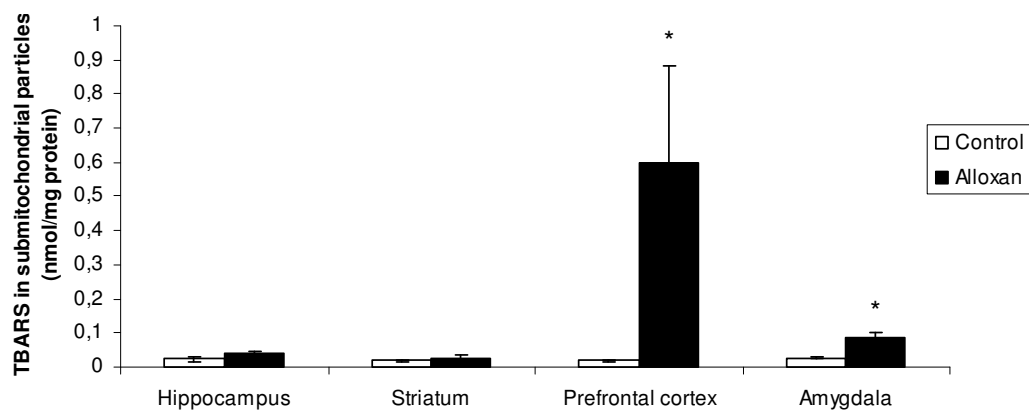
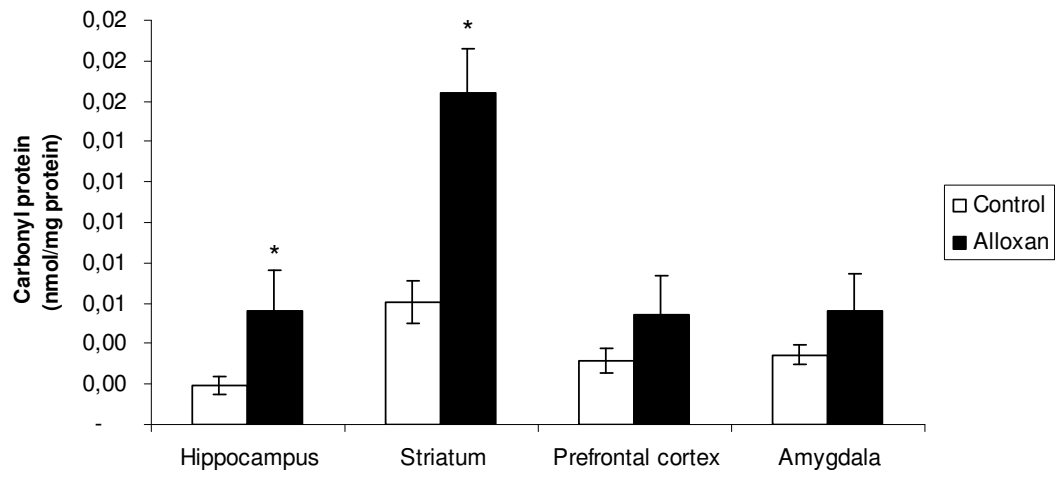


Figure 3

A



B

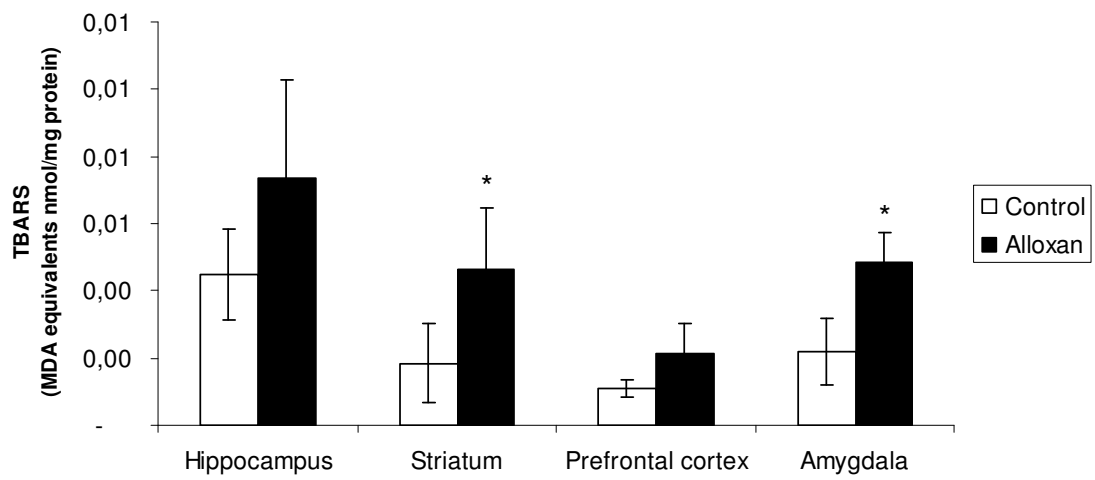
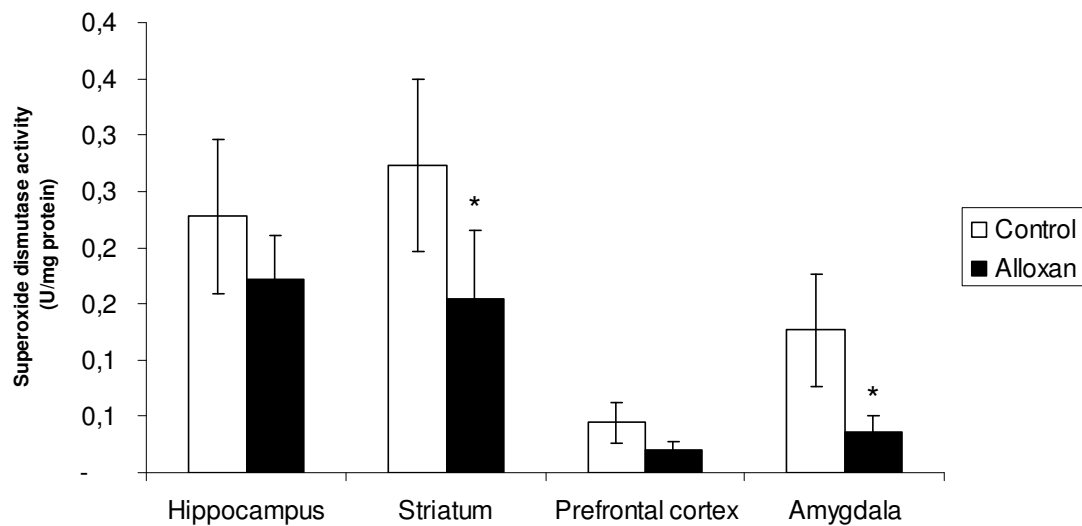
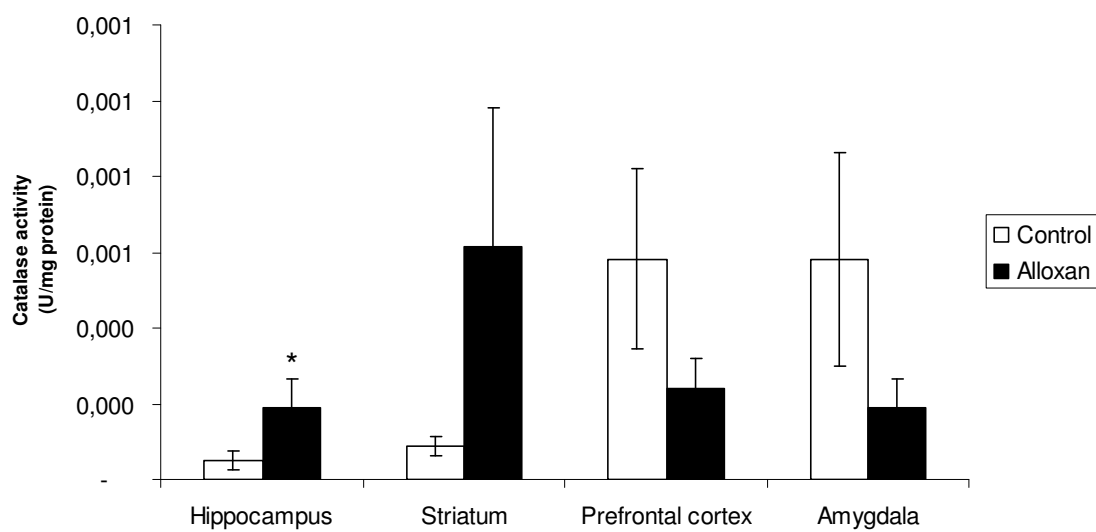


Figure 4

A



B



7 Artigo IV

Artigo aceito para publicação no periódico Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2011.

Luciane B. Ceretta, Gislaine Z. Réus, Roberto B. Stringari, Karine F. Ribeiro, Giovanni Zappellini, Bianca W. Aguiar, Bianca Pfaffenseller, Camila Lersh, Flávio Kapczinski e João Quevedo

**IMIPRAMINE TREATMENT REVERSES DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIORAL
AND INCREASES BDNF PROTEIN LEVELS IN THE PREFRONTAL CORTEX IN
DIABETIC RATS**

Luciane B. Ceretta^a, Gislaine Z. Réus^a, Roberto B. Stringari^a, Karine F.
Ribeiro^a; Giovanni Zappellini^a, Bianca W. Aguiar^b, Bianca Pfaffenseller^b, Camila
Lersh^b, Flávio Kapczinski^b, and João Quevedo^{a*}

^aLaboratório de Neurociências and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 88806-000, Criciúma, SC, Brazil;

^bLaboratório de Psiquiatria Molecular and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil;

Running Head: Imipramine effects in diabetic rats

***Corresponding author:**

Prof. João Quevedo, MD, PhD
Laboratório de Neurociências,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde,
Universidade do Extremo Sul Catarinense,
88806-000 Criciúma, SC, Brazil
Fax: +55 48 3431-2736.
E-mail: quevedo@unesc.net

Abstract

A growing body of evidence has shown an association between diabetes and depression, as well a role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in diabetes and depression. The present study was aimed to evaluate the behavioral and molecular effects of antidepressant imipramine in diabetic rats. To this aim, after diabetic induction by alloxan (150 mg/kg), Wistar rats were treated with imipramine (30 mg/kg) once a day for 14 days and then subjected to the forced swimming and open field tests. BDNF was assessed in the prefrontal cortex, hippocampus and amygdala by ELISA sandwich assay. In diabetic rats treated with saline was observed an increase on the immobility time, compared with control rats treated with saline. Treatment with imipramine decreased immobility time in nondiabetic and diabetic rats, compared with both nondiabetic and diabetic rats treated with saline. In the open-field test, was observed that treatment with imipramine reduced the number of crossings of diabetic rats, compared with nondiabetic rats treated with saline. The number of rearings did not alter in all groups. Diabetic rats injected with saline did not alter BDNF protein levels in the prefrontal cortex, hippocampus or amygdala, but interestingly, the treatment with imipramine in diabetic animals increased BDNF protein levels in the prefrontal cortex. In conclusion, this study indicates an involvement between diabetes and depression, and considering the action of imipramine, it is suggested that it could be an alternative for depression to diabetic patients, once it could present antidepressant effect in diabetic rats and increase BDNF protein levels.

Keywords: Imipramine; BDNF; Forced Swimming Test; Depression, Diabetes.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a significant public health problem associated with a high index of mortality and morbidity, including major depression [1-4]. In fact, prevalence of depression is approximately 10% in diabetic patients [5]. In addition, chronic hypercortisolemia may cause insulin resistance, which may explain the association between DM and depression and vice versa [6]. Indeed, Knol et al. [7] showed that depression increases the risk for type 2 diabetes by 37%. Moreover, antidepressant treatment reduced the severity of depression in diabetic patients [8].

Experimental models of diabetes may be replicated to determine the possible pharmacological targets of the disease and to better evaluate diabetes associated complications [9]. In addition, diabetic mice and rats presented depressive-like behavior when submitted to the forced swimming test [10-12]. Moreover, clonazepam (a positive GABA_A receptor modulator) treatment reverted the immobility in diabetic rats [10, 13].

Many studies have shown an important role of neurotrophins, especially brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the pathophysiology of diabetes, as well in depression [14-17]. BDNF is prominent in development, survival and function of neurons [18]. Decreased levels of BDNF have been found in humans with depression and animal models of depression [19]. On the other hand, treatment with antidepressants increase levels of this neurotrophin [20]. In addition, a study showed that individuals with type 2 DM had decreased plasma BDNF, independent of obesity [21]. However another study reported an increase serum BDNF in type 2 DM, associated with obesity [22].

Studies linking diabetes, depression, treatment with antidepressants and BDNF in brain tissue has not been fully characterized. So, the main aim of the present study was to evaluate behavioural and molecular effects in diabetic rats treated with imipramine, a tricyclic antidepressant, which is widely used as a predictor of antidepressant activity in the forced swim test [23].

Material and Methods

Animals

Male Adult Wistar rats (60 days old) were obtained from UNESC (Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil) breeding colony. They were housed five per cage with food and water available *ad libitum* and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care and with approval by local Ethics Committee under protocol number 16/2010.

Diabetes induction

Diabetes was induced in rats by using a single intraperitoneal injection of alloxan from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) dissolved in saline physiological (0.9% NaCl) solution (150 mg/kg), whereas the control group received only saline injection [24]. Both groups were injected after an 18-h fasting period (60–70 mg/dL blood glucose). Fasting animals are more susceptible to alloxan probably

due to partial protection by increased blood glucose [25]. All induced rats showed hyperglycemia (400–600 mg/dL) 48 h after alloxan administration. During the experiment, the blood glucose level was monitored daily with commercial kit by performing a small puncture at the tail. This methodology is quick and noninvasive, subjecting the rats to a negligible stress. At the end of the study, rats with glycemia between 400 and 600 mg/dL were considered diabetic [24].

Drug and treatment

Imipramine (tricyclic antidepressant), was obtained from Novartis Pharmaceutical Industry (Brazil) in the dose of 30 mg/kg was injected intraperitoneally once a day during 14 days after diabetes induction. The treatments were administrated in a volume of 1 ml/kg. To develop this study we employed 60 animals (n = 15 each) separated in four groups, as follows: (1) control – saline; (2) control – imipramine; (3) alloxan – saline; (4) alloxan – imipramine. Diabetics' rats were tested in the open field and forced swim tests following chronic saline and imipramine treatments.

Open-field test

This apparatus consists of a brown plywood arena 45 × 60 cm surrounded by wood 50 cm high walls and containing a frontal glass wall. The floor of the open field was divided into nine rectangles (15 × 20 cm each) by black lines. Animals were gently placed on the left rear quadrant, and left to explore the arena. After the chronic treatment, on 12nd day, rats were exposed to the open-field apparatus. The number of horizontal (crossings) and vertical (rearings) activity performed by each rat during

5 min observation period was counted by an expert observer, in order to assess possible effects of drug treatment on spontaneous locomotor activity.

Forced swimming test

The forced swimming test was conducted according to previous reports [26-29]. The test involves two individual exposures to a cylindrical tank with water in which rats cannot touch the bottom of the tank or escape. The tank is made of transparent Plexiglas, 80 cm tall, 30 cm in diameter, and filled with water (22–23°C) to a depth of 40 cm. On 13rd day of chronic treatment with imipramine, 1 h after drug treatment rats were individually placed in the cylinder containing water for 15 min (pre-test session). On the 14th day, rats received the last intraperitoneal drug treatment, and after 1 h, they were subjected again to the forced swimming test for a 5 min session (test session) and the immobility time of rats was recorded in seconds. After the behavioral tests (fifteen days after induction of diabetes), all rats were killed by decapitation, and the skulls were immediately removed and prefrontal cortex, hippocampus and amygdala were quickly isolated by hand dissection using a magnifying glass and a thin brush, dissection was based on histological distinctions described by Paxinos and Watson [30].

BDNF analysis

BDNF levels in prefrontal cortex, hippocampus and amygdala were measured by anti-BDNF sandwich-ELISA, according to the manufacturer's instructions (Chemicon, USA). Briefly, rat prefrontal cortex, hippocampus and amygdala were homogenized in phosphate buffer solution (PBS) with 1 mM phenylmethylsulfonyl

fluoride (PMSF) and 1 mM (EGTA). Microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24 h with the samples diluted 1:2 in sample diluents, and standard curve ranged from 7.8 to 500 pg/ml of BDNF. The plates were then washed four times with sample diluent and a monoclonal anti-BDNF rabbit antibody diluted 1:1,000 in sample diluent was added to each well and incubated for 3 h at room temperature. After washing, a peroxidase conjugated anti-rabbit antibody (diluted 1:1,000) was added to each well and incubated at room temperature for 1 h. After addition of streptavidin-enzyme, substrate and stop solution, the amount of BDNF was determined by absorbance in 450 nm. The standard curve demonstrates a direct relationship between Optical Density (OD) and BDNF concentration. Total protein was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as a standard, as previously described by Lowry et al. [31].

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm S.E.M. Differences among experimental groups in the forced swimming and open field tests and in the assessment of BDNF levels were determined by one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc* test when ANOVA was significant; *P* values < 0.05 were considered to be statistical significant.

Results

As depicted in Figure 1A, in diabetic rats treated with saline was observed an increase on the immobility time, compared with control rats treated with saline. Statistical analyses revealed that treatment with imipramine decreased immobility

time in nondiabetic and diabetic rats, compared with both nondiabetic and diabetic rats treated with saline (Fig. 1A; $F_{(3-38)} = 15.08$; $p < 0.001$). The figure 1B, shows the rat behavior subjected to the open-field test, we observed that treatment with imipramine reduced the number of crossings (Fig. 1B; $F_{(3-49)} = 3.58$; $p = 0.02$) of diabetic rats, compared with nondiabetic rats treated with saline. The number of rearings did not alter in all groups (Fig. 1B; $F_{(3-49)} = 2.74$; $p = 0.052$).

BDNF protein levels are illustrated in Figure 2. Diabetic rats injected with saline did not alter BDNF protein levels in the prefrontal cortex, hippocampus (Fig. 2; $F_{(3-42)} = 1.25$; $p = 0.3$) or amygdala (Fig. 2; $F_{(3-93)} = 1.65$; $p = 0.19$), but interestingly, the treatment with imipramine in diabetic animals increased BDNF protein levels in the prefrontal cortex (Fig. 2; $F_{(3-55)} = 2.81$; $p = 0.04$).

Discussion

DM is characterized by hyperglycemia as a result of complete lack of insulin, a relative lack of insulin or insulin resistance [32], which can lead to changes central nervous system functions [33]. In addition, it is estimated that in 2030 about 366 million of people will be affected [34].

Many studies have documented an association between diabetes and depression [5, 6]. In the present study we evaluated the effects of antidepressant imipramine in diabetic rats. We observed that imipramine treatment reversed the increase on immobility time and reduced the number of crossings in diabetic rats. Moreover, imipramine increased BDNF protein levels in the prefrontal cortex in

diabetic rats. In fact, it is fairly consolidated the role of BDNF in both depression and diabetes [16, 17, 20, 35].

In some experimental models of diabetes animals exhibiting a syndrome of type 2 DM, with characteristics similar to humans [36]. In addition, these models allow evaluating the onset, the development and the progression of the disease and contributing to the understanding of the molecular mechanisms underlying of type 2 DM [9]. Animal model of diabetes can be induced by chemicals, for example, alloxan, some animals with inherent diabetes have a destruction in insulin-producing β - cells in the pancreas [24, 25], characterized by severe hyperinsulinaemia with only mild to moderate hyperglycaemia [36, 37]. In fact, recently, our group showed that alloxan induced hyperglycemia 48 h after alloxan administration [38].

It is quite evident the association between diabetes and depression. Patients with type 2 diabetes are 52% more likely to develop major depression than the general population [39]. In addition, Shen et al. [40] showed in a cohorts study that minor depression was highly prevalent among woman with complex chronic illness, such as diabetes or heart disease or hypertension. A longitudinal study showed that more than 40% of the diabetic patients with co-morbid subthreshold depression developed a major depression during 2 year follow-up period [41]. Also, some studies have shown that patients with diabetes and clinical depression, compared with those who have diabetes alone, show poorer adherence to diet, exercise and taking medications [42, 43]. Katon et al. [44] reported that diabetic patients with comorbidity depression have double the probability of cardiac risk factors like smoking, obesity, and others.

The pharmacotherapy with antidepressants did lead to reduction of depressive symptoms in diabetic patients [45]. In the present data we showed that diabetic rats increased the immobility time. The immobility is a parameter evaluated in the forced swimming test and it is interpreted as a depression-like behavior [26], suggesting an unbalance in the noradrenergic and serotonergic neurotransmission. In fact, diabetic animals present low levels of dopamine and serotonin [46].

The depressive-like in diabetic rats reported in the present study are in agreement with literature data, which show that diabetic animals presented depressive-like behaviour. Sharma et al. [47] reported that both juvenile and adult genetically modified *db/db* mice displayed behavioral despair with increased despair immobility time in forced swimming test. Also, has been shown depression-like behavior in streptozotocin-induced diabetic mice [48]. Some author have reported that clonazepam reverses the increase of immobility in the forced swimming test of diabetic rats [10, 12, 13, 49], showing an antidepressant effect in these animals.

Interestingly, we demonstrated that tricyclic antidepressant imipramine reversed depressive-like behaviour in diabetic rats. In contrast, antidepressants drugs, including imipramine (32 mg/kg) did not prevent escape deficits in diabetic rats submitted to learned helplessness model of depression [50]. Similar to us, Anjaneyulu et al. [51] showed that quercetin, a bioflavonoid, and antidepressants fluoxetine (5 mg/kg) and imipramine (15 mg/kg) lowered the immobility time in streptozotocin-induced diabetic mice. Suggesting that imipramine effects are dependent of specie, animal model and dose administrated. Our study is the first to show that imipramine reverses depressive-like behavior in alloxan-induced diabetic rat. We also showed that imipramine reduced the number of crossing in diabetic rats.

Regarding the effects of locomotor activity some authors suggesting that a decrease in this activity in the open field test may account for increase duration of immobility in forced swimming test, however, other authors did not have showed correlation between locomotor activity and performance of mice in forced swimming test [52, 53]. Although we have shown a significant decrease in locomotor activity only in diabetic rats treated with imipramine, there was a tendency for decreased locomotor activity also in diabetic rats treated with saline. Decreased locomotor activity was observed also in *ob/ob* mouse strain [47, 52].

The present findings also reported that imipramine treatment increased BDNF protein levels in the prefrontal cortex, but not in the hippocampus or amygdala of diabetic rats. Alterations in hippocampal, amygdalar and prefrontal areas have been associated with both type 2 diabetic and depression [54, 55].

BDNF is an important neurotrophin that has a role in the survival and differentiation in neurons in the peripheral and central nervous systems [56, 57]. Also, BDNF seems to play a role in the regulation of food intake and body weight [58-61].

Studies from literature have characterized the role of BDNF in depression [55]. Reduced levels of BDNF have been reported in the serum, plasma and brain in animals and humans with depression [62, 63]. On the other hand, antidepressant treatment increases BDNF [64]. In diabetes also has been shown the role of BDNF. In fact, Krabbe et al. [21] showed reduced plasma levels of BDNF in humans with type 2 diabetes, independent of obesity. In addition, in impaired insulin function individuals had lower plasma levels in comparison to matched non-insulin resistant controls [35]. However, Suwa et al. [22] reported an increase of serum BDNF in type

2 diabetes, associated with obesity. In a mouse model was showed that diet-induced maternal obesity impairs hippocampal BDNF production in young offspring [65]. Change in neurotrophins receptors was found also in nerves and peripheral tissues in the diabetic states [61].

On the other hand, BDNF exerted protective effect on pancreatic islets in obese diabetic mice [66], ameliorated glucose metabolism and prevented pancreatic exhaustion in diabetic mice [67]. Still, BDNF treatment prevented the development of diabetes in early diabetic and prediabetic *db/db* mice [68], suggesting that BDNF prevents the development of diabetes by enhancing in the peripheral tissues and preventing pancreatic exhaustion. The Glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) was also reduced in colon in diabetic [69], suggesting that the reduction of GDNF might be involved in mechanism of diabetic enteric neurons damage. However, in another study, both GDNF and BDNF mRNA expression did not alter in the striatum and cerebellum of streptozotocin-treated rats [70]. Although, in the present study we have not shown a significant decrease of BDNF levels in diabetic rats, we showed a tendency to decrease BDNF levels in the prefrontal, hippocampus and amygdala of diabetic rats. Thus, the increase of BDNF in prefrontal exerted by imipramine may have been a mechanism of neuroprotection.

In conclusion, considering that imipramine facilitates signaling of serotonin or norepinephrine [71], which are impaired in diabetes [46], and that the alterations in monoamine metabolism evoke adaptative changes in intracellular signal transduction, such as BDNF [71, 72], it's antidepressant-like effect in diabetic rats in the present study may be related at least in part, by effects of imipramine on BDNF levels in the prefrontal. Moreover, since changes of BDNF are a pathogenic factor

common to both diabetes and depression, these alterations might explain at least in part the association between them.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq-Brazil – JQ and FK), from the Instituto Cérebro e Mente (JQ) and UNESCO (JQ). JQ and FK are recipients of CNPq (Brazil) Productivity Fellowships. GZR is holder of a CAPES studentship.

Conflict of Interest

None declared.

References

- [1] Dismuke CE, Egede LE. Association between major depression, depressive symptoms and personal income in US adults with diabetes. *Gen Hosp Psychiatry* 2010; **32**:484–491.
- [2] Held RF, DePue J, Rosen R, Bereolos N, Nu'usolia O, Tuitele J, Goldstein M, House M, McGarvey S. Patient and health care provider views of depressive symptoms and diabetes in American Samoa. *Cultur Divers Ethnic Minor Psychol* 2010;**16**:461-467.
- [3] Manderbacka K, Sund R, Koski S, Keskimäki I, Elovainio M. Diabetes and depression? Secular trends in the use of antidepressants among persons with diabetes in Finland in 1997-2007. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2011;**20**:338-343.

- [4] Raval A, Dhanaraj E, Bhansali A, Grover S, Tiwari P. Prevalence & determinants of depression in type 2 diabetes patients in a tertiary care centre. *Indian J Med Res* 2010; **132**:195-200.
- [5] Egede LE, Simpson K. Epidemiology, treatment and costs of depression in adults with Type 2 diabetes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2003; **3**:251–262.
- [6] Pouwer F, Kupper N, Adriaanse MC. Does emotional stress cause type 2 diabetes mellitus? A review from the European Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium. *Discov Med*;2010;**9**:112-118.
- [7] Knol M, Twisk J, Beekman A, Heine R, Snoek F, Pouwer F. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetologia* 2006;**49**:837-845.
- [8] Khazaie H, Rahimi M, Tatari F, Rezaei M, Najafi F, Tahmasian M. Treatment of depression in type 2 diabetes with Fluoxetine or Citalopram? *Neurosciences* 2011;**16**:42-45.
- [9] Franconi F, Seghieri G, Canu S, Straface E, Campesi I, Malorni W. Are the available experimental models of type 2 diabetes appropriate for a gender perspective? *Pharmacol Res* 2008;**57**:6–18.
- [10] Gomez R, Barros HMT. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;**66**:329–335.
- [11] Hilakivi-Clarke LA, Wozniak KM, Durcan MJ, Linnoila M. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiol Behav* 1990;**48**:429–433.

- [12] Wayhs CAY, Manfredini V, Sitta A, Deon M, Ribas GS, Vanzin CS, Biancini GB, Nin MS, Barros HMT, Vargas CR. Effects of insulin and clonazepam on DNA damage in diabetic rats submitted to the forced swimming test. *Mutat Res* 2010;**703**:187–190.
- [13] Haeser AS, Sitta A, Barschak AG, Deon M, Barden AT, Schmitt GO, Landgraff S, Gomeze R, Barrose HMT, Vargas CR. Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test: the clonazepam effect. *Brain Res* 2007;**1154**:137-143.
- [14] Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Ferraro AK, Vitto MF, Cesconetto P, Souza CT, Quevedo J. Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. *Behav Brain Res* 2011;**221**:166-171.
- [15] Duman RS. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromol Med* 2004;**5**:11–25.
- [16] Rao AA, Sridhar GR, Srinivas B, Das UN. Bioinformatics analysis of functional protein sequences reveals a role for brain-derived neurotrophic factor in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Med Hypotheses* 2008;**70**:424–249.
- [17] Taliáz D, Loya A, Gersner R, Haramati S, Chen A, Zangen A. Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 2011;**31**:4475-4483.
- [18] Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA, DiStefano PS. Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci* 1994;**17**:182–190.
- [19] Castren E, Vooikar V, Rantamaki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol* 2007;**7**:18–21.

- [20] Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 2006; **59**:1116–1127.
- [21] Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Rasmussen P, Erikstrup C, Fischer CP, Lindegaard B, Petersen AM, Taudorf S, Secher NH, Pilegaard H, Bruunsgaard H, Pedersen BK. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;**50**:431–438.
- [22] Suwa M, Kishimoto H, Nofuji Y, Nakano H, Sasaki H, Radak Z, Kumagai S. Serum brain-derived neurotrophic factor level is increased and associated with obesity in newly diagnosed female patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2006;**55**:852–857.
- [23] Kitamura Y, Araki H, Gomita Y. Influence of ACTH on the effects of imipramine, desipramine and lithium on duration of immobility of rats in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;**71**:63-69.
- [24] Behr GA, da Silva EG, Ferreira AR, Cerskib CTS, Dal-Pizzol F, Moreira JCF. Pancreas b-cells morphology, liver antioxidant enzymes and liver oxidative parameters in alloxan-resistant and alloxan-susceptible Wistar rats: a viable model system for the study of concepts into reactive oxygen species. *Fundam Clin Pharmacol* 2008;**22**:657–666.
- [25] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;**50**:536–546.
- [26] Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacol* 1995;**121**:66–72.

- [27] Garcia LB, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries G, Gavioli E, Kapczinski F, Quevedo J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008a; **32**:140–144.
- [28] Garcia LB, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries G, Gavioli E, Kapczinski F, Quevedo J. Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008b; **103**:502–506.
- [29] Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Animal model of depression. *Nature* 1977; **266**:730–732.
- [30] Paxinos G, Watson C. The rat brain: stereotaxic coordinates, Second ed. Australia: Academic Press 1986.
- [31] Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**:265–275.
- [32] Robles GI, Singh-Franco D. A review of exenatide as adjunctive therapy in patients with type 2 diabetes. *Drug Des Devel Ther* 2009; **3**:219-240.
- [33] Bellush LL, Reid S, North D. The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. *Physiol Behav* 1991; **50**:973–981.
- [34] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; **27**:1047–1053.

- [35] Arentoft A, Sweat V, Starr V, Oliver S, Hassenstab J, Bruehl H, Tirsi A, Javier E, McHugh PF, Convit A. Plasma BDNF is reduced among middle-aged and elderly women with impaired insulin function: Evidence of a compensatory mechanism. *Brain Cogn* 2009;**71**:147–152.
- [36] Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res* 2007;**125**:451-472.
- [37] Gruzman A, Elgart A, Viskind O, Billauer H, Dotan S, Cohen G, Mishani E, Hoffman A, Cerasi E, Sasson S. Antihyperglycaemic activity of 2,4:3,5-dibenzylidene-D-xylose-dithioacetal in diabetic mice. *J Cell Mol Med* 2011; in press.
- [38] Ceretta LB, Réus GZ, Rezin GT, Scaini G, Streck EL, Quevedo J. Brain energy metabolism parameters in an animal model of diabetes. *Metab Brain Dis* 2010;**25**:391–396.
- [39] Golden SH, Lazo M, Carnethon M, Bertoni AG, Schreiner PJ, Diez Roux AV, Lee HB, Lyketsos C. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. *JAMA* 2008;**299**:2751-2759.
- [40] Shen C, Findley P, Banerjea R, Sambamoorthi U. Depressive disorders among cohorts of women veterans with diabetes, heart disease, and hypertension. *J Womens Health (Larchmt)* 2010;**19**:1475-1486.
- [41] Bot M, Pouwer F, Ormel J, Slaets JP, de Jonge P. Predictors of incident major depression in diabetic outpatients with subthreshold depression. *Diabet Med* 2010;**27**:1295-1301.
- [42] Ciechanowski PS, Katon WJ, Russo JE, Hirsh IB. The relationship of depressive symptoms to symptom reporting, self-care and glucose control in diabetes. *Gen Hosp Psychiatry* 2003;**25**:246–252.

- [43] Katon W, Von Korff M, Ciechanowski P, Russo J, Lin E, Simon G, Ludman E, Walker E, Bush T, Young B. Behavioral and clinical factors associated with depression among individuals with diabetes. *Diabetes Care* 2004a;27:914–920.
- [44] Katon WJ, Lin EH, Russo J, Von KM, Ciechanowski P, Simon G, Ludman E, Bush T, Young B. Cardiac risk factors in patients with diabetes mellitus and major depression. *J Gen Intern Med* 2004b;19:1192–1199.
- [45] van der Feltz-Cornelis CM, Nuyen J, Stoop C, Chan J, Jacobson AM, Katon W, Snoek F, Sartorius N. Effect of interventions for major depressive disorder and significant depressive symptoms in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Gen Hosp Psychiatry* 2010;32:380–395
- [46] Pearce DA, Atkinson M, Tagle DA. Glutamic acid decarboxylase autoimmunity in Batten disease and other disorders. *Neurology* 2004;63:2001–2005.
- [47] Sharma AN, Elased KM, Garrett TL, Lucot JB. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. *Physiol Behav* 2010;101:381–388.
- [48] Hirano S, Miyata S, Kamei J. Antidepressant-like effect of leptin in streptozotocin-induced diabetic mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;86:27-31.
- [49] Rajtar G, Zolkowska D, Keinrok Z. Effect of diazepam and clonazepam on the function of isolated rat platelet and neutrophils. *Intern Med J Exp Clin Res* 2002;8:37–44.
- [50] Massol J, Martin P, Belon JP, Puech AJ, Soubrié P. Helpless behavior (escape deficits) in streptozotocin-diabetic rats: resistance to antidepressant drugs. *Psychoneuroendocrinology* 1989;14:145-153.
- [51] Anjaneyulu M, Chopra K, Kaur I. Antidepressant activity of quercetin, a bioflavonoid, in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Med Food* 2003;6:391-395.

- [52] Collin M, Hakansson-Ovesjo ML, Misane I, Ogren SO, Meister B. Decreased 5-HT transporter mRNA in neurons of the dorsal raphe nucleus and behavioral depression in the obese leptin-deficient ob/ob mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;**81**:51–61.
- [53] Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: Implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* 1997;**132**:107–124.
- [54] den Heijer T, Vermeer SE, van Dijk EJ, Prins ND, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI. *Diabetologia* 2003;**46**:1604–1610.
- [55] Yu H, Chen ZY. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol Sin* 2011;**32**:3–11.
- [56] Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;**361**:1545-1564.
- [57] Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNFTrkB signaling in synapse maturation, plasticity and disease. *Dev Neurobiol* 2010;**70**:304-322.
- [58] Akkermann K, Hiio K, Villa I, Harro J. Food restriction leads to binge eating dependent upon the effect of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism. *Psych Res* 2011;**185**:39-43.
- [59] Nonomura T, Tsuchida A, Ono-Kishino M, Nakagawa T, Taiji M, Noguchi H. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy expenditure through the central nervous system in obese diabetic mice. *Int J Exp Res* 2001;**2**:201–209.

- [60] Ono M, Itakura Y, Nonomura T, Nakagawa T, Nakayama C, Taiji M, Noguchi H. Intermittent administration of brain-derived neurotrophic factor ameliorates glucose metabolism in obese diabetic mice. *Metabolism* 2000;**49**:129–133.
- [61] Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O'Rahilly S, Farooqi IS. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 2004;**7**:1187–1189.
- [62] Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psych Res* 2002;**15**:143–148.
- [63] Kozisek ME, Middlemas D, Bylund DB. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in the mechanism of action of antidepressant therapies. *Pharmacol Ther* 2008;**117**:30–51.
- [64] De Foubert G, Carney SL, Robinson CS, Destexhe EJ, Tomlinson R, Hicks CA, Murray TK, Gaillard JP, Deville C, Xhenseval V, Thomas CE, O'Neill MJ, Zetterström TS. Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. *Neuroscience* 2004;**128**:597–604.
- [65] Tozuka Y, Kumona M, Wada E, Onoder M, Mochizuki H, Wada K. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neuroch Inter* 2010;**57**:235–247.
- [66] Yamanaka M, Itakura Y, Inoue T, Tsuchida A, Nakagawa T, Noguchi H, Taiji M. Protective effect of brain-derived neurotrophic factor on pancreatic islets in obese diabetic mice. *Metabolism* 2006;**55**:1286-1292.
- [67] Yamanaka M, Itakura Y, Ono-Kishino M, Tsuchida A, Nakagawa T, Taiji M. Intermittent administration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ameliorates

glucose metabolism and prevents pancreatic exhaustion in diabetic mice. *J Biosci Bioeng* 2008a;**105**:395-402.

[68] Yamanaka M, Itakura Y, Tsuchida A, Nakagawa T, Taiji M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents the development of diabetes in prediabetic mice. *Biomed Res* 2008b;**29**:147-153.

[69] Du F, Wang I, Qian W, Liu S. Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil* 2009;**21**:1229.

[70] Grünblatt E, Koutsilieri E, Hoyer S, Riederer P. Gene expression alterations in brain areas of intracerebroventricular streptozotocin treated rat. *J Alzheimers Dis* 2006;**9**:261-271.

[71] Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002;**34**:13–25.

[72] Altar CA. Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol Sci* 1999;**20**:59–61.

Legends of Figures

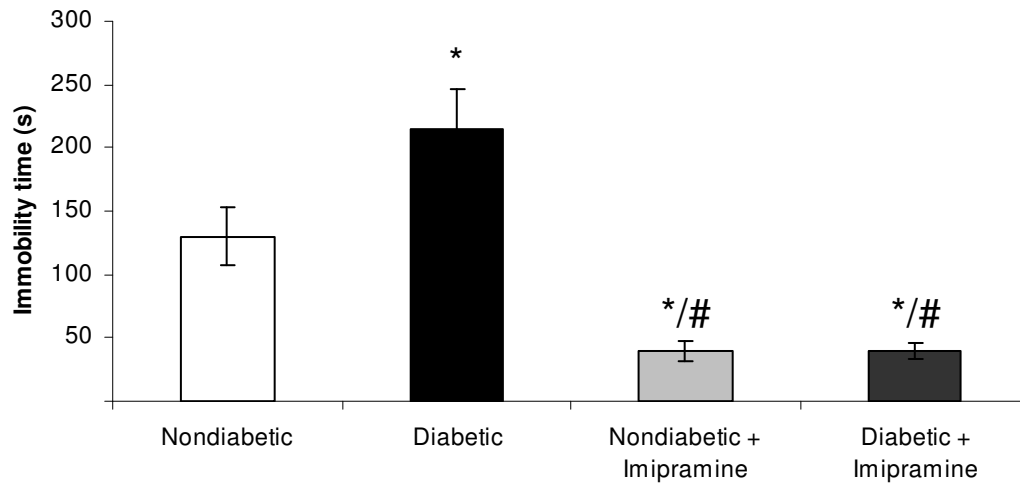
Figure 1. Effects of animal model of diabetes induced by alloxan on the immobility (1A) time of rats subjected to the forced swimming test and on the number of crossings and rearings (1B) in rats repeatedly treated with imipramine. Bars represent means \pm S.E.M. (n = 15). * $P < 0.05$ vs. nondiabetic and */# $p < 0.05$ vs. nondiabetic and diabetic according to ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test.

Figure 2. Effects of animal model of diabetes induced by alloxan on the BDNF protein levels in the prefrontal cortex, hippocampus and amygdala of rats repeatedly treated with imipramine. Bars represent means \pm S.E.M. (n = 10). * $P < 0.05$ vs. nondiabetic according to ANOVA followed by Tukey *post-hoc* test.

Figures

Figure 1

A



B

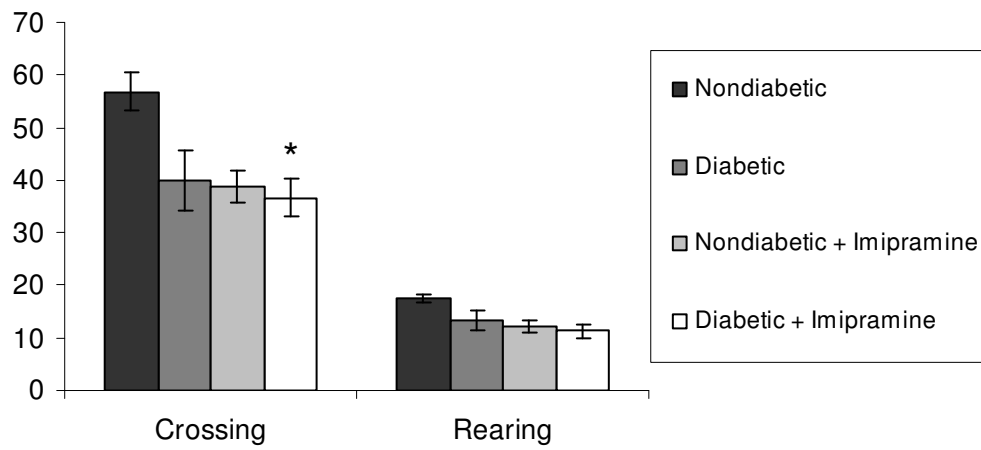
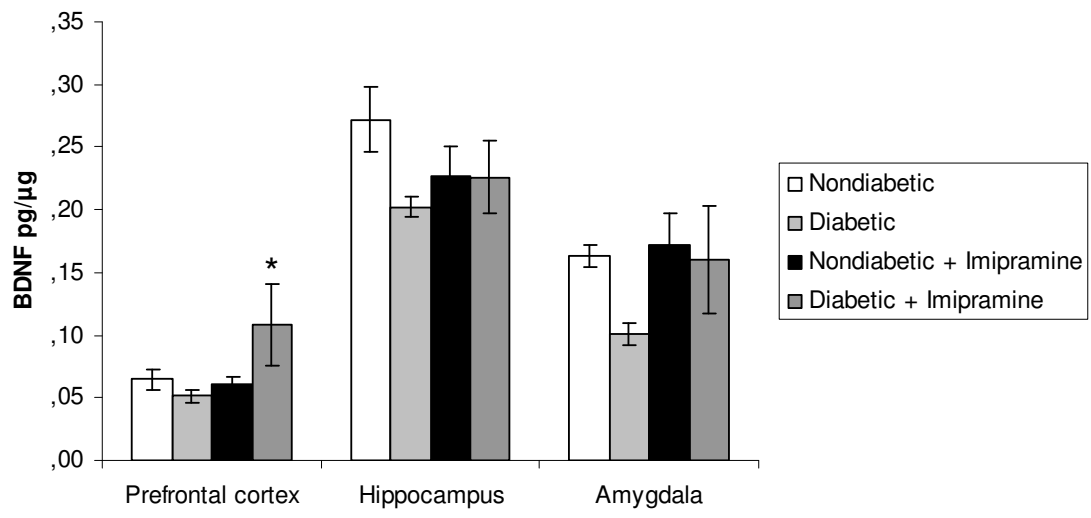


Figure 2



PARTE III

8 DISCUSSÃO

A depressão é o transtorno do humor mais prevalente. Estima-se que 121 milhões de pessoas sejam afetadas mundialmente (Sattler & Rothstein, 2007). Recentemente alguns estudos têm mostrado uma alta prevalência desse transtorno entre pacientes diabéticos (Nau, Aikens & Pacholski, 2007). Além disso, a depressão está associada a um pobre controle glicêmico, o que pode levar a um aumento de riscos em complicações relacionadas à diabetes (Lustman et al., 2000; Nau, Aikens & Pacholski, 2007; Sacco et al., 2007). A depressão e o diabetes estão entre as doenças crônicas que mais causam desabilidade e mortalidade (Murray & Lopez, 1997; Nau, Aikens & Pacholski, 2007).

No presente estudo utilizou-se o MINI como instrumento de avaliação e os resultados da pesquisa mostraram uma maior ocorrência de episódio depressivo, episódio depressivo recorrente, distímia e transtorno de humor com sintomas psicóticos em pacientes diabéticos do tipo 2. Concomitante com este estudo, outros autores também têm demonstrado uma relação entre diabetes e transtornos psiquiátricos. Um estudo de coorte retrospectivo relatou uma alta prevalência de depressão em pacientes diabéticos (O'Connor et al., 2009). Além disso, Lustman et al.²⁴ observaram que a depressão foi significativamente associada com hiperglicemia em pacientes com DM dos tipos 1 e 2.

Bot et al. (2010) em um estudo longitudinal, utilizando como instrumento de investigação o MINI mostraram que 40% de pacientes diabéticos que tinham como

co-morbidade a depressão desenvolveram o transtorno depressivo maior em até dois anos após o período inicial do estudo. Os autores atribuíram ainda a ansiedade como um importante fator relacionado à depressão (Bot et al., 2010). Semelhante ao presente estudo Golden et al. (2008) mostraram que pacientes com DM do tipo 2 são 52% mais susceptíveis a desenvolver transtorno depressivo maior do que a população geral. Por outro lado, outro estudo, no qual foi comparado a prevalência de transtornos mentais entre 141 pacientes diabéticos e 4.028 sujeitos sem diabetes Kruse, Lemaster & Madesen (2010) observaram que as pessoas com diabetes não apresentaram diferenças com relação a depressão de acordo com critérios do DSM-IV. Diferenças nesses estudos podem ser atribuídas ao tamanho amostral no qual foi utilizado o estudo.

Não foi observado no presente trabalho diferenças com relação a idade, gênero, estado civil e escolaridade entre pacientes diabéticos e não-diabéticos na população estudada. Entretanto, outro estudo mostrou que sintomas depressivos em pacientes com diabetes foram associados com alguns fatores, por exemplo, foi maior em mulheres, em jovens e em pessoas com baixa escolaridade (Katon et al., 2004).

Os resultados da presente pesquisa mostraram também que pacientes diabéticos tiveram colesterol total e a lipoproteína de baixa intensidade (LDL) elevados, assim como uma maior presença de hipertensão arterial, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Interessantemente, Clouse et al (2003) mostraram que em mulheres diabéticas, a depressão maior foi um fator de risco independente que acelerou o desenvolvimento de doenças cardíacas. Além disso, mostrou-se que a depressão foi um preditor de incidência de doenças cardíacas

entre 4.538 pessoas com 60 anos de idade com hipertensão sistólica (Abramson et al., 2001). De fato, tanto em pacientes diabéticos quanto em pacientes depressivos há uma maior prevalência de problemas cardíacos, (O'Neil et al., 2011; Wint, 2011) assim seria importante o monitoramento e tratamento de transtornos de humor em pacientes com DM.

Níveis elevados de hemoglobina glicada e a não adesão ao uso de insulina encontrados no presente estudo foram associados a quadros depressivos recorrentes, bem como a sintomas psicóticos. Já a distímia foi associada a não adesão e a níveis glicêmicos elevados. De acordo com a Associação Americana de Diabetes (2007), pacientes com esta doença deveriam manter baixos os níveis de hemoglobina glicada, pressão sanguínea e LDL. Completando esses dados, dados da literatura têm sugerido que a presença de depressão em pacientes diabéticos tem sido associada como uma possível causa de um controle metabólico inadequado. Papelbaum et al. (2011) relataram altos níveis de hemoglobina glicada em pacientes com DM do tipo 2, também diagnosticados com depressão recorrente, comparados com pacientes que não possuíam transtornos de humor.

Corroborando os dados acima, têm-se demonstrado que pacientes com depressão maior são mais susceptíveis a desenvolver diabetes (Chien et al., 2011). Esta associação pode ser explicada pelo fato de que indivíduos com depressão muitas vezes possuem um maior consumo calórico e fazem pouca atividade física o que pode contribuir para a obesidade (Goodman & Whitaker, 2002). Não obstante, na depressão ocorre ativação do eixo hipotálamo hipófise adrenal (HPA), alterações no sistema imunológico, o que pode levar a uma resistência a insulina e levar ao desenvolvimento de DM (Golden, 2007). Outro fato importante é de que

antidepressivos, antipsicóticos e estabilizadores do humor podem contribuir para ganho de peso, hiperglicemia e hipertensão (Citrome et al., 2004; Andersohn et al., 2009). A hipercortisolemia crônica pode levar a uma resistência a insulina, o que pode explicar a associação entre DM e a depressão e vice e versa (Power, Kupper & Adriaanse, 2010). Recentemente também tem sido mostrado que pacientes diabéticos possuem alterações nos níveis do fator neurotrófico- derivado do cérebro (BDNF), o qual é classicamente conhecido por estar alterado na depressão (Rao et al., 2008; Taliaz et al., 2011).

É importante destacar que o presente estudo apresenta algumas limitações, por exemplo, o MINI não é utilizado como diagnóstico clínico, e sim para uma entrevista diagnóstica rápida. Além disso, não foi avaliada a associação do uso de antidepressivos pelos pacientes. No entanto, sabe-se que tratamento com antidepressivo reduziu a severidade da depressão em pacientes diabéticos (Khazaie et al., 2011).

Há poucos estudos na literatura que relacionam a diabetes do tipo 2 com o risco de suicídio. Os dados do presente estudo mostraram um alto índice de risco de suicídio. Além disso, a presença do risco de suicídio foi associada com altos níveis glicêmicos. Roy et al. (2010) em um estudo onde examinaram o suicídio e a sua correlação com a diabetes do tipo 1 em 412 pacientes Afro-Americanos apontaram para um maior risco de suicídio, comparado com 404 Afro-Americanos sem diabetes. Além disso, Pompili et al. (2009) avaliaram a qualidade de vida a associação dela com risco de suicídio em 100 pacientes italianos diabéticos com diabetes dos tipos 1 e 2. Os autores relataram que os pacientes com diabetes apresentaram ideação

suicida. Também relatou-se uma menor qualidade de vida nesses pacientes, a qual foi relacionada a um maior risco de suicídio.

No presente estudo também foi mostrado que pacientes com diabetes do tipo 2 apresentaram uma qualidade de vida prejudicada, a saber, tiveram maiores limitações físicas, psicológicas e ambientais. Além disso, a glicemia de jejum e a hemoglobina glicada foram associados com uma melhor qualidade de vida no domínio físico. No entanto, a relação social foi melhor em pacientes diabéticos. Este resultado pode estar relacionado, pelo menos em parte, pelo fato de que os pacientes do presente estudo participam de grupos terapêuticos, tanto em estabelecimentos de saúde quanto em clínicas de saúde na universidade. Sabe-se que a integração e a troca de experiências entre pacientes diabéticos pode ajudar na qualidade de vida desses pacientes.

Modelos experimentais de diabetes podem ser induzidos por substâncias químicas, as quais seletivamente destróem as células β do pâncreas, que são produtoras de insulina (Szkudelski, 2001). Um dos produtos mais utilizados é o aloxano. Estes modelos permitem avaliar o início, o desenvolvimento e a progressão da doença e contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes da diabetes (Yorek, 2003).

Estudos recentes têm demonstrado que o diabetes leva a alterações cerebrais. De fato, evidências indicam que a perda de memória é uma das consequências da diabetes dos tipos 1 e 2 (Biessels & Gispen, 2005; Beauquis et al., 2010). No entanto, não se sabe ao certo quais os mecanismos que levam a alterações na memória decorrentes do diabetes. No presente estudo foi relatado que ratos diabéticos não apresentaram déficits na memória de reconhecimento de

objetos. Porém, outro estudo mostrou que ratos submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por estreptozotocina tiveram reduções na formação de memória quando avaliados no teste da esQUIVA passiva (Jung, Han & Kim, 2010). As diferenças apontadas nesses estudos podem ser relacionadas ao teste utilizado para avaliar a memória e também as diferenças no modelo animal de diabetes.

Alguns estudos apontam que o estresse oxidativo leva a déficits cognitivos, porém no presente estudo não foi mostrado essa correlação. A produção excessiva de ROS pode levar a danos em moléculas, como lipídios, proteínas e DNA (Halliwell, 1999). Os resultados do presente estudo mostraram um aumento de TBARS e de superóxidos em partículas submitocondriais. Também foi mostrado um aumento nos níveis de TBARS e carbonilação de proteínas em cérebro de ratos diabéticos. Chang et al. (2011) mostraram um aumento na carbonilação de proteínas em tecidos renais de ratos diabéticos. Além disso, semelhante ao presente estudo foi mostrado um aumento de TBARS no fígado em animais que receberam uma única injeção de aloxano (Szkudelski, 2001).

Os resultados do presente trabalho mostraram também uma diminuição na atividade da SOD na amígdala e no estriado. Entretanto, a atividade da CAT aumentou no hipocampo. Os mecanismos pelos quais tais efeitos tenham ocorridos não podem ser explicados, mas é importante relatar que um aumento nas concentrações de enzimas antioxidantes pode ser relacionado a uma resposta ao estresse oxidativo (Michel et al., 2004). Outro estudo também mostrou uma diminuição na atividade da SOD e um aumento na atividade da CAT em cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de estresse crônico moderado (Lucca et al., 2009).

O dano oxidativo pode ser também relacionado as disfunções no metabolismo energético. De fato, no presente estudo também foi mostrado um aumento na atividade dos complexos I e IV no hipocampo, nos complexos II e II-III no córtex pré-frontal e no estriado, e no complexo IV no córtex pré-frontal; entretanto ocorreu uma diminuição na atividade do complexo VI no estriado. Além disso, houve uma diminuição na atividade da creatina quinase no estriado e um aumento na atividade da citrato sintase no hipocampo de ratos diabéticos.

Algumas pesquisas têm mostrado uma relação entre diabetes e a função mitocondrial (Liu et al., 2009; Lu et al., 2009; Ritov et al., 2010; Schiff et al., 2009; Edwards et al., 2010). Por exemplo, disfunção mitocondrial têm sido implicada na resistência a insulina relacionada ao diabetes do tipo 2 (Johannsen & Ravussin, 2009). As alterações mitocondriais podem ocorrer também por desequilíbrio nos parâmetros de estresse oxidativo. De fato, ROS provocam danos na fosforilação oxidativa mitocondrial (Adam-Vizi, 2005).

O presente estudo também avaliou se o modelo animal de diabetes induzido por aloxano levaria a comportamentos do tipo depressivo em ratos. Foi observado que ratos diabéticos tiveram comportamento do tipo depressivo no teste do nado forçado. Um fato interessante foi que a imipramina, um antidepressivo tricíclico clássico, reverteu essas alterações, mostrando efeitos antidepressivos nesses animais. Além disso, a imipramina aumentou os níveis de BDNF no córtex pré-frontal em ratos diabéticos. O papel do BDNF tanto na diabetes quanto na depressão vem sendo abordado por diversos pesquisadores (Arentoff et al., 2009; Duman & Monteggia, 2006; Rao et al., 2008; Taliaz et al., 2011). O tratamento com

antidepressivos levou a uma redução de sintomas depressivos em pacientes diabéticos (Van der Feltz-Cornelis, 2010).

O comportamento do tipo depressivo apresentado pelos animais diabéticos no presente estudo estão de acordo com dados literatura, os quais mostram tais efeitos. Sharma et al. (2010) relatou que ratos geneticamente modificados para os genes db/db exibiram comportamento do tipo depressivo no teste de natação forçada. Além disso, foi mostrado comportamento do tipo depressivo em ratos submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por estreptozotocina (Hirano, Miyata & Kamei, 2007). Alguns autores têm relatado que o clonazepam, um benzodiazepínico, reverteu o aumento no tempo imobilidade de ratos diabéticos submetidos ao teste de natação forçada (Gomez & Barros, 2000; Rajtar, Zolkowska & Keinrok, 2003; Haeser et al., 2007; Wayhs et al., 2010), mostrando assim um efeito antidepressivo nestes animais.

Semelhante aos resultados do presente estudo, Anjaneyulu, Chopra & Kaur (2003) mostraram que a quercetina, um bioflavonóide, e os antidepressivos fluoxetina (5 mg/kg) e imipramina (15 mg/kg) reduziram o tempo de imobilidade em ratos diabéticos submetidos ao modelo animal de diabetes induzido por estreptozotocina.

O BDNF é uma neurotrofina que tem um papel importante na sobrevivência e diferenciação de neurônios no sistema nervoso periférico e central (Reichardt, 2006; Yoshii & Constantine-Paton, 2010). Além disso, o BDNF parece desempenhar um papel na regulação da ingestão alimentar e peso corporal (Yeo et al., 2004; Akkermann et al., 2011). Estudos da literatura têm caracterizado o papel do BDNF na depressão (Yu & Chen, 2011). Redução dos níveis de BDNF foram relatados no

plasma, soro e em cérebro de animais e humanos com depressão (Karege et al., 2008; Kozisek et al., 2008). Por outro lado, o tratamento com antidepressivos aumentou os níveis de BDNF (De Foubert et al., 2004). No diabetes também tem sido demonstrado um papel do BDNF. Por exemplo, Krabbe et al. (2006) mostraram uma redução nos níveis plasmáticos de BDNF em humanos com diabetes do tipo 2, independente da obesidade. No entanto, Suwa et al. (2006) relataram um aumento nos níveis séricos de BDNF de pacientes com diabetes do tipo 2, associado com a obesidade.

Em conclusão foi demonstrado no presente estudo uma elevada prevalência de transtornos depressivos, risco de suicídio e uma pior qualidade de vida em pacientes com diabetes do tipo 2. Além disso, o controle inadequado do DM mostrou ser um fator para maior gravidade dos transtornos e sugerem-se mais estudos que investiguem as bases biológicas da associação da depressão entre pacientes diabéticos.

Além disso, o modelo animal de diabetes induzido pelo aloxano não alterou a memória de reconhecimento, mas levou a comportamentos do tipo depressivo, além de alterações cerebrais nos parâmetros de estresse oxidativo e do metabolismo energético. A imipramina apresentou efeitos antidepressivos nesses animais e aumentou os níveis de BDNF. As alterações neuroquímicas apresentadas por este modelo podem explicar a fisiopatologia dessa doença. No entanto, mais estudos tanto em modelos animais quanto em pacientes diabéticos são sugeridos para melhor entender as alterações cognitivas, comportamentais e moleculares, afim de buscar novos alvos para seu tratamento.

9 REFERENCIAS

ABRAHAMIAN FM; TALAN DA; MORAN GJ. Management of skin and soft-tissue infections in the emergency department. **Infectious Disease Clinics of North America** 22: 89–116. 2008.

ABRAMSON J; BERGER A; KRUMHOLZ HM; VACCARINO V. Depression and risk of heart failure among older persons with isolated systolic hypertension. **Archives International Medicine** 161: 1725–1730. 2001.

ADAM-VIZI V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and nonelectron transport chain sources. **Antioxidants Redox Signalling** 7: 1140–1149. 2005.

ADLER AL; STRATTON IM; NEIL W. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UPKDS 36): prospective observational study. **BMJ** 321: 412-420. 2000.

AHREN B. Vildagliptin na inhibitor of dipeptidyl peptidase – 4 with antidiabetic properties. **Expert Opinion in Investigational Drugs** 45: 431-442. 2006.

AKKERMANN K; HIIIO K; VILLA I; HARRO J. Food restriction leads to binge eating dependent upon the effect of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism. **Psychiatry Research** 185: 39-43. 2011.

ALBA-LOUREIRO TC; HIRABARA SM; MENDONCA JR; CURI R; PITHON-CURI TC.

Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils.

Journal Endocrinology 188: 295–303. 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Clinical practice recommendations. **Diabetes**

Care 31: 55-60. 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Hypertension management in adults with

diabetes. **Diabetes Care** 27: 65-7. 2004a.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Nutrition recommendations and interventions for

Diabetes: A position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**

30: 48-65. 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Preventive foot care in people with diabetes.

Diabetes Care 26: 78–9. 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Screening for type 2 diabetes. **Diabetes Care**

24: 11-4. 2004b.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes **Diabetes**

Care 29: 32-41. 2006.

ANDERSOHN F; SCHADE R; SUISSA S; GARBE E. Long-term use of antidepressants for depressive disorders and the risk of diabetes mellitus. **American Journal Psychiatry** 166: 591-598. 2009.

ANDERSON RJ; FREEDLAND KE; CLOUSE RE; LUSTMAN PJ . The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care** 24: 1069–1078. 2001.

ANJANEYULU M; CHOPRA K; KAUR I. Antidepressant activity of quercetin, a bioflavonoid, in streptozotocin-induced diabetic mice. **Journal Medicine Food** 6: 391-395. 2003.

ANKARCRONA M; DYPBUKT JM; BONFOCO E; ZHIVOTOVSKY B; ORRENIUS S., LIPTON SA; NICOTERA P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron** 15: 961-973. 1995.

ARENTOFT A; SWEAT V; STARR V; OLIVER S; HASSENSTAB J; BRUEHL H; TIRSI A; JAVIER E; MCHUGH PF; CONVIT A. Plasma BDNF is reduced among middle-aged and elderly women with impaired insulin function: Evidence of a compensatory mechanism. **Brain Cognition** 71: 147–152. 2009.

ASSUNÇÃO MCF; SANTOS IS; DIAS DA COSTA JS. Avaliação do Processo da Atenção Médica: Adequação do Tratamento de Pacientes com Diabetes Mellitus, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** 18. 2002.

AWAD N; GAGNON M; MESSIER C. The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. **Journal Clinic Experimental Neuropsychology** 26: 1044–1080. 2004.

BACALTCHUK J; HAY P. Antidepressants versus placebo for people with bulimia nervosa. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. 4. 2003.

BARZILAY JI; ABRAHAM L; HECKBERT SR; CUSHMAN M; KULLER LH; RESNICK HE; TRACY RP. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. **Diabetes** 50: 2384–2389. 2001.

BEAL MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? **Annual Neurology** 31: 119-130. 1992.

BEAUQUIS J; HOMO-DELARCHE F; GIROIX MH; EHSES J; COULAUD J; ROIG P; PORTHA B; DE NICOLA AF; SARAVIA F. Hippocampal neurovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations in spontaneously type 2 diabetic GK rats. **Experimental Neurology** 222: 125–134. 2010.

BEGLIOUMINI S; CASAROSA E; PLUCHINO N; LENZI E; CENTOFANI M; FRESCHI M; GENAZZANI AD; LUISI S; GENAZZANIO AR. Influence endogenous and exogenous sex hormones on brain-derived neurotrophic factor. **Human Reproduction** 22: 995-1002. 2007.

BELLUSH LL; REID SG; NORTH D. The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. **Physiology & Behavior** 50: 973-981. 1991.

BERTON O; NESTLER EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Review Neuroscience** 7: 137-151. 2006. BIANCHI C. Primary prevention of cardiovascular disease in people with dysglycemia. **Diabetes Care** 31: 208-214. 2008.

BIESSELS GJ; GISPEN WH. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? **Neurobiology Aging** 1: 36-41. 2005.

BIESSELS GJ; STAEKENBORG S; BRUNNER E; BRAYNE C; SCHELTENS P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. **Lancet Neurology** 5: 64-74. 2006.

BIESSELS GJ; VAN DER HEIDE LP; KAMAL A; BLEYS RL; GISPEN WH. Aging and diabetes: implications for brain function. **European Journal of Pharmacology**. 441: 1-14. 2002.

BIMONTE-NELSON HA **et al.**, **Experimental Neurology** 181: 301-312. 2003.

BOQUIST L. Differences in the blood glucose response of mice to alloxan and alloxan-inhibiting compounds. **Acta Endocrinology** 92: 687-693. 1979.

BOT M; OIS POUWER F; ORMEL J; SLAETS JPS; DE JONGE P. Original Article: Education and psychological aspects Predictors of incident major depression in diabetic outpatients with subthreshold depression. **Diabetes Medicine** 27; 1295–1301. 2010.

BOULANGER LM. Immune Proteins in Brain Development and Synaptic Plasticity. **Neuron** 64: 93-109. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de informações sobre Mortalidade. Disponível em: [HTTP://www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br). Acessado em 08/07/2010.

BRENNAN FM; ALLARD S; LONDEI M; SAVILL C; BOYLSTON A; CARREL S; MAINI RN; FELDMANN M. Heterogeneity of T cell receptor idiotypes in rheumatoid arthritis. **Clinical Experimental Immunology** 73: 417. 1998.

BRUCE DG; DAVISWA; STARKSTEIN SE; DAVIS TM. A prospective study of depression and mortality in patients with type 2 diabetes: The Fremantle Diabetes Study. **Diabetologia** 48: 2532–2539. 2005.

BUSS PM. Promoção da saúde e qualidade de vida. **Ciência e Saúde Coletiva** 5: 163-177. 2000.

CADENAS E; DAVIES KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. **Free Radical Biological Medicine** 29: 222-230. 2000.

CARVALHEIRA, ZECCHIN & SAAD. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo** 46. 2002.

CERIELLO A; MOROCUTTI A; MERCURI F; QUAGLIARO L; MORO M; DAMANTE G; VIBERTI GC. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. **Diabetes** 49: 2170-2177. 2000.

CHANG CC; CHIEH-YU C; YANG-TZU W; PIUNG-PANG H; TZUNG-HAI Y; LI-MAN H. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. **Journal of Biomedical Science** 18: 47. 2011.

CHAO MV. Neurotrophins and their receptors: a converge point for many signaling pathways. **Nature Review Neuroscience** 4: 199-309. 2003.

CHIEN IC; WU EL; LIN CH; CHOU YJ; CHOU P. Prevalence of diabetes in patients with major depressive disorder: a population-based study. **Comprehensive Psychiatry** in press. 2011.

CIECHANOWSKI P; KATON W; RUSSO J. Depression and diabetes: impact of depressive symptoms on adherence, function and costs. **Archives International Medicine** 160: 3278–3285. 2000.

CIECHANOWSKI PS; KATON WJ; RUSSO JE. The relationship of depressive symptoms to symptom reporting, self care and glucose control in diabetes. **Diabetes Care** 25: 731-736. 2002.

CITROME L; JAFFE A; LEVINE J; ALLINGHAM B; ROBINSON J. Relationship between antipsychotic medication treatment and new cases of diabetes among psychiatric inpatients. **Psychiatric Services** 55: 1006-1013. 2004.

CLAVIJO, MILAGROS ET AL. Transtornos psiquiátricos em pacientes diabéticos tipo 2 em distrito docente assistencial de Rio Branco - Acre. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** 64: 807-813. 2006.

CLOUSE RE; LUSTMAN PJ; FREEDLAND KE; GRIFFITH LS; MCGILL JB; CARNEY RM. Depression and coronary heart disease in women with diabetes. **Psychosomatic Medicine** 65: 376–383. 2003.

COOPER J; HARRIS Y; MCGREADY J. Sadness predicts death in older people. **Journal Aging Health** 14: 509-526. 2002.

- COX JÁ; HENNEBERRY RC. Excitatory amino acid neurotoxicity and the N-methyl- D-aspartate receptor in cultured neurons: role of the voltage-dependent magnesium block. **Brain Research** 499: 267-272. 1989.
- DALLE-DONNE ID; GIUSTARINI R; COLOMBO R; ROSSI MILZANI A. Protein carbonylation in human diseases. **Trends Molecula Medicine** 9: 169-176. 2003.
- DANDONA P; ALJADA A; BANDYOPADHYAY A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunology** 25: 4–7. 2004.
- DAVIS SN; GRANNER DK. The role of glimepiride in the effective management of Type 2 diabetes. **Journal Diabetes Complications** 18: 367-376. 2004.
- DE FOUBERT G; CARNEY SL; ROBINSON CS; DESTEXHE EJ TOMLINSON R; HICKS CA; MURRAY TK; GAILLARD JP; DEVILLE C; XHENSEVAL V; THOMAS CE; O'NEILL MJ; ZETTERSTRÖM TS. Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. **Neuroscience** 128: 597–604. 2004.
- DE GROOT M; ANDERSON R; FREEDLAND KE; et al. Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. **Psychosomatic Medicine** 63: 619-30. 2001.
- DE LUCCIA N. Doença vascular e diabetes. **Jornal Vascular Brasileiro** 2: 49-60. 2003.

DERIJKS HJ; HEERDINK ER; DE KONING FH; JANKNEGHT R; KLUNGEL OH; EGBERTS AC. The association between antidepressant use and hypoglycaemia in diabetic patients: a nested case-control study. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety** 17: 336-344. 2008.

DERIJKS HJ; HEERDINK ER; DE KONING FH; JANKNEGHT R; KLUNGEL OH; EGBERTS AC. The association between antidepressant use and hypoglycaemia in diabetic patients: a nested case-control study. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 17: 336-344. 2008.

DIMATTEO MR; LEPPER HS; CROGHAN TW. Depression is a risk factor for noncompliance with medical treatment: meta-analysis of the effects of anxiety and depression on patient adherence. **Archives International Medicine** 160: 2101-2107. 2000.

DUMAN RS; MONTEGGIA LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological Psychiatry** 59: 1116–1127. 2006.

DUNN JS. An experimental lesion of the pancreatic islets. **Surgo** 9: 32-34. 1943.

EATON WE; ARMENIAN H; GALLO J; PRATT L; FORD DE. Depression and risk of onset of type II diabetes: a prospective population-based study. **Diabetes Care** 20: 1097-1102. 1996.

EATON WW; ARMENIAN H; GALLO J; PRATT L; FORD DE.. Depression and risk for onset of type ii diabetes: a prospective population-based study. **Diabetes Care** 22: 1097-1102. 1996.

EDWARDS JL; QUATTRINI A; LENTZ SI; FIGUEROA-ROMERO C; CERRI F; BACKUS C; HONG Y; FELDMAN EL. Diabetes regulates mitochondrial biogenesis and fission in mouse neurons. **Diabetologia** 53: 160-169. 2010.

EGEDE LE; ZHENG D; SIMPSON K. Comorbid depression is associated with increased health care use and expenditures in individuals with diabetes. **Diabetes Care** 25: 464-470. 2002.

FELIG P; FROHMAN LA. **Endocrinology & Metabolism**. 4. ed., New York: McGraw-Hill. 2001.

FINCKE GB; CLARK JA; LINZER M; SPIRO RD; MILLER DR; LEE A; KAZIS LE. Assessment of long-term complications due to type 2 diabetes using patient self-report. **Journal Ambulatory Care Manage** 28: 262-273. 2005.

FISCHER T; SKOVLUND SE. Dificuldades do dia a dia e o desgaste psicológico no diabetes tipo I e tipo II. **Diabetes Clínica** 3: 282-286. 1999.

FLECK MPA. O instrumento de avaliação da qualidade de vida mundial da saúde (WHOQOL – 100): características e perspectivas. **Revista Ciência e Saúde Coletiva** 5. 2000.

GALLACHER SJ; THOMSON G; FRASER WD; FISHER BM; GEMMELL CG; MACCUISH AC. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control. **Diabetes Medicine** 12: 916–920. 1995.

GLOBALNEWS INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. A diabetes mata sem distinção. **Diabetes Clínica** 10: 80-82. 2006.

GOLDEN SH. A review of the evidence for a neuroendocrine link between stress, depression and diabetes mellitus. **Current Diabetes Review** 3: 252-259. 2007.

GOLDEN SH; LAZO M; CARNETHON M; BERTONI AG; SCHREINER PJ; DIEZ ROUX AV; LEE HB; LYKETSOS C. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. **JAMA** 299: 2751-2759. 2008.

GOMEZ R; BARROS HMT. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. **Pharmacology Biochemistry Behavior** 66: 329–335. 2000.

GOODMAN E; WHITAKER RC. A prospective study of the role of depression in the development and persistence of adolescent obesity. **Pediatrics** 110: 497-504. 2002.

GRAEME FINCKE B; JACK A; CLARK PHD; MARK LINZER MD; AVRON SPIRO PHD; DONALD R; MILLER SCD; AUSTIN LEE PHD; LEWIS E; KAZIS SCD. Assessment of Long-term Complications due to Type 2 Diabetes Using Patient Self-report. **Journal Ambulatory Care Manage** 28. 262–273. 2005.

HAHL J; HAMALAINEN H; SINTONEN H; SIMELL T; ARINEN S; SIMELL O. Health-related quality of life in type 1 diabetes without or with symptoms of long-term complications. **Quality of Life Research** 11: 427–436. 2002.

HALLIWELL B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Radicals Research** 4: 261-272. 1999.

HALLIWELL BE; GUTTERIDGE JMC. In: Free radicals in biology medicine. Oxford University Press Inc. N.Y. 3th ed, 1999.

HAN TS; VAN LEER EM; SEIDELL JC; LEAN ME. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: Prevalence study in a random sample. **British Medical Journal**, London, 311: 1401-1405. 1995.

HANESTAD BR. Self-reported quality of life and the effect of different clinical and demographic characteristics in people with type 1 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice** 19: 139-149. 1993.

HASSING LB; HOFER SM; NILSSON SE; BERG S; PEDERSEN NL; MCCLEARN G; JOHANSSON B. Comorbid type 2 diabetes mellitus and hypertension exacerbates cognitive decline: evidence from a longitudinal study. **Age Ageing** 33: 355–361. 2004.

HEALES SJR; BOLANOS JP; STEWART V; BROOKES PS; LAND JM; Clark JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochemistry Biophysic Acta** 1410: 215–228. 1999.

HEALES SJR; BOLANOS JP; STEWART V; BROOKES PS; LAND JM; CLARK JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. **Biochemistry Biophysic Acta** 1410: 215–228. 1999.

HERMAN GA; STEIN PP; THONBERRY NA; WAGNER JA. Dispeptidyl peptidase – 4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: focus on sitagliptin. **Clinic Pharmacology Therapy**. 81: 761-767: 2007.

HIRANO S; MIYATA S; KAMEI J. Antidepressant-like effect of leptin in streptozotocin-induced diabetic mice. **Pharmacology Biochemistry Behavior** 86: 27-31. 2007.

HOWARD BV; BEST LG; GALLOWAY JM; HOWARD WJ; JONES K; LEE ET; RATNER RE; RESNICK HE; DEVEREUX RB. Coronary heart disease risk equivalence in diabetes depends on concomitant risk factors. **Diabetes Care** 29: 391-397. 2006.

IMAEDA A; AOKI T; KONDO Y; HORI M; OGATA M; OBAYASHI H; HASEGAWA G; NAKAMURA N; TOKUDA K; NISHINO H; YOSHIKAWA T; KONDO M. Protective effects of fluvastatin against reactive oxygen species induces DNA damage and mutagenesis. **Free Radical Research** 34: 33-44. 2001.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF) – Guia Global para La diabetes tipo 2 – Clinical Guidelines Task Force Bruselas: Federación internacional de Diabetes, 2006.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas. 3. ed. Brussel, 2006. Disponivel em: <<http://www.eatlas.idf.org/webdata/docs/backgroundopeningpc.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2009.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE DIABETIC FOOT. International Consensus on the Diabetic Foot. Amsterdam: International Working Group on the Diabetic Foot, 2007.

JOHANNSEN DL; RAVUSSIN E. The role of mitochondria in health and disease. **Current Opinion Pharmacology** 9: 780–786. 2009.

JUNG SW; HAN OK; KIM SJ. Increased expression of β amyloid precursor gene in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice with memory deficit and anxiety induction. **Journal of Neural Transmission** 11: 1411-1418. 2010.

KANAYA AM; BARRETT-CONNOR E; GILDENGORIN G; YAFFE K. Change in cognitive function by glucose tolerance status in older adults: a 4-year prospective study of the Rancho Bernardo study cohort. **Archive International Medicine** 164: 1327–1333. 2004.

KAREGE F; PERRET G; BONDOLFI G; SCHWALD M; BERTSCHY G; AUBRY JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatric Research** 15: 143–148. 2002.

KASPER S; HAJAK G; WULFF K; HOOGENDIJK WJ; MONTEJO AL; SMERALDI E; RYBAKOWSKI JK; QUERA-SALVA MA; WIRZ-JUSTICE AM; PICAREL-BLANCHOT F; BAYLÉ FJ. Efficacy of the novel antidepressant agomelatine on the circadian rest-activity cycle and depressive and anxiety symptoms in patients with major depressive disorder: a randomized, doubleblind comparison with sertraline. **Journal Clinic Psychiatry** 71: 109-120. 2010.

KATON W; SULLIVAN M; WALKER E. Medical symptoms without identified pathology: relationship to psychiatric disorders, childhood and adult trauma and personality traits. **Annual International Medicine** 134: 917-925. 2001.

KATON W; VON KORFF M; CIECHANOWSKI P; RUSSO J; LIN E; SIMON G; LUDMAN E; WALKER E; BUSH T; YOUNG B. Behavioral and clinical factors associated with depression among individuals with diabetes. **Diabetes Care** 27: 914–920. 2004.

- KATON WJ. Clinical and health services relationships between major depression, depressive symptoms, and general medical illness. *Biological Psychiatry* 54: 216-226. 2003.
- KAWAKAMI K; OMURA K; KANEHIRA E; WATANABE Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. **Anticancer Research** 19: 3249–3252.1999.
- KHAZAIE H; RAHIMI M; TATARI F; REZAEI M; NAJAFI F; TAHMASIAN M. Treatment of depression in type 2 diabetes with Fluoxetine or Citalopram? **Neurosciences** 16:42-45. 2011.
- KHUCHUA ZA; QIN W; BOERO J; CHENG J; PAYNE RM; SAKS VA; STRAUSS AW. Octamer formation and coupling of cardiac sarcomeric mitochondrial creatine kinase are mediated by charged N-terminal residues. **Journal Biology Chemistry** 273:22990–22996. 1998.
- KING H; AUBERT RE; HERMAN WH. Global burden of diabetes, 1995-2025. **Diabetes Care** 1: 1414-1431. 1998.
- KOZISEK ME; MIDDLEMAS D; BYLUND DB. Brain-derived neurotrophic factor and its receptor tropomyosin-related kinase B in themechanism of action of antidepressant therapies. **Pharmacology Therapy** 117: 30–51. 2008.

KRABBE KS; NIELSEN AR; PLOMGAARD P; RASMUSSEN P; ERIKSTRUP C; FISCHER CP; LINDEGAARD B; PETERSEN AMW; TAUDORF S. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. **Diabetologia** 50: 431-438. 2006.

KRABBE KS; NIELSEN AR; KROGH-MADSEN R; PLOMGAARD P; RASMUSSEN P; ERIKSTRUP C; FISCHER CP; LINDEGAARD B; PETERSEN AM; TAUDORF S; SECHER NH; PILEGAARD H; BRUUNSGAARD H; PEDERSEN BK. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. **Diabetologia** 50: 431–438. 2006.

KRUGER AJ; YANG C; LIPSON KL; PINO SC; LEIF JH; HOGAN CM; WHALEN BJ; GUBERSKI DL; LEE Y; UNGER RH; GREINER DL; ROSSINI AA; BORTELL R. Leptin treatment confers clinical benefit at multiple stages of virally induced type 1 diabetes in BB rats. **Autoimmunity** 44: 137-148. 2011.

KRUSE RL; LEMASTER JW; MADSEN RW. Fall and balance outcomes after an intervention to promote leg strength, balance, and walking in people with diabetic peripheral neuropathy: "feet first" randomized controlled trial. **Physiology Therapy** 90: 1568-1579. 2010.

KUHN R. The treatment of depressive states with G22355 (imipramine hydrochloride). **American Journal Psychiatry** 115: 459-464. 1958.

KUMAMARU E; NUMAKAWA T; ADACHI N; YAGASAKI Y; IZUMI A; NIYAZ M; KUDO M; KUNUGI H. Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated

maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase. **Molecular Endocrinology** 22: 546-558. 2008.

KURIYAMA S; KOIZUMI Y; MATSUDA-OHMORI K; SEKI T; SHIMAZU T; HOZAWA A; AWATA S; TSUJI I. Obesity and depressive symptoms in elderly Japanese: the Tsurugaya Project. **Journal Psychosomatic Research** 60: 229–235. 2006.

LASHIN; OSSAMA M. Modificação funcional da mitocôndria cardíaca no diabetes tipo 1. **Doctor of philosophy, case western reserve university, fisiologia e biofísica**. 2005. 2005.

LATINI DM; CHAN JM; COWAN JE; ARREDONDO AS; KANE CJ; PENSON DF; DUCHANE J; CARROL PR. CaPSURE. investigators Health-related quality of life for men with prostate cancer and diabetes: a longitudinal analysis from CaPSURE. *Journal article; research support*. 68: 1242-1247. 2006.

LEEDOM L; MEEHAN WP; PROCCI W; ZEIDLER A. Symptoms of depression in patients with type II diabetes mellitus. **Psychosomatics** 32: 280-286. 2001.

LEHNINGER AL; NELSON DL; COX MM. **Princípios de bioquímica**. 4 ed. Sarvier, São Paulo, 2007.

LENZEN S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia** 51: 216–226. 2008.

LIN HW; CHAU T; LIN CS; LIN SH. Recurring paralysis *BMJ Case Reports* 2009.

- LIU S; OKADA T; ASSMANN A; SOTO J; LIEW CW; BUGGER H; SHIRIHAI OS; ABEL ED; KULKARNI RN. Insulin signaling regulates mitochondrial function in pancreatic beta-cells. **PLoS One** 4: 7983. 2009.
- LIU X; KIM CN; YANG J; JEMMERSSON R; WANG X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell*. 86: 147–157. 1996.
- LOU SJ; LIU JY; CHANG H; CHEN PJ. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Research** 1210: 48-55. 2008.
- LU H; KOSHKIN V; ALLISTER EM; GYULKHANDANYAN AV; WHEELER MB. Molecular and metabolic evidence for mitochondrial defects associated with {beta}-cell dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes. **Diabetes** 53: 448-459. 2009.
- LU Y; CHRISTIAN K; LU B; BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? **Neurobiology Learning and Memory** 89: 312-323. 2008.
- LUCCA G; COMIM CM; VALVASSORI SS; RÉUS GZ; VUOLO F; PETRONILHO F; DAL-PIZZOL F; GAVIOLI EC; QUEVEDO J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. **Neurochemistry International** 54: 358–362. 2009.
- LUSTMAN PJ, ANDERSON RJ, FREEDLAND KE, DE GROOT M, CARNEY RM, CLOUSE RE. Depression and poor glycemic control. **Diabetes Care** 237: 934-942. 2000.
- LUSTMAN PJ; GRIFFITH LS; GAVARD JA; CLOUSE RE. Depression in adults with diabetes. **Diabetes Care** 15: 1631–1639. 1992.

- MALAISSSE WJ; MALAISSSE-LAGAE F; SENER A; PIPELEERS DG. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 79: 927-930. 1982.
- MALERBI DA; FRANCO LJ. The Brazilian Cooperative Group on the study of diabetes prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the Urban Brazilian Population aged 30-69 years. **Diabetes Care** 15: 1509-1516. 1992 .
- MARCO R; PESTAÑA A; SEBASTIAN J; SOLS A. Oxaloacetate metabolic crossroads in liver. Enzyme compartmentation and regulation of gluconeogenesis. **Molecular Cellular Biochemistry** 3:53-70. 1974.
- MARINI AM; JIANG X; WU X; PAN H; GUO Z; MATTSON MP; BLONDEAU N; NOVELLI A; LIPSKY RH. Precondition and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. **Amino Acids** 32: 299-304. 2007.
- MCCALL AL. The impact of diabetes on the CNS. **Diabetes** 41: 557–570. 1992.
- MICHEL TM; THOMAS J; MARTIN D; NARA K; ZWERINA S; TATSCHNER T; WEIJERS HG; KOUTSILIERI E. Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutase levels in brains of patients with schizophrenic psychosis. **Neuronal Journal Trasmision** 11: 1191–1201. 2004.
- MINAYO MCS; HARTZ ZMA; BUSS PM. Qualidade de vida e saúde: um debate necessário. **Ciência e Saúde Coletiva** 5: 7-18. 2000.
- MINAYO MCS; HARTZ ZMA; BUSS PM. Qualidade de vida e saúde: um debate necessário. **Ciência e Saúde Coletiva** 5: 7-18. 2000.

- MURAKAMI AE; FIQUEIREDO DF; PERRUZI AZ; FRANCO JR G; SAKAMOTO MI. Níveis de sódio para poedeiras Comerciais no Primeiro Segundo ciclo de produção. **Revista Brasileira de Zootecnia** 32: 1674-1680. 2005.
- MURRAY CJL; LOPEZ AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet** 349: 1498-504. 1997.
- MURRAY RK; GRANNER DK; MAYES PA; RODWELL VW. Harper's Illustrated Biochemistry. 26.ED. Mcgraw-Hill Companies, New York, 703. 2003.
- MUSSELMAN DL; BETAN E; LARSEN H; PHILLIPS LS. Relationship of depression to diabetes types 1 and 2: epidemiology, biology and treatment. **Biological Psychiatry** 54: 317-329. 2003.
- NAKAGAWA T; TSUCHIDA A; ITAKURA Y; NONOMURA T; ONO M; HIROTA F; INOUE T; NAKAYAMA C; TAIJI M; NOGUCHI H. Brain-derived neurotrophic factor regulates glucose metabolism by modulating energy balance in diabetic mice. **Diabetes** 49: 436-444. 2000.
- NATHAN DM; BUSE JB; DAVIDSON MB; HEINE RJ; HOLMAN RR; SHERWIN R; ZINMAN B. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the study of Diabetes. **Diabetes Care** 29: 1963-1972. 2006.
- NAU DP; AIKENS JE; PACHOLSKI AM. Effects of gender and depression on oral medication adherence in persons with type 2 diabetes mellitus. **General Medicine** 4: 205-213. 2007.
- NESTLER EJ; BARROT M; DILEONE RJ; EISCH AJ; GOLD SJ; MONTEGGIA LM. Neurobiology of depression. **Neuron** 34: 13-25. 2002.

- NESTLER EJ; CARLEZON WA JR. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biological Psychiatry** 59: 1151-1159. 2006.
- NICHOLLS DG; AKERMAN K. **Biochimistry Biophysic Acta** 683: 57-88, 1982.
- NISHIKAWA T; ARAKI E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. **Antioxidant Redox Signal** 9: 343–353. 2007.
- O'CONNOR PJ; CRAIN AL; RUSH WA; HANSON AM; FISCHER LR; KLUZNIK JC. Does diabetes double the risk of depression? **Annals of Family Medicine** 74: 328-335. 2009.
- OLIVEIRA AF; et al. Global burden of disease attributable to diabetes mellitus in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública** 25: 1234-1244. 2009.
- O'NEIL A; WILLIAMS ED; STEVENSON CE; OLDENBURG B; BERK M; SANDERSON K. Co-morbid cardiovascular disease and depression: sequence of disease onset is linked to mental but not physical self-rated health. Results from a cross-sectional, population-based study. **Social Psychiatry Psychiatric Epidemiology** in press. 2011.
- ONO M; ICHIHARA J; NONOMURA T; ITAKURA Y; TAIJI M; NAKAYAMA C; NOGUCHI H. Brain-derived neurotrophic factor reduces blood glucose level in obese diabetic mice but not in normal mice. **Biochemistry Biophysic Research Commun** 238: 633–637.1997.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cuidados inovadores para condições crônicas: componentes estruturais de ação. Relatório mundial. Brasília: OMS, 2003.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. La diabetes: una declaracion para las Americas. Boletin Oficina Sanitaria Panamericana, Washington, 121: 5. 1996.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZACION, New PAHO Publication on Diabetes Education launched, acessado em 04 de outubro de 2011, disponível em <http://www.paho.org/english/DPI/pr030117.html>

PAPELBAUM M; MOREIRA RO; COUTINHO W; KUPFER R; ZAGURY L FREITAS S; APPOLINARIO JC. Depression, glycemic control and type 2 diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome** 3: 26. 2011.

PAPELBAUM M; MOREIRA RO; ELLINGER VCM; ZAGURY L; APPOLINARIO JC. Comorbidade psiquiátrica no paciente diabético. **Psiquiatria na prática médica**. 34: 82-85. 2001.

PARKER KJ; SCHATZBERG AF; LYONS DM. Neuroendocrine aspects o hypercortisolism in major depression. **Horm Behavior** 43: 60-66. 2003.

PEDROSA HC; MACEDO GC; RIBEIRO J. Pe diabetico. In: LYRA R; CAVALCANTI N. Diabetes Mellitus. Rio de Janeiro: Diagraphic 557-568. 2006.

PEIXOTO SV; GIATTI L; AFRADIQUE ME; LIMA-CostaF MF. Custo das internações hospitalares entre idosos brasileiros no âmbito do Sistema Único de Saúde. **Epidemiologia e Serviço de Saúde** 13: 46-53. 2004.

POMPILI M; POMPILI DL; INNAMORATI M; DE PISA E; AMORE M; FERRARA C; TATARELLI R; GIRARDI P. Quality of Life and Suicide Risk. **Psychosomatics** 50: 16–23. 2009.

POUWER F; KUPPER N; ADRIAANSE MC. Does emotional stress cause type 2 diabetes mellitus? A review from the European Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium. **Discovery Medicine** 9: 112-118. 2010.

- PRADHAN AD; MANSON JE; RIFAI N; BURING JE; RIDKER PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA** 286: 327–334. 2001.
- RAJTAR G; ZOLKOWSKA D; KEINROK Z. Effect of diazepam and clonazepam on the function of isolated rat platelet and neutrophils. **International Medicine Journal Experimental Clinic Research** 8: 37–44. 2002.
- RAO AA; SRIDHAR GR; SRINIVAS B; DAS UN. Bioinformatics analysis of functional protein sequences reveals a role for brain-derived neurotrophic factor in obesity and type 2 diabetes mellitus. **Medicine Hypotheses** 70: 424–249. 2008.
- RAO AA; SRIDHAR GR; SRINIVAS B; DAS UN. Bioinformatics analysis of functional protein sequences reveals a role for brain-derived neurotrophic factor in obesity and type 2 diabetes mellitus. **Medicine Hypotheses** 70: 424–449. 2008.
- REICHARDT LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences** 361:1545-1564. 2006.
- RITOV VB; MENSHIKOVA EV; AZUMA K; WOOD RJ; TOLEDO FG; GOODPASTER BH; RUDERMAN NB; KELLEY DE. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. **American Journal of Physiology and Endocrinology and Metabolic** 298: 49-58. 2009.
- ROCHA FF; BEZERRA BPS. Síndrome metabólica e transtornos psiquiátricos: uma associação que não pode ser esquecida. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo** 50: 1138-1139. 2006.

- ROGLIC G; UNWIN N; BENNETT PH; MATHERS C; TUOMILEHTO J; NAG S; CONNOLLY V; KING H. The burden of morality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. **Diabetes Care** 28: 2130-2135. 2005.
- ROY A; ROY M; JANAL M. Suicide attempts and ideation in African-American type 1 diabetic patients. **Psychiatry Research** 179: 53–56. 2010.
- RUBIN RR MA Y; MARRERO DG; PEYROT M; BARRETT-CONNOR EL; KAHN SE; HAFFNER SM, PRICE DW, KNOWLER WC. Elevated depression symptoms, antidepressant medicine use, and risk of developing diabetes during the diabetes prevention program. **Diabetes Care** 31: 420-426. 2008.
- RUBIN RR. Adherence to pharmacologic therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Medicine** 118. 27-34. 2002.
- RUBIN RR; PEYROT M. Psychological issues and treatments for people with diabetes. **Journal Clinical Psychology** 57: 457-478. 2001.
- RUBIN RR; PEYROT M. Was Willis right? Thoughts on depression as a cause of diabetes. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**. 18: 173-175. 2002.
- SACCO ICN; et al. Avaliacao das perdas sensorio-motoras do pe e tornozelo decorrentes da neuropatia diabetica. **Revista Brasileira de Fisioterapia** 11: 27-33. 2007.
- SACCO WP; WELLS KJ; FRIEDMAN A; MATTHEW R; PEREZ S; VAUGHAN CA. Adherence, body mass index, and depression in adults with type 2 diabetes: the mediational role of diabetes symptoms and self-efficacy. **Health Psychology** 26: 693-700. 2007.

- SATTLER R; ROTHSTEIN JD. Targeting an old mechanism in a new disease – protection of glutamatergic dysfunction in depression. **Biological Psychiatry** 61: 137-138. 2007.
- SCHIFF M; LOUBLIER S; COULIBALY A; BÉNIT P; OGIER DE BAULNY H; RUSTIN P. Mitochondria and diabetes mellitus: untangling a conflictive relationship? **Journal of Inherited Metabolic Disease** 32: 684-698. 2009.
- SCHLATTNER U; WALLIMANN T. Octamers of mitochondrial creatine kinase isoenzymes differ in stability and membrane binding. **Journal Biology Chemistry** 275: 17314–17320. 2000.
- SCHRAMM JMA; OLIVEIRA AF; LEITE IC; VALENTE JG; GADELHA AMJ; PORTELA MC; et al Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva** 9: 897-908. 2004.
- SEIDL EMF; ZANNON CMLC. Qualidade de vida e saúde: aspectos conceituais e metodológicos. **Caderno de Saúde Pública** 20: 580-588. 2004.
- SHARMA AN; ELASED KM; GARRETT TL; LUCOT JB. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. **Physiology Behavior** 101: 381–388. 2010.
- SHEPHERD D; GARLAND PB. The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. **Biochemistry Journal** 114: 597-610. 1969.
- SHIMIZU H; KAWAKAMI N; TAKATSUKA N; SHIMIZU H; ISHIBASHI H. Depressive symptoms and the occurrence of type 2 diabetes among Japanese men. **Diabetes care** 22: 107-116. 1999.
- SILVA I; PAIS-RIBEIRO J; CARDOSO H; RAMOS H. Qualidade de vida e complicações crônicas do diabetes. **Análise Psicológica** 2: 185-194. 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso brasileiro de tratamento e acompanhamento do diabete mellitus. Rio de Janeiro: Diagrafic. 2007.

STRACHAN MW; DEARY IJ; EWING FM; FRIER BM. Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. **Diabetes Care** 20: 438–445. 1997.

SUWA M; KISHIMOTO H; NOFUJI Y; NAKANO H; SASAKI H; RADAK Z; KUMAGAI S. Serum brain-derived neurotrophic factor level is increased and associated with obesity in newly diagnosed female patients with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism** 55: 852–857. 2006.

SZAPACS ET; SZAPACS ME; MATHEWS TA; TESSAROLLO L; LYONS WE; MAMOUNAS LA; ANDREWS AM. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. **Journal Neuroscience Methods** 140:81–92. 2004.

SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the Rat pancreas. **Physiology Research** 50: 537-46. 2001.

TALBOT F; NOUWEN A. A review of the relationship between depression and diabetes in adults: is there a link? **Diabetes Care** 23: 1556–1562. 2000.

TALIAZ D; LOYA A; GERSNER R; HARAMATI S; CHEN A; ZANGEN A. Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. **Journal Neuroscience** 31: 4475-4483. 2011.

TEIXEIRA PJ; ROCHA FL. The prevalence of metabolic syndrome among psychiatric inpatients in Brazil. **Revista Brasileira de Psiquiatria** 29: 330-336. 2007.

- TEIXEIRA PJR; MOREIRA RO; ROCHA FL. Síndrome metabólica em pacientes psiquiátricos: orientações para prevenção, diagnóstico e tratamento. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria** 54: 334-339. 2005.
- TÉLLEZ-ZENTERO JF; CARDIEL MH. Risk factors associated with depression in patients with type 2 diabetes mellitus. **Archives of Medical Research** 33: 53-60. 2002.
- THE WHOQOL GROUP. The World Health Organization quality of life assessment (WHOQOL): position paper from the World Health Organization. **Soc SciMed.** 41:1403-1409. 1995.
- THOMAS J; JONES G; SCARINCI I; BRANTLEY P. A descriptive and comparative study of the prevalence of depressive and anxiety disorders in low-income adults with type 2 diabetes and other chronic illnesses. **Diabetes Care** 26: 2311-2317. 2003.
- UKPDS - UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 352: 854-865. 1998a.
- UKPDS - UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Tight blood pressure control and the risk of macrovascular and microvascular complications in type diabetes: UKPDS 38. **Brazilian Medicine Journal** 317: 703-713. 1998b.
- UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP (UKPDS). Quality of life in type 2 diabetic patients is affected by complications but not by intensive policies to improve blood glucose or blood pressure control (UKPDS 37). **Diabetes Care** 22: 1125-1136. 1999.

- UNÜTZER J; PATRICK D; MARMON T; SIMON GE; KATON WJ. Depressive symptoms and mortality: a prospective study of 2558 older adults. **American Journal Geriatric Psychiatry** 10: 521-530. 2002.
- VAN DER FELTZ-CORNELIS CM; NUYEN J; STOOP C; CHAN J; JACOBSON AM; KATON W; SNOEK F; SARTORIUS N. Effect of interventions for major depressive disorder and significant depressive symptoms in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **General Hosp Psychiatry** 32: 380–395. 2010.
- VOET D; VOET JG; PRATT CW. Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular. In: ciclo do ácido cítrico; transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. 2. Ed. Artmed, Porto Alegre, 514-589. 2008.
- WALLACE DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488. 1999.
- WAYHS CAY; MANFREDINI V; SITTA A; DEON M; RIBAS GS; VANZIN CS; BIANCINI GB; NIN MS; BARROS HMT; VARGAS CR. Effects of insulin and clonazepam on DNA damage in diabetic rats submitted to the forced swimming test. **Mutation Research** 703:187–190. 2010.
- WELLS KB; GOLDING JM; BURNAM MA. Chronic medical conditions in a sample of the general population with anxiety, affective, and substance use disorders. **American Journal of Psychiatry** 146: 1440–1446. 1989.
- WELLS KB; GOLDING JM; BURNAM MA. Affective, substance use and anxiety disorders in persons with arthritis, diabetes, heart disease, high blood pressure, or organic lung conditions. **General Hospital Psychiatry** 11: 320-327. 2009.
- WHO Study Group on Diabetes Mellitus. Second report. Geneva: World Health Organization; 1985 (WHO Technical Report Series, 727)

- WILD S; ROGLIC G; GREEN A; SICREE R; KING H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care** 27: 1047–1053. 2004.
- WINT D. Depression: A shared risk factor for cardiovascular and Alzheimer disease. **Cleve Clinical Journal Medicine** 78: 44-46. 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes care and research in Europe: the Saint Vincent declaration. **Diabetic Medicine** 7: 360-369. 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes Mellitus. **Fact Sheet** 138: 10-16. 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes Programme. Disponível em: <www.who.int/diabetes/facts/world_figures/em>. Acesso em: 10 fev. 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventing chronic diseases: a vital investment. Geneva: WHO, 2005.
- WU AY; KONG NC; DE LEON FA; PAN CY; TAI TY; YEUNG VT; YOO SJ; ROUILLON A; WEIR MR. An alarmingly high prevalence of diabetic nephropathy in Asian Type 2 diabetic patients: the microalbuminuria prevalence (MAP) study. **Diabetologia** 48: 17-26. 2005.
- YEO GS; CONNIE HUNG CC; ROCHFORD J; KEOGH J; GRAY J; SIVARAMAKRISHNAN S; O'RAHILLY S; FAROOQI IS. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. **Nature Neuroscience** 7: 1187–1189. 2004.
- YOREK MA. The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. **Free Radical Research** 37: 471–480. 2003.

YOSHII A; CONSTANTINE-PATON M. Postsynaptic BDNFTrkB signaling in synapse maturation, plasticity and disease. **Developmental Neurobiology** 70: 304-322. 2010.

YOUNG IS; WOODSIDE JV. Antioxidants in health and disease. **Journal Clinical Pathology** 54: 176–186. 2001.

YU H; CHEN ZY. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. **Acta Pharmacologica Sinica** 32: 3–11. 2011.