

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARIA AUGUSTA BERNARDINI DOS SANTOS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTES SOBRE AS
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS
OBSERVADAS EM UM MODELO ANIMAL DE DIABETES**

Tese de Doutorado 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.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alexandra Ioppi Zugno

Coorientador: Prof. Dr. João Quevedo

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gislaíne Zilli Réus

**CRICIÚMA
2015**

53843

T
615.1
S2372
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S237e Santos, Maria Augusta Bernardini.

Efeito do tratamento com antioxidantes sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas observadas em um modelo animal de diabetes / Maria Augusta Bernardini dos Santos ; orientadora : Alexandra Ioppi Zugno ; coorientadora: Gislaine Zilli Réus. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.

94 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2015.

1. Diabetes *mellitus* - Tratamento. 2. N-acetilcisteína – Uso terapêutico. 3. Desferroxamina – Uso terapêutico. 4. Transtorno depressivo maior. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Maria Augusta Bernardini dos Santos** sob o título “Efeito do tratamento com antioxidantes sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por um modelo animal de diabetes”, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido á candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.


Criciúma, SC, 11 de dezembro de 2015.

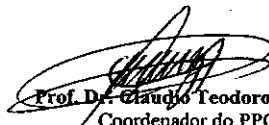

Prof.ª Dr.ª **PATRÍCIA FERNANDA SCHUCK**
Membro Relator - UNESC


Prof. Dr. **ALEXANDRE PASTORIS MÜLLER**
Membro Interno - UNESC


Prof.ª Dr.ª **MANUELLA KASTER**
Membro Externo - UFSC


Prof.ª Dr.ª **KAREN JANSEN**
Membro Externo - UCPEL


Prof.ª Dr.ª **Alexandra Ioppi Zugno**
Orientadora


Prof. Dr. **Claudio Teodoro de Souza**
Coordenador do PPGCS

Aos meus pais, Rosa Maria e Janis, pela educação e apoio na vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Rosa Maria e Janis, por terem me dado sempre muito amor, carinho, persistido na minha educação e acreditado no meu potencial. Hoje, eu realmente consigo entender que o “bem” mais valioso que vocês podem me dar é a educação. Pai, você fez muita falta nesse processo do doutorado, mas agradeço por ter convivido muitos momentos felizes ao seu lado e ter aprendido a ter persistência e força na vida, sem dúvidas você foi um grande pai e companheiro. Mãe, você foi ótima, me ajudou e compreendeu em todos os momentos difíceis que passei nesse processo do doutorado. Obrigada por tudo.

Ao meu namorado Gabriel que me deu sempre muita força, me incentivou a continuar, sempre olhando o lado positivo das situações, me trazendo muita paz e felicidade.

A minha orientadora Alexandra Ioppi Zugno e aos meus coorientadores João Quevedo e Gislaïne Zilli Réus, tenho grande admiração por vocês, agradeço por me aceitarem como orientanda e me oportunizarem importantes aprendizados. Obrigada pela oportunidade e confiança!

As minhas companheiras da equipe do transtorno depressivo, Helena, Zuleide e Amanda, adoro nosso grupo, ver a dedicação de vocês por nosso grupo me deu muita força para continuar em frente com o doutorado. Adorei conhecer cada uma de vocês. Obrigada também aos ICs que nos ajudaram em minha pesquisa. E agradeço novamente a Gislaïne Zilli Réus que é a coordenadora dessa equipe e que sempre nos motivou e apoiou. Muito obrigada pela dedicação!

As minhas amigas “Amandinha”, grande amizade que o laboratório me proporcionou. Claudia, amiga de uma vida inteira. Edna, amiga da faculdade que agora virou sócia e me deu muito apoio na continuação do doutorado. Aos meus parentes (primos, tios, tias, vô e vó) que são muito importantes em minha vida.

Aos integrantes do Laboratório de Neurociências, com quem aprendi bastante e dei boas risadas e também dos Laboratórios de Fisiopatologia Experimental da UNESC e Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental da UNISUL que me auxiliaram nas pesquisas bioquímicas.

A Sandra Barros, coordenadora do curso de psicologia da Faculdade ESUCRI, que mesmo sem eu ter experiência me aceitou como professora me deu a oportunidade de exercer essa profissão que eu tanto amo (professora-psicóloga).

Aos professores do PGGCS pelos ensinamentos e aos órgãos de

fomento (CAPES e UNESCO), pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro necessário a execução dos experimentos que compõem esta tese.

E a Deus, por tudo que eu vivi até aqui.

*“Todos os nossos sonhos poderão ser tornar realidade, se houver a coragem
de querer realizá-los”*

(Walt Disney)

RESUMO

Estudos recentes tem mostrado uma relação do diabetes *mellitus* (DM) com o posterior desenvolvimento do transtorno depressivo maior (TDM), nesse cenário, torna-se importante novas medidas que promovam a prevenção e o controle dessas duas enfermidades. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos antioxidantes N-acetilcisteína (NAC) e desferroxamina (DFO) sobre o comportamento do tipo depressivo e alterações fisiológicas, além de parâmetros de estresse oxidativo e proteínas relacionadas a cascatas de sobrevivência e sinalização intracelular em um modelo animal de DM. Inicialmente, os animais foram divididos em 6 grupos: 1) diabético + salina; 2) diabético + NAC; 3) diabético + DFO; 4) não-diabético + salina; 5) não-diabético + NAC; e 6) não-diabético + DFO e após, sofreram a indução do diabetes por meio da administração de aloxano (150mg/kg I.P.). O tratamento foi realizado com os antioxidantes NAC e DFO durante 14 dias após a indução do diabetes. Nos últimos três dias de experimento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais: campo aberto e nado forçado. Após a última tarefa comportamental, os animais sofreram eutanásia por decapitação e o pâncreas, bem como as estruturas cerebrais: córtex pré-frontal (CPF), hipocampo, amígdala e núcleo accumbens foram retirados para as análises bioquímicas. Observou-se que os ratos diabéticos apresentaram comportamento do tipo depressivo se comparados ao grupo controle, e a administração de NAC reverteu esse comportamento. Adicionalmente, os níveis de proteínas carbonilas foram aumentados em CPF, hipocampo e pâncreas de ratos diabéticos e tanto a NAC quanto a DFO reverteram estas alterações. Danos oxidativo aos lipídeos também foram aumentados em CPF, hipocampo, amígdala e pâncreas de animais diabéticos. No entanto, o tratamento com NAC e DFO reverteu somente danos lipídicos em hipocampo e pâncreas. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) encontrou-se diminuída na amígdala, núcleo accumbens e pâncreas de ratos diabéticos. Além disso, houve uma diminuição da atividade da enzima catalase (CAT) em CPF, amígdala, núcleo accumbens e pâncreas. Por outro lado, houve um aumento dessa atividade em hipocampo de animais diabéticos. O tratamento com os antioxidantes não teve efeito sobre a atividade de SOD e CAT. Foi também avaliado o imunocontéudo das vias da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), proteína cinase dependente de cálcio (PKC), proteínas cinases c-Jun NH2-terminal (JNK), proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) da família p38 (p38MAPK) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), entretanto, os antioxidantes conseguiram reverter somente alterações significativas no imunocontéudo de BDNF e JNK. Houve uma diminuição do imunocontéudo de BDNF em hipocampo do grupo de animais

diabéticos e a administração de DFO reverteu essa diminuição. Por outro lado, o imunoconteúdo de JNK encontrou-se aumentado na amígdala dos animais diabéticos e o tratamento com NAC reverteu esse aumento. Porém, os antioxidantes não conseguiram reverter alterações significativas no imunoconteúdo de PKA, PKC e p38MAPK. Em conjunto, estes resultados sugerem que o tratamento com NAC e DFO possa ser uma estratégia terapêutica para o comportamento do tipo depressivo em ratos com DM.

Palavras-chave: Antioxidantes; diabetes mellitus; estresse oxidativo; sinalização celular; transtorno depressivo maior.

ABSTRACT

Recent studies have shown a relationship between diabetes mellitus (DM) and the development of major depressive disorder (MDD). In this scenario is important new measures to promote the prevention and control of these diseases. This study aimed to evaluate the effects of the antioxidants N-acetylcysteine (NAC) and deferoxamine (DFX) on depressive-like behavior, physiological alterations, oxidative stress parameters and changes in the immune consent of proteins related to survival intracellular signaling cascades in a DM animal model. Initially, the animals were divided into 6 groups: 1) diabetic + saline; 2) diabetic + NAC; 3) diabetic + DFX; 4) non-diabetic + saline; 5) non-diabetic + NAC; 6) non-diabetic + DFX and thereafter, have suffered induction of diabetes by administration of alloxan (150mg/kg I.P.) The treatment was performed with the antioxidants NAC and DFX during 14 days, starting one day after diabetes induction. On the last three days of treatment the animals were subjected to behavioral tests open field and forced swimming tests. After the last behavioral test, animals were killed by decapitation and the pancreas, and the brain structures prefrontal cortex (PFC), hippocampus, amygdala, and nucleus accumbens were withdrawn for biochemical analysis. It was observed that diabetic rats displayed a depressive-like behavior when compared with the control group; and the NAC treatment did reverse this behavior. Additionally protein carbonyl levels were increased in CPF, hippocampus and pancreas of diabetic rats and both NAC and DFO treatments reversed these changes. Oxidative damage to lipids was also increased in PFC, hippocampus, amygdala, and pancreas; however, treatment with NAC or DFX reversed lipid damage only in hippocampus and pancreas. Superoxide dismutase (SOD) enzyme's activity was found decreased in amygdala, nucleus accumbens, and pancreas of diabetic rats. Also there was a decrease in catalase (CAT) enzyme activity in PFC, amygdala, nucleus accumbens, and pancreas, but an increase in the hippocampus. Treatment with antioxidants did not produce an effect on the activity of SOD and CAT. It was also analyzed the immunocontent of cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathways, calcium-dependent protein kinase (PKC), c-Jun N-terminal kinases (JNK), p38 mitogen-activated protein kinases (p38MAPK) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). However the antioxidants managed reversed only significant changes in the immunocontent of BDNF and pathways of JNK. There was a decrease hippocampal BDNF's immunocontent in the diabetic group of animals and the DFO treatment has reversed this effect. However, immunocontent of JNK was increased in the amygdala of diabetic group and the NAC treatment reversed this. Taken together, these results suggest that treatment with NAC

and DFO could be an effective treatment strategy for depressive-like behavior in rats with DM.

Keywords: Antioxidants; cell signaling; diabetes mellitus; major depressive disorder; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia.	39
Figura 2 - Proteínas cinases ativadas por mitógeno.	41
Figura 3 - Desenho experimental do estudo.	48
Figura 4 - Medição dos níveis de glicose.	52
Figura 5 - Medição de peso.	53
Figura 6 - Avaliação da atividade locomotora espontânea.	54
Figura 7 - Avaliação do tempo de imobilidade no teste de nado forçado.	55
Figura 8 - Avaliação de níveis de proteínas carbonilas.	57
Figura 9 - Avaliação de níveis de TBARS.	58
Figura 10 - Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD).	59
Figura 11 - Avaliação da atividade da catalase (CAT).	60
Figura 12 - Níveis do imunocontéudo da proteína JNK.	62
Figura 13 - Níveis do imunocontéudo da proteína p38 MAPK.	63
Figura 14 - Níveis do imunocontéudo da proteína PKA.	64
Figura 15 - Níveis do imunocontéudo da proteína PKC.	65
Figura 16 - Níveis do imunocontéudo de BDNF.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico (do inglês *adrenocorticotropic hormone*)
- AGEs – Produto Finais de Glicação Avançada (do inglês *advanced glycation end-products*)
- AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês *cyclic adenosine monophosphate*)
- AVC – Acidente Vascular Cerebral
- BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)
- BSA – Albumina bovina sérica
- CaMK II - a Cálcio-calmodulina cinase II (do inglês *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*)
- CAT – Catalase
- CPF – Córtex Pré-frontal
- CREB – Proteína de ligação-elemento de resposta do AMPc (do inglês *cAMP response element-binding protein*)
- DAG - Diacilglicerol
- DFO – Desferroxamina
- DM - Diabetes *Mellitus*
- DM1 - Diabetes *Mellitus* tipo 1
- DM2 - Diabetes *Mellitus* tipo 2
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
- ERK - Cinase regulada por sinal extracelular (do inglês *extracellular signal-regulated kinases*)
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- GAPDH - Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase (do inglês *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)
- GLUT1 – Transportadores de Glicose 1 (do inglês *glucose transporter 1*)
- GLUT2 - Transportadores de Glicose 2 (do inglês *glucose transporter 2*)
- HPA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (do inglês *hypothalamic-pituitary-adrenal*)

IFN- α – Interferon- α
IL-1 β – Interleucina-1 beta
IL-6 – Interleucina-6
JNK – Proteínas cinases c-Jun NH2-terminal (do inglês *c-Jun N-terminal kinases*)
MAPK - Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês *mitogen-activated protein kinases*)
MDA - Malondialdeído
NAC – N-acetilcisteína
NAc – Núcleo Accumbens
NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*)
NF κ B – Fator nuclear kappa B (do inglês *nuclear factor kappa B*)
NO – Óxido Nítrico (do inglês *nitric oxide*)
PARP - Poli ADP-Ribose Polimerase (do inglês *poly ADP-ribose polymerase*)
PKA- Proteína cinase dependente do AMPc (do inglês *cAMP-dependent protein kinase*)
PKC - Proteína cinase dependente de cálcio (do inglês *calcium-dependent protein*)
p38MAPK – MAPK da família p38 (do inglês *p38 mitogen-activated protein kinases*)
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP - Sistema Nervoso Periférico
SOD - Superóxido Dismutase
SPSS – Pacote estatístico para a ciência social (do inglês *Statistical Package for the Social Science*)
TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*)
TDM – Transtorno depressivo maior
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α (do inglês *tumoral necrosis factor- α*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
1.1 DIABETES MELLITUS.....	33
1.2 DIABETES E DEPRESSÃO.....	35
1.3 ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS.....	36
1.4 ANTIOXIDANTES.....	43
1.5 MODELO ANIMAL DE DIABETES.....	44
1.6 JUSTIFICATIVA.....	45
2 OBJETIVOS	46
2.1 OBJETIVO GERAL.....	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 ANIMAIS.....	47
3.2 INDUÇÃO DE DIABETES POR ALOXANO.....	47
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL – TRATAMENTO.....	47
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	48
3.4.1 Teste do campo aberto.....	49
3.4.2 Teste do nado forçado.....	49
3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	49
3.5.1 Mensuração da glicemia.....	49
3.5.2 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de roedores.....	50
3.5.2.1 Amostras cerebrais.....	50
3.5.2.2 Medida de dano oxidativo a lipídeos.....	50
3.5.2.3 Medida de dano oxidativo a proteínas.....	50
3.5.2.4 Atividade de SOD e CAT.....	50
3.5.2.5 Dosagem de proteínas.....	51
3.5.3 Quantificação de proteínas por <i>Western blotting</i>	51
3.5.4 Análises estatísticas.....	51
4 RESULTADOS	52
4.1 GLICEMIA.....	52
4.2 PESO.....	52
4.3 TAREFAS COMPORTAMENTAIS.....	53
4.3.1 Teste do campo aberto.....	53
4.3.2 Teste de Nado Forçado.....	54
4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	55
4.5 IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNAS.....	60
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES	75

REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO	93
ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes *mellitus* (DM) é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos, ocasionando a hiperglicemia (American Diabetes Association, 1998). O DM pode ser dividido em dois grandes grupos: o DM tipo 1 (DM1) é resultado da destruição das células-beta pancreáticas, levando à deficiência absoluta de insulina, podendo ser autoimune e corresponde a cerca de 10 % do total de casos de DM. O segundo grupo, DM tipo 2 (DM2), caracteriza-se pela resistência e/ou deficiência a insulina, correspondendo aproximadamente a 90 % dos casos de DM (American Diabetes Association, 2013).

Estima-se que o DM atinja mais de 200 milhões de indivíduos em todo mundo e calcula-se que até 2030, cerca de 552 milhões de indivíduos sejam afetados (Wild et al., 2004). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, somente no Brasil, no ano 2000, aproximadamente 4,5 milhões de pessoas foram diagnosticadas com DM e a estimativa para 2030, é de que 11 milhões de pessoas sejam atingidas por essa enfermidade. Como o DM acarreta uma série de complicações, a mortalidade devido a essa doença também é bastante elevada. De fato, somente em 2011, houve 4,6 milhões de mortes em decorrência do DM (International Diabetes Federation, 2012).

Para a realização do diagnóstico do DM, adota-se critérios a partir das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2009), as quais incluem: a) Excessiva vontade de tomar água (polidipsia), aumento do volume urinário (poliúria) e perda de peso em pouco tempo (perda ponderal) acrescidos de glicemia casual acima de 200 mg/dL (compreende-se por glicemia casual aquela realizada em qualquer hora do dia, independentemente do intervalo entre as refeições); b) glicemia em jejum igual ou superior a 126 mg/dL (em casos de variações, o exame deve ser repetido no dia seguinte); e c) glicemia de 2 horas, pós-sobrecarga de 75 g de glicose (o paciente deve apresentar os níveis de glicose acima de 200 mg/dL).

O DM atualmente é uma das principais causas de incapacitação para o trabalho, devido a diversas comorbidades que estão associadas a esta doença. Dentre as mais comuns estão a retinopatia diabética, aterosclerose que pode levar a um acidente vascular cerebral (AVC) ou a um ataque cardíaco, neuropatia diabética e nefropatia diabética, bem

como é a principal causa de amputações não traumáticas dos membros inferiores (Schaan, 2003; Groop et al., 2005; American Diabetes Association, 2013). Pesquisas mostram que o portador de DM tem de 2-4 vezes mais possibilidades de desenvolver doenças cardíacas ou um AVC (Nathan et al., 2005). Adicionalmente, a hipertensão está presente em até 75 % dos casos, a retinopatia é responsável por 12-24.000 novos casos de perda de visão a cada ano e a nefropatia pode afetar até 40 % dos diabéticos (American Diabetes Association, 1998; Centers for Disease Control and Prevention, 2007).

Evidências epidemiológicas mostram uma associação do DM com um risco aumentado para o desenvolvimento de cânceres, como de fígado, pâncreas e endométrio, devido à hiperglicemia (Chowdhury, 2010). Outras comorbidades associadas ao DM são os transtornos mentais, principalmente a ansiedade e o transtorno depressivo maior (TDM) (Lin et al., 2008; Ceretta et al., 2012a; dos Santos et al., 2014). Em uma revisão sistemática, observou-se que os sintomas elevados de ansiedade estavam presentes em 40 % dos pacientes com DM (Grigsby et al., 2002). Em outro estudo com a mesma metodologia, foi visto que a prevalência da depressão em pacientes diabéticos pode atingir até 60,5 % (Moreira et al., 2003).

No presente estudo, focou-se no DM1, já que o modelo animal será induzido ao diabetes por aloxano e representará as características deste tipo de doença, que resulta da destruição autoimune das células-beta pancreáticas (American Diabetes Association, 2013). Os principais marcadores imunológicos do comprometimento pancreático são os anticorpos anti-ilhota, anti-insulina e anti-glutamato descarboxilase e estão presentes no sangue de 90 % dos pacientes na ocasião do diagnóstico. O DM1 ocorre habitualmente em crianças e adolescentes, mas pode manifestar-se também em adultos, geralmente de forma mais insidiosa (Musselman et al., 2003). Pacientes com esse tipo de diabetes necessariamente dependem da administração de insulina exógena. E uma relação comprovada entre controle inadequado da hiperglicemia e o tempo de evolução do DM1, com a assim chamada doença microvascular, caracterizada por retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética (Fráguas et al., 2009).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de melhorar a qualidade de vida dos pacientes diabéticos, visto que, os agentes terapêuticos têm normalmente baixa eficácia e diversos efeitos colaterais (Arent et al., 2012; Ceretta et al., 2012a; Ceretta et al 2012b). De tal modo, devido à alta prevalência do DM e suas projeções futuras, há necessidade de mais estudos sobre essa doença, em relação aos aspectos

epidemiológicos, fisiopatológicos, de diagnóstico precoce e de tratamento (Cheng, 2005).

1.2 DIABETES E DEPRESSÃO

Vários trabalhos mostram que há uma alta prevalência de transtornos depressivos em pacientes diabéticos (Lin et al., 2008; Ceretta et al., 2012a; Dhavale et al., 2013). Lustman et al. (1997) evidenciaram que a depressão associada ao diabetes tende a ser recorrente ao longo dos anos. Bernard et al. (2006) apontaram uma prevalência de 7.8-12 % do TDM e de sintomas depressivos em pacientes diabéticos. Em uma meta-análise que confirmou uma associação entre diabetes e depressão diretamente, os autores chegaram às seguintes conclusões: 1) o DM duplica o risco de depressão; 2) um em cada três pacientes diabéticos tem depressão; 3) a prevalência de depressão varia sistematicamente em função do instrumento e da amostra utilizada; 4) mulheres diabéticas apresentam maior risco de depressão do que os homens com a mesma condição; e 5) não houve diferença na prevalência de depressão entre o DM tipo 1 e 2 (Anderson et al., 2001).

A depressão está diretamente correlacionada com a baixa adesão ao tratamento, ao controle glicêmico inadequado, maiores complicações decorrentes da doença, redução da qualidade de vida e aumento da mortalidade, bem como há um aumento da atividade adrenérgica, que resulta em aumento do cortisol sanguíneo e conseqüentemente eleva o estresse neste paciente (Egede et al., 2005; Collins et al., 2009; Schram et al., 2009). Indivíduos diabéticos necessitam modificar hábitos alimentares e aderir a esquemas terapêuticos restritivos, tais como aplicações regulares de insulina e monitorização glicêmica diária. Bem como, estes pacientes podem desenvolver sérias complicações decorrentes do DM e todas essas variáveis poderiam repercutir no estado de humor dos pacientes diabéticos (Moreira et al., 2003). Além disso, muitos pacientes não têm o TDM diagnosticado, o que dificulta ainda mais na aderência, pois não recebem tratamento adequado e apresentam mais dificuldades em se envolver em atividades físicas, combater os pensamentos pessimistas e aderir à medicação. Um estudo demonstrou que aproximadamente 45 % dos pacientes diabéticos tiveram depressão sem diagnóstico, o que dificultou inicialmente o tratamento adequado destes indivíduos (Li et al., 2009).

Um estudo longitudinal em que se acompanhou pacientes diabéticos que tinham como comorbidade a depressão mostrou que mais de 40 %

desses pacientes desenvolveram o TDM após um período de dois anos (Bot et al., 2010). Esse mesmo estudo caracterizou a ansiedade nesses pacientes como um fator preditivo para o início do TDM durante os 2 anos seguintes. Outro estudo avaliou os riscos da ansiedade e da depressão e foi visto que o comportamento ansioso não provocou risco para o controle metabólico e auxiliou na aderência ao tratamento, por outro lado, o comportamento depressivo trouxe uma pior adaptação psicológica do paciente frente à doença, como também piorou o controle metabólico desses pacientes. Esses resultados reforçam o quanto de prejuízo significativo os pacientes diabéticos depressivos tem na associação dessas duas comorbidades (Gois et al., 2004).

Em uma meta-análise, Kan et al. (2013) descreveram que a depressão pode estar presente em uma fase pré-diabética, pois indivíduos apenas com resistência a insulina e sem diabetes apresentaram sintomas depressivos. Pode-se perceber neste fato que a insulina é um fator importante para o desencadeamento dos sintomas depressivos. Nesse contexto, outro estudo mostrou que ratas induzidas ao diabetes por estreptozocina apresentaram níveis de triptofano e serotonina diminuídos no cérebro e quando tratadas com insulina esses níveis foram regularizados (Manjarrez-Gutierrez et al., 2000). Em outro trabalho, foi observado que ratas induzidas ao diabetes tiveram níveis do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona elevados e o tratamento com insulina reverteu esse quadro (Chan et al., 2001). Estes dados revelam o papel crucial da insulina no sistema nervoso central (SNC).

Publicações atuais apontam também uma prevalência de diabetes entre indivíduos com esquizofrenia e transtornos afetivos. Há também uma relação de resistência a insulina, diabetes e síndromes metabólicas com psicoses e transtornos afetivos (Regenold et al., 2002; Bauer et al., 2011). O diagnóstico e o tratamento do TDM em pacientes diabéticos tornam-se imprescindíveis para a melhora da qualidade de vida, visto que a depressão está associada ao aumento da glicemia e o tratamento desse transtorno poderia levar a um aumento no número de pacientes com controle glicêmico adequado (Lustman et al., 2000).

1.3 ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS

Sabe-se que a hipoinsulinemia e a hiperglicemia causam efeitos deletérios ao SNC, provocando estresse oxidativo, modificação na expressão de proteínas entre muitas outras alterações bioquímicas. Tais modificações podem desencadear diversas comorbidades em pacientes

diabéticos, incluindo o TDM (Ross, 1999; Mangariños et al., 2000; Jung et al., 2010; Ceretta et al., 2012b).

Enquanto outros órgãos do corpo são capazes de utilizar outros substratos energéticos, o cérebro utiliza primordialmente a glicose. Por essa razão, a barreira hematoencefálica é rica em transportadores de glicose 1 (GLUT1), e mais de 99 % da glicose captada são utilizadas pelos neurônios e por células da glia. Assim, a eficácia e contínuas demandas metabólicas do cérebro tornam-se excepcionalmente susceptíveis a flutuações na concentração de glicose do nosso corpo (Whitmer, 2007).

O cérebro apresenta níveis relativamente baixos de defesas antioxidantes e alto teor lipídico, principalmente de ácidos graxos insaturados e catecolaminas, que são altamente suscetíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio (ERO) (da Silva Haeser et al., 2007). Considerando-se que a hiperglicemia induz um aumento na produção de ERO em cérebro, fígado, pâncreas e células endoteliais da aorta, entre outros (Rocha et al., 2006). Com isso, a hiperglicemia constante no indivíduo diabético pode colaborar para a indução de estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante endógena (Yoshihiro, 2003), resultando em danos a biomoléculas, incluindo ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e lipídeos. Pesquisas mostram um aumento da carbonilação de proteínas em tecidos renais e da peroxidação lipídica em fígado, plasma e hipocampo de ratos submetidos a modelos experimentais de DM (Szkudelski, 2001; Wayhs et al., 2010; Chang et al., 2011). O estresse oxidativo pode causar prejuízos irreversíveis às células, podendo induzir morte celular (Halliwell e Gutteridge, 1999). Seu papel como determinante principal do início e da progressão das complicações associadas ao DM tem sido alvo de grande interesse (Rocha et al., 2006; Ceretta et al., 2012a; Shaw et al., 2014). Mecanismos bioquímicos têm sido propostos para explicar as anormalidades estruturais e funcionais associadas com a exposição prolongada dos tecidos à hiperglicemia com indícios de que a capacidade antioxidante endógena esteja prejudicada nos indivíduos diabéticos, dificultando a remoção dos radicais livres (Santini et al., 1997).

Existem estratégias celulares de defesa contra as ERO que incluem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Estas são encarregadas de metabolizar ou neutralizar as ERO (Lesuy, 2002), assim como reparar os danos oxidativos em tecidos. As defesas enzimáticas incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Amer et al.,

2011). Estudos demonstraram um aumento da atividade da CAT e da SOD em fígado de animais diabéticos (Beauquis et al., 2010). Além disso, a superexpressão dessas duas enzimas exerceu um efeito protetor em órgãos de animais com neuropatia diabética (Forbes et al., 2008). Outro estudo mostrou um aumento da atividade da CAT também em hipocampo de animais induzidos ao diabetes e com comportamento do tipo depressivo (Ceretta et al., 2012b).

Estudos demonstraram que a hiperglicemia tem como consequência uma elevada produção de ânion superóxido por meio de diferentes mecanismos (Ceriello, 2006; da Silva Haeser et al., 2007; Ceretta et al., 2012b). Contudo alterações na cadeia de transporte de elétrons parecem ser o primeiro evento chave na ativação de outras vias envolvidas nas complicações do DM por ocasionar o aumento da atividade da enzima aldose redutase, da ativação da proteína cinase C (PKC), da formação de produtos avançados da glicosilação não-enzimática (AGEs) e da atividade da via das hexosaminas, o que tem como consequência unificada o mecanismo de lesão celular (Reis et al., 2008).

Na via dos polióis, em que a glicose é convertida a sorbitol, que é posteriormente oxidado a frutose, o aumento de ERO em decorrência da hiperglicemia reduz os níveis de óxido nítrico (NO) ativando a aldose redutase que é responsável pela conversão de glicose a sorbitol, reduzindo fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e glutatona. O sorbitol é convertido a frutose, aumentando a relação dinucleotídico de nicotinamida e adenina (NADH:NAD⁺), o que aumentaria a síntese de diacilglicerol (DAG), principal ativador fisiológico da PKC, induzindo as comorbidades associadas à hiperglicemia (Darley-USmar et al., 1995; Schaan, 2003).

Um dos principais mecanismos patogênicos responsáveis pelos danos celulares e teciduais relacionados ao estresse oxidativo no DM envolve a formação de AGEs, os quais são lipídeos ou proteínas que se tomam glicosados após a exposição a açúcares oxidados e que atuam modificando proteínas intracelulares relacionadas com a regulação gênica, interferindo na sinalização celular e ainda estimulando a produção de citocinas inflamatórias (Barbosa et al., 2009). A produção aumentada de ERO em decorrência da hiperglicemia parece ser o mecanismo comum em todas as células lesadas, sendo essa hipótese capaz de unificar todas as vias. Assim, a hiperglicemia ocasiona o aumento da atividade da poli ADP-ribose polimerase (PARP), enzima envolvida no reparo de danos ao DNA, e conseqüentemente, a diminuição da atividade do gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), responsável pela

metabolização final da glicose, ativando as vias dos polióis, AGEs, PKC, NFκB e hexosaminas (Brownlee, 2005) (Figura1).

A formação de ERO e a diminuição de defesas antioxidantes provocadas pela hiperglicemia trazem prejuízos ao SNC. Em modelos animais de diabetes, foram descritas alterações como o aumento da reatividade de astrócitos hipocámpais, plasticidade sináptica deficiente, alterações vasculares, diminuição da complexidade dendrítica, neurotransmissão prejudicada e perda de memória (Magariños et al., 2000; Jung et al., 2010). Todos esses danos estão correlacionados também ao TDM, o que enfatiza a relação entre a hiperglicemia e o posterior desenvolvimento da depressão (Darley-Usmar et al., 1995; Magariños et al., 2000; Schaan, 2003; Brownlee, 2005; Jung et al., 2010).

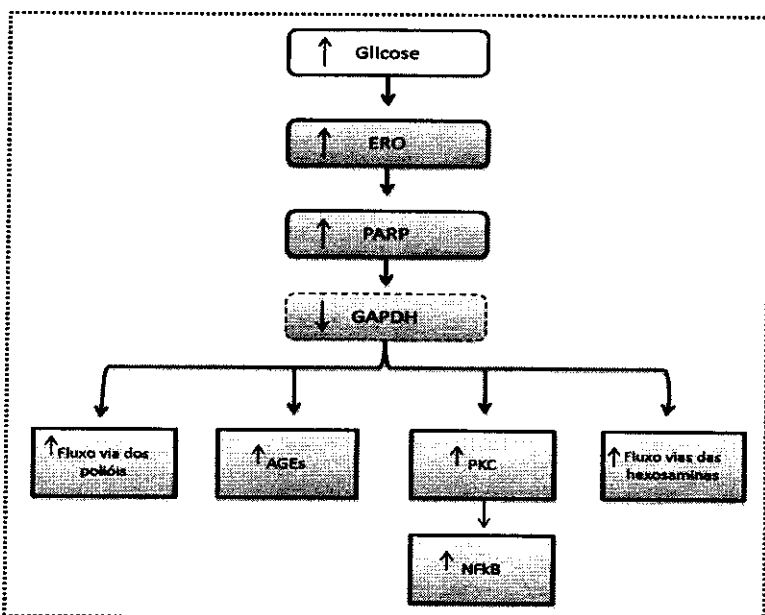


Figura 1 - Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia.

ERO= espécies reativas de oxigênio; PARP= poli-ADP-ribose polimerase; GAPDH= gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; AGEs= produtos avançados da glicosilação não-enzimática; PKC= proteína cinase C; NFκB = fator nuclear Kb.

Fonte: adaptada de Reis et al. (2008).

Em função da hiperglicemia e consequentemente do estresse oxidativo no diabético, podem ser desencadeados processos inflamatórios que podem induzir sintomas depressivos e também provocará alterações em vias de sinalização como a JNK, PKA, PKC, p38MAPK e BDNF. A inflamação e a associação de citocinas pró-inflamatórias causadas pela hiperglicemia podem aumentar os riscos para o desenvolvimento do TDM (Ross, 1999). Pois, as citocinas pró-inflamatórias exercem efeitos fisiológicos quando exacerbadas, tais como a interleucina-1 (IL-1), IL-6 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que são geradas em função da hiperglicemia e induzem comportamentos de fadiga, anorexia, diminuição da atividade psicomotora, alterações cognitivas e diminuição da higiene pessoal (Lasselin e Capuron, 2014), todos sintomas são característicos do TDM (American Psychiatric Association, 2014).

Todas essas alterações atingirão principalmente a via de sinalização da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), que está diretamente envolvida nas duas comorbidades estudadas (Saltiel e Kahn, 2001; Taylor et al., 2005). Os elementos centrais nessa via são uma família de proteína-serina/treonina cinases chamadas MAPK, que são ativadas em resposta a uma variedade de fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadoras (Taxman et al., 2011). As formas melhor caracterizadas de MAPK pertencem à família ERK (cinase regulada por sinal extracelular). A atuação da ERK desempenha um papel central na sinalização da proliferação e diferenciação celular induzida por fatores de crescimento (Taxman et al., 2011). Além dos membros da família ERK, há as cinases JNK (proteínas cinases c-Jun NH2-terminal) e p38MAPK (proteínas cinases p38MAPK), que são preferencialmente ativadas em resposta a citocinas inflamatórias e estresse celular. Diferentemente da via ERK, essas vias levam a inflamação e morte celular (figura 2) (Taxman et al., 2011). Um estudo avaliando o estresse agudo mostrou que houve ativação das vias JNK e ERK em estriado, hipocampo, amígdala e CPF de ratos após serem submetidos a 15 minutos do teste nado forçado. Além disso, a via p38MAPK, quando avaliada, mostrou uma pequena ativação somente em hipocampo, estrutura essa, que está mais relacionada com os sintomas depressivos (Shen et al., 2004).

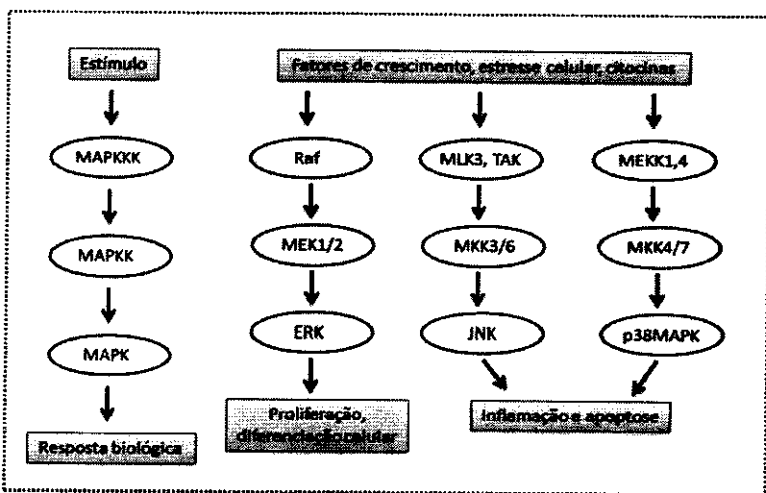


Figura 2 - Proteínas cinases ativadas por mitógeno.

(MAPKs) implicadas na proliferação, diferenciação celular, inflamação e apoptose.

Fonte: adaptada de Steckert (2014).

A glicose exerce o importante papel de ativar a entrada de cálcio no espaço intracelular, que consecutivamente ativa várias proteínas cinases em células β pancreáticas, incluindo a proteína cinase A (PKA), a Cálcio-Calmodulina cinase II (CaMKII), a PKC e a ERK 1/2 (Wenham et al., 1994; Briaud et al., 2003). A glicose, em situações de homeostase, auxilia nessa mesma mediação também no SNC, exercendo um papel parecido com os antidepressivos quando agem nessas vias (Taylor et al., 2005). Essas proteínas cinases fosforilam a proteína de ligação-elemento de resposta do AMPc (CREB), a qual, aumenta a expressão de genes como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que regula a diferenciação neuronal tanto no SNC como na periferia, além de plasticidade sináptica e apoptose (Reichardt, 2006; Yoshii, 2010). Estudos encontraram níveis de BDNF diminuídos em hipocampo de animais com resistência a insulina, bem como redução de níveis séricos de BDNF em humanos com diabetes (Fujinami et al., 2008; Gómez-Pinilla, 2008). Também foi observado ainda, redução dos níveis desse fator neurotrófico no plasma, soro e em cérebro em estudos com animais e em humanos com depressão (De Foubert et al., 2004; Karege et al., 2008; Kozisek et al., 2008) mostrando assim que a resistência à insulina

e a hiperglicemia podem contribuir para o aparecimento de sintomas depressivos.

A PKA está funcionalmente envolvida na fisiologia do cérebro, na síntese e liberação de neurotransmissores, expressão de genes, atividade de canais iônicos, plasticidade sináptica, memória, diferenciação e sobrevivência celular (Duman, 2002; Gould e Manji, 2002). Além disso, auxilia no transporte de glicose para dentro das células e mostrou-se necessária para sobrevivência das células β (Costes et al., 2006). Foi visto que o aumento da atividade da PKA diminuiu a resistência à insulina em DM2 (Kaijara et al., 2014). Em um estudo com cérebros *post-mortem* pacientes depressivos vítimas de suicídio apresentaram uma diminuição da atividade da PKA no CPF (Dwivedi et al., 2002).

A PKC é uma proteína cinase serina-treonina ativada principalmente por DAG em função da hiperglicemia. Sabe-se que metabólitos secundários da glicose, como AGEs e oxidantes, podem também ativar a via referida (Schaan, 2003). Sugere-se que esta ativação possa ser o mecanismo comum pelo qual múltiplos coprodutos da glicose exercem seus efeitos colaterais, já que a via DAG-PKC está envolvida na transdução de sinais, regulação da permeabilidade vascular, proliferação celular, angiogênese, ação de citocinas, entre outras alterações descritas no DM (Reis et al., 2008). Por outro lado, no TDM, a atividade da PKC mostra-se controversa. Uma pesquisa mostrou um aumento da atividade da PKC em plaquetas de pacientes deprimidos (Pandey et al., 1998) e que a administração crônica de antidepressivos diminuiu a atividade da PKC em córtex cerebral e hipocampo de ratos com comportamento do tipo depressivo (Mann et al., 1995; Chen et al., 1999). Em outra pesquisa, foram verificadas alterações na expressão da PKC em plaquetas de pacientes bipolares, mas não de unipolares (Pandey et al., 2002). Entretanto, estudos constataram uma diminuição da PKC em cérebros de pacientes depressivos vítimas de suicídio, sugerindo que essa proteína esteja associada à fisiopatologia de comportamentos suicidas (Pandey et al., 2003; 2004).

O DM1 tem grandes fatores biológicos que interferem na qualidade de vida dos pacientes. O estresse oxidativo, a inflamação, alterações na expressão de proteínas e a apoptose, levam à progressão de doenças associadas ao diabetes, bem como podem levar ao desenvolvimento do TDM. Portanto, medidas que previnam o avanço dos complicadores supracitados podem representar uma importante estratégia para prevenção e controle do TDM em pacientes com DM1.

1.4 ANTIOXIDANTES

Fatores que atenuem o estresse oxidativo ou cascatas que levam a inflamação podem ser alvos muito promissores para o tratamento de doenças ligadas a estas condições como obesidade, DM, transtornos depressivos em geral e doenças cardiovasculares. Diversos estudos avaliam a eficácia de agentes anti-inflamatórios, bem como antioxidantes nessas doenças (Francés et al., 2010; Garcia-Bailo et al., 2011). Por isso, utilizou-se, neste estudo dois antioxidantes, a desferroxamina (DFO) e a N-acetilcisteína (NAC).

O antioxidante DFO promove a excreção de ferro e alumínio através da urina e das fezes, reduzindo assim os depósitos patológicos de ferro e/ou de alumínio nos órgãos (Mesilato de desferroxamina, 2015). Saiba-se que o excesso de ferro pode acumular nas células- β pancreáticas e provocar a resistência à insulina (Cançado, 2007). O principal mecanismo de toxicidade do ferro está relacionado com sua forma de ferro livre. Este atua como catalisador de reações oxidativas e consequente síntese de radicais superóxidos e radicais hidroxilas. A conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio pela SOD causa peroxidação de lipídeos da membrana de diversas organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias e microsossomos com consequente dano celular, fibrose reativa, esclerose, problemas cardíacos e hepáticos, sendo que os dois últimos também estão presentes no DM (Esposito et al., 2003; Pootrakul et al., 2004). Um estudo mostrou que a DFO atenuou a produção de radical hidroxila e preveniu apoptose devido à redução da proteína apoptótica Bax e dos níveis de citocromo c. O tratamento com insulina ou DFO preveniu a produção de ERO pelo diabetes (Francés et al., 2011).

Estudos anteriores mostraram que o aumento nos níveis de ferro no SNC em ratos está associado ao estresse oxidativo (Dal-Pizzol et al., 2001; Jiang et al., 2006) levando à degeneração e morte de neurônios dopaminérgicos, o que pode ser revertido por aplicações de DFO (Jiang et al., 2006). Foi visto também, que a DFO diminui consideravelmente a peroxidação lipídica e a disfunção mitocondrial em cérebros de ratos (Park et al., 2006).

O antioxidante NAC tem como mecanismo de ação proteger a célula contra a degeneração, já que é um precursor da glutathione (antioxidante endógeno que protege as células contra o estresse oxidativo) (De Flora et al., 1991). O uso da NAC repõe as reservas de glutathione no fígado e nos rins, o que auxilia diretamente no tratamento das comorbidades relacionadas ao diabetes, já que esses órgãos sofrem danos pela ação de

ERO no decorrer dessa doença (Abul-Ezz et al., 1991). Tem sido sugerido também que pela sua ação antioxidante a NAC conduz a prevenção da resposta inflamatória iniciada pelo dano oxidativo (Maes et al., 2011). Gibson et al. (2011) mostraram que a NAC reduziu a trombose em pacientes diabéticos, sugerindo, que tais efeitos ocorram devido a um aumento da capacidade antioxidante em plaquetas, como resultado dos níveis elevados de glutathione. Foi visto também que a ação combinada de NAC e DFO produziu um aumento das atividades antioxidantes em CPF, amígdala e hipocampo de ratos submetidos ao modelo de estresse crônico moderado (Arent et al., 2012).

1.5 MODELO ANIMAL DE DIABETES

Dentre os diferentes modelos experimentais de diabetes encontra-se a aplicação de aloxano cuja injeção intravenosa destrói seletivamente as células β -pancreáticas, que, por sua vez, são 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 (Szkudelski, 2001). No período de 4 a 8 horas, ocorre grande aumento da insulinemia, como consequência de ruptura da membrana celular. 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; Szkudelski, 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 e essencial para o desenvolvimento de terapias eficazes (Lenzen, 2008).

Outros estudos relataram com sucesso a utilização de aloxano para a indução do DM. Ceretta et al. (2012b) induziram o DM em ratos e observaram que os animais com DM apresentaram estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Lerco et al. (2003) também induziram o DM em 25 ratos e observaram a evolução clínica e bioquímica desses animais por até 12 meses e perceberam que o aloxano produz, no rato, alterações clínicas e laboratoriais características de DM grave, as quais possibilitam estudos a longo prazo do DM.

No presente trabalho o aloxano foi administrado por via intraperitoneal, seguindo o que relata a literatura existente (Szkudelki, 2001) 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 200 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.

1.6 JUSTIFICATIVA

A hiperglicemia pode gerar estresse oxidativo, levando a inflamação celular que conseqüentemente acarreta danos as vias de sinalização intracelular e também diminuição de BDNF no SNC e na periferia. Bem como, todas essas alterações podem levar os pacientes com DM a desenvolver o TDM e, além disso, diversas outras fisiopatologias. Sendo assim, o presente estudo investigou os efeitos do tratamento com antioxidantes (NAC e DFO) sobre o comportamento, estresse oxidativo e cascatas de sinalização celular em ratos submetidos a um modelo animal de diabetes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento com antioxidantes sobre o comportamento, parâmetros de estresse oxidativo e cascatas de sinalização celular em estruturas cerebrais de ratos submetidos a um modelo animal de diabetes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar o tempo de imobilidade através do teste do nado forçado em ratos Wistar submetidos ao modelo de diabetes induzido por aloxano e tratados com NAC e DFO;

b) Avaliar a atividade motora e exploratória através do teste do campo aberto em ratos Wistar submetidos ao modelo de diabetes induzido por aloxano e tratados com NAC e DFO;

c) Avaliar o imunconteúdo de BDNF, JNK, p38MAPK, PKA e PKC, em tecido cerebral (amígdala, CPF, núcleo accumbens e hipocampo) em ratos Wistar submetidos ao modelo de diabetes induzido por aloxano e tratados com NAC e DFO;

d) Avaliar os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), carbonilação de proteínas e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em tecido cerebral (amígdala, CPF, núcleo accumbens e hipocampo) e no pâncreas de ratos Wistar submetidos ao modelo de diabetes induzido por aloxano e tratados com NAC e DFO.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (Protocolo 81/2012) (anexo A). Todos os cuidados foram adotados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos, além de minimizar o número de animais.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 110 ratos Wistar machos adultos pesando entre 250 e 350 g, considerando-se uma mortalidade de 20 % dos animais devido ao diabetes (comportamento n=15; estresse oxidativo n=5 e *western blotting* n=4). Os animais foram acondicionados em 5 por caixa, com ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00), a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$ e comida e água *ad libitum*, exceto no dia em que os animais ficaram em jejum de 18 h antes da administração de aloxano, para melhor absorção do medicamento conforme determina o protocolo para indução de DM1 em animais.

3.2 INDUÇÃO DE DIABETES POR ALOXANO

O DM foi induzido nos animais por uma única injeção (150 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) de aloxano diluído em solução salina (0,9 % NaCl) e o grupo controle recebeu solução salina nas mesmas condições. Ambos os grupos experimentais receberam injeção de aloxano ou salina após um jejum de 18 h. O conteúdo de glicose no sangue foi quantificado por kit comercial 48 h após a indução e também no penúltimo dia do experimento.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL – TRATAMENTO

No primeiro momento, os animais foram pesados e este procedimento se repetiu no 7º e 15º dia do experimento e um dia após a indução de diabetes, os animais diabéticos (aloxano) e os não-diabéticos (salina) foram divididos em seis novos grupos experimentais: 1) diabético + salina; 2) diabético + NAC (20 mg/kg); 3) diabético + DFO (20 mg/kg); 4) não-diabético + salina; 5) não-diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) não-

diabético + DFO (20 mg/kg) e seus níveis de glicose foram avaliados 48 h depois após a injeção de aloxano. A NAC foi administrado subcutaneamente 3 vezes ao dia (às 8 horas, às 13 horas e às 18 horas) e a DFO foi administrado subcutaneamente 1 vez a cada 3 dias (às 13 h) e, nos 2 dias de intervalo entre as administrações desse fármaco, foi aplicada injeção de salina no mesmo horário. No 14º e 16º dia do estudo, os mesmos animais foram submetidos aos testes comportamentais (campo aberto e nado forçado). No 15º dia do experimento, foi novamente realizada a mensuração da glicemia de todos os animais, como ocorreu no 3º dia do estudo. Logo depois do último comportamento, no 16º dia de experimento, houve a eutanásia por decapitação e o pâncreas, bem como as estruturas cerebrais amígdala, CPF, hipocampo e núcleo Accumbens que estão envolvidas no TDM foram retiradas para posteriores análises bioquímicas (figura 2).

- 1) Diabético + Salina (i.p.)
- 2) Diabético + NAC (20mg/kg; SC)
- 3) Diabético + DFO (20mg/kg; SC)
- 4) Não diabético + Salina (i.p.)
- 5) Não diabético + NAC (20mg/kg; SC)
- 6) Não diabético + DFO (20mg/kg; SC)

15 animais por grupo para comportamento

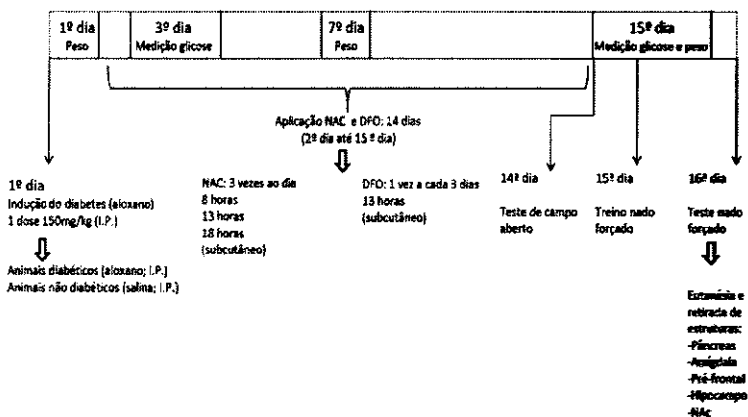


Figura 3 - Desenho experimental do estudo.

Fonte: elaborado pela autora.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Teste do campo aberto

A atividade locomotora foi medida usando a tarefa de habituação ao campo aberto, executada em uma caixa de 40 x 60 cm, cercada por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira compensada, com uma parede de vidro frontal e assoalho dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais ($n = 15$ por grupo) foram colocados delicadamente no quadrante posterior esquerdo, para que explorassem a arena por 5 minutos, onde foram contados os cruzamentos entre as linhas pretas (*crossings*) e a quantidade de vezes em que o rato ficou apoiado nas patas traseiras a fim de explorar o ambiente (*rearings*). O teste do campo aberto foi realizado no 13º dia após o período inicial da aplicação de NAC e DFO e no 14º dia após a indução do diabetes. Este teste foi aferido com o objetivo de avaliar a atividade locomotora espontânea do animal para serem evitados resultados falso-positivos no teste do nado forçado.

3.4.2 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado é muito utilizado para investigar novos fármacos antidepressivos, mas também, avaliar comportamentos do tipo depressivo, como por exemplo: foi demonstrado que ratos diabéticos ou que passaram por protocolo de estresse crônico aumentaram o tempo de imobilidade nesse teste, sugerindo um comportamento tipo depressivo (Ceretta et al., 2012c; Della et al., 2012).

Este teste consiste em dois dias de procedimentos no qual cada rato é posto em um cilindro com água a 23º C, a água deve ser suficiente para o animal não conseguir apoiar as patas no fundo. No 15º dia após a indução do diabetes, os ratos ($n = 15$ por grupo) foram forçados a nadar 15 minutos e no 16º dia (24 horas após o teste) cada animal foi novamente forçado a nadar durante 5 minutos. Foram avaliados os parâmetros de imobilidade, nos quais incluem-se imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar (Porsolt et al., 1977).

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.5.1 Mensuração da glicemia

Os níveis de glicose total no sangue dos animais foram mensurados por meio de kit comercial no 3º e no 15º dia de experimento. Para

realizar esse procedimento, foi necessário furar uma vez a extremidade da cauda do rato com uma agulha (13 x 0,45 mm) e colocar o sangue na fita medidora de glicose. Para constatação de diabetes, os níveis séricos de glicose deveriam ser superiores ou igual a 200 mg/kg (Lerco et al., 2003; *International Diabetes Federation*, 2012).

3.5.2 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de roedores

3.5.2.1 Amostras cerebrais

Após o término das tarefas comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação, o cérebro foi dissecado em CPF, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens. Logo após, a retirada das estruturas cerebrais, o pâncreas também foi removido. As amostras foram rapidamente armazenadas a -80 °C até serem analisadas (n=5).

3.5.2.2 Medida de dano oxidativo a lipídeos

Como indicio de peroxidação lipídica foi medido os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação ácida aquecida, conforme previamente descrito por Draper e Hadley (1990). As amostras obtidas foram misturadas com ácido tricloroacético 10 % e ácido tiobarbitúrico 0,6 %, fervidas por 30 minutos e após, a quantidade de TBARS foi determinada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 532 nm.

3.5.2.3 Medida de dano oxidativo a proteínas

O dano oxidativo em proteínas foi determinado pelo conteúdo de grupos carbonila, conforme previamente descrito por Levine et al. (1990). As amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina (DNPH). Os grupos carbonila foram quantificados em espectrofotômetro em comprimento de onda de 370 nm.

3.5.2.4 Atividade de SOD e CAT

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina e mensurada por espectrofotômetro, conforme descrito por Bannister e Calabrese (1987).

A atividade da CAT foi determinada, por meio do espectrofotômetro, pela análise da taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm (Aebi, 1984).

3.5.2.5 Dosagem de proteínas

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry et al. (1951) e a albumina bovina sérica (BSA) foi utilizada como padrão.

3.5.3 Quantificação de proteínas por *Western blotting*

Foram analisados em amostras de CPF, hipocampo, amígdala e o núcleo accumbens o imunoconteúdo das proteínas BDNF, JNK, p38MAPK, PKA e PKC. Para tal análise, as proteínas foram isoladas através de eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose (Leal et al., 2002). As proteínas de interesse foram identificadas através do uso de anticorpos específicos anti-BDNF, JNK, p38MAPK, PKA e PKC e quantificadas por densitometria das bandas (Leal et al., 2002, 2006). A revelação dos *blottings* foi realizada através de ECL (anticorpo secundário ligado à peroxidase) e pela coloração usando NBT/BCIP (anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina).

As densidades ópticas (DOs) das bandas foram quantificadas utilizando-se o programa Image Lab®. Os níveis de imunoconteúdos de BDNF, JNK, p38MAPK, PKA e PKC foram determinados pela razão da DO das bandas totais (n=4).

3.5.4 Análises estatísticas

Para os testes comportamentais, bioquímicos, medidas de peso e de glicose a diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando os valores de F foram significativos, comparações *post hoc* foram feitas pelo teste de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 GLICEMIA

A glicose foi mensurada no 3º e 15º dia de experimento, por meio de um kit comercial específico. O resultado demonstrou hiperglicemia nos animais (400-600 mg/dL) que receberam administração de aloxano em relação ao controle ($p < 0,05$).

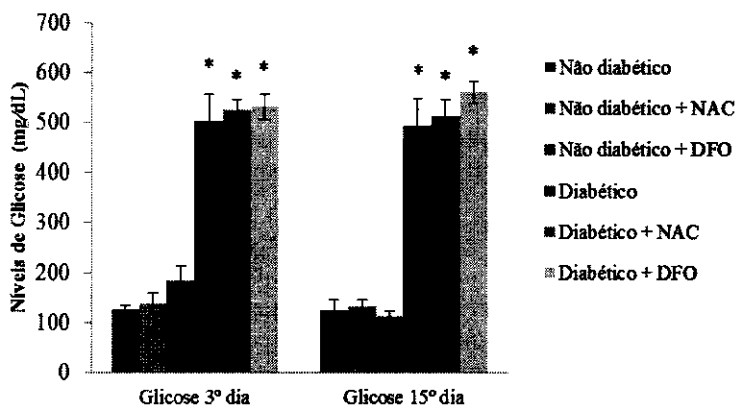


Figura 4 - Medição dos níveis de glicose.

No 3º e no 15º dia de experimento nos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média ± erro padrão da média ($n = 15$). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

4.2 PESO

A figura 5 apresenta o peso dos animais que foi medido no 1º dia antes da injeção de aloxano e no 7º e 15º dia de experimento. Observou-se que no dia da aplicação do aloxano todos os animais, independentemente de grupos, tinham pesos semelhantes. A partir da segunda medição, notou-se uma significativa diminuição de peso nos grupos que receberam aloxano e desenvolveram hiperglicemia em relação ao controle ($p < 0,05$).

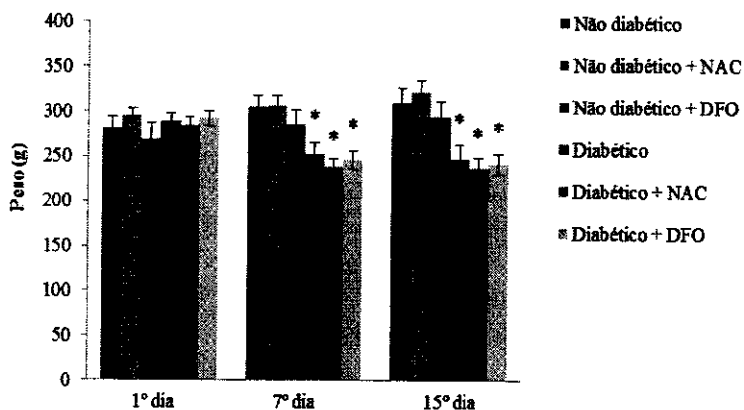


Figura 5 - Medição de peso.

No 1º, 7º e 15º dia do experimento, dos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 15). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

4.3 TAREFAS COMPORTAMENTAIS

4.3.1 Teste do campo aberto

A Figura 6 representa a atividade locomotora espontânea no teste de campo aberto. E como observa-se a única alteração significativa foi uma diminuição do cruzamento dos animais do grupo (diabéticos + DFO) em relação com o controle ($p < 0,05$).

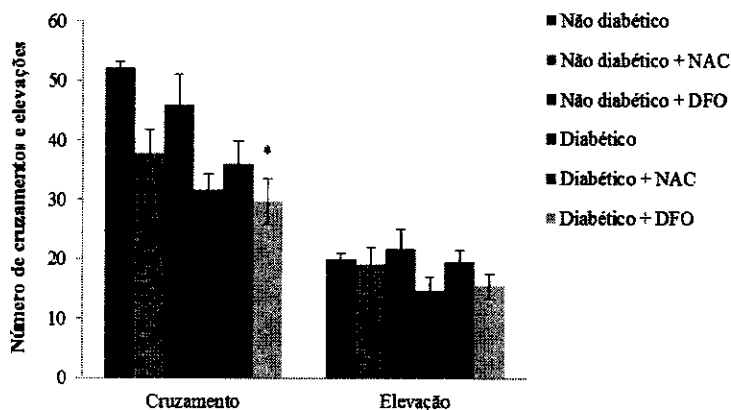


Figura 6 - Avaliação da atividade locomotora espontânea.

Grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média+erro padrão da média (n = 15). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

4.3.2 Teste de Nado Forçado

A Figura 7 representa o tempo de imobilidade do teste de nado forçado. E como observa-se, houve alterações significativas em relação aos grupos diabéticos e diabéticos + DFO em comparação com o controle ($p < 0,05$), aumentando portanto o tempo de imobilidade desses grupos. Também houve alterações significativas em relação aos grupos não-diabético + NAC, não diabético + DFO e diabético + NAC, diminuindo o tempo de imobilidade em relação ao grupo diabético ($p < 0,001$).

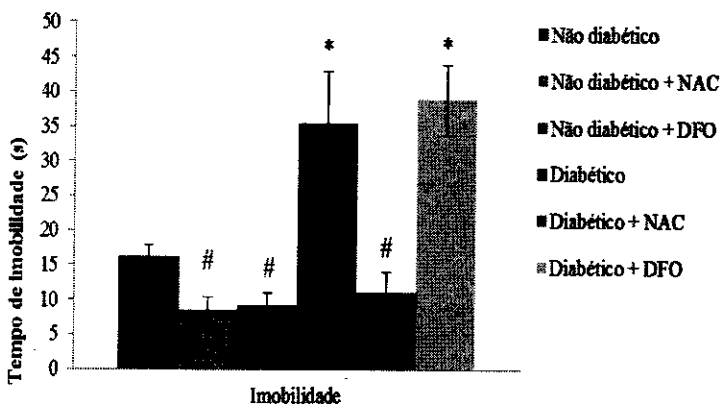


Figura 7 - Avaliação do tempo de imobilidade no teste de nado forçado.

Grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 15). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos e # $p < 0,05$ versus ratos diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Efeitos do modelo animal de diabetes e o tratamento com os antioxidantes NAC, DFO ou soro fisiológico sobre o estresse oxidativo no tecido cerebral e no pâncreas de ratos adultos. Na figura 8, estão representados os níveis da proteína carbonilada, que foram aumentados no CPF de ratos diabéticos em comparação com ratos não diabéticos. O tratamento com NAC em ratos diabéticos e não diabéticos diminuiu os níveis desse parâmetro em CPF em comparação com ratos diabéticos, já o tratamento com DFO diminuiu os níveis de proteína carbonilada apenas no CPF de ratos diabéticos ($p < 0,05$). Os níveis de proteína carbonilada em hipocampo foram elevadas em ratos diabéticos, bem como, o tratamento com NAC e DFO reverteu os danos da oxidação de proteínas carboniladas em hipocampo ($p < 0,05$). No núcleo accumbens, o tratamento com DFO em ratos diabéticos reduziu os níveis de proteína carbonilada, em comparação com ratos diabéticos tratados com solução salina ($p < 0,05$). Na amígdala, não foram encontradas alterações em

qualquer um dos grupos ($p < 0,05$). No pâncreas, foi observado um aumento nos níveis de proteína carbonilada em ratos diabéticos, em comparação com ratos não diabéticos. Porém o tratamento com NAC e DFO provocou diminuição dos níveis de proteína carbonila em ambos os grupos ($p < 0,05$).

Na figura 9, os níveis de TBARS foram aumentados no CPF de ratos diabéticos em comparação com ratos não diabéticos, e o tratamento com NAC reduziu os níveis de TBARS da CPF de ratos não diabéticos, comparativamente com os ratos diabéticos ($p < 0,05$). No hipocampo de ratos diabéticos, houve um aumento nos níveis de TBARS, mas o tratamento com NAC e DFO foi capaz de reverter esta alteração ($p < 0,05$). A amígdala dos ratos diabéticos também apresentou um aumento nos níveis de TBARS, porém, o tratamento com NAC e DFO reduziu os níveis de TBARS apenas em ratos não diabéticos ($p < 0,05$). Não houve alteração nos níveis de TBARS no núcleo accumbens ($p < 0,05$). E no pâncreas, os níveis de TBARS foram aumentados nos ratos diabéticos, comparativamente com os ratos não diabéticos e o tratamento com NAC e DFO reverteu essa alteração em ratos diabéticos e reduziu também os níveis de TBARS em ratos não diabéticos ($p < 0,05$).

Na figura 10 mostra a atividade da SÓD. Essa enzima foi diminuída no CPF de ratos diabéticos tratados com DFO, em comparação com ratos diabéticos tratados com salina ($p < 0,05$). No hipocampo, não houve alteração da SOD em nenhum grupo ($p > 0,05$). No núcleo accumbens, a atividade da SOD foi diminuída somente em ratos diabéticos ($p < 0,05$). E no pâncreas, houve uma diminuição da atividade da SOD em ratos diabéticos em relação aos não diabéticos, no entanto, o tratamento com NAC ou DFO não foi capaz de reverter esta alteração ($p > 0,05$). Entretanto, o tratamento com NAC aumentou a atividade da SOD no pâncreas em ratos não diabéticos, em comparação com ratos diabéticos ($p < 0,05$).

Na figura 11 mostra a atividade enzimática da CAT. Essa enzima foi diminuída no CPF em todos os grupos de ratos diabéticos em comparação com os ratos não diabéticos tratados com salina e aumentados em ratos não diabéticos tratados com NAC ou DFO comparado com diabéticos tratados com salina ($p < 0,05$). No hipocampo a atividade da CAT foi aumentada em ratos diabéticos em comparação com o controle não diabético. Já o tratamento com NAC e DFO nos ratos não diabéticos e diabéticos tratados com DFO, diminuiu a atividade da CAT quando comparado com os ratos diabéticos tratados com salina ($p < 0,05$). Na amígdala houve uma diminuição na atividade da CAT em ratos diabéticos tratados com salina, porém o tratamento

com NAC ou DFO não alterou a atividade da CAT ($p > 0,05$). No núcleo accumbens a atividade da CAT foi reduzida em ratos diabéticos, bem como em ratos diabéticos tratados com DFO, em comparação com ratos não diabéticos tratados com salina ($p < 0,05$). E no pâncreas, uma redução na atividade de CAT em ratos diabéticos em comparação com ratos não diabéticos foi observada. Em ratos não diabéticos tratados com NAC ou DFO, um aumento na atividade da CAT foi encontrado no pâncreas, em comparação com ratos diabéticos ($p < 0,05$).

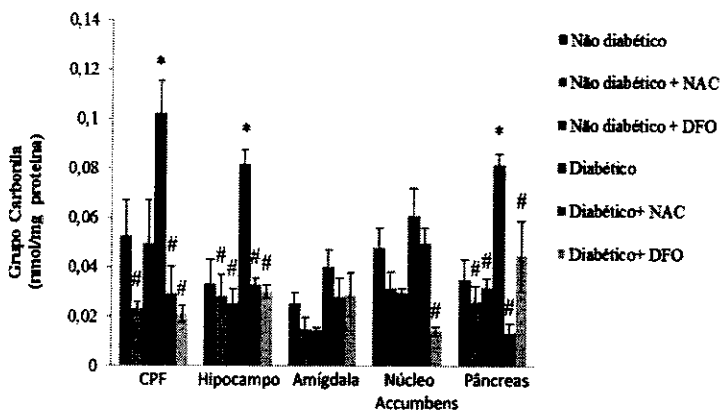


Figura 8 - Avaliação de níveis de proteínas carbonílicas.

Em CPF, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens (NAC) e pâncreas, dos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média ± erro padrão da média ($n = 5$). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos e # $p < 0,05$ vs. ratos diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

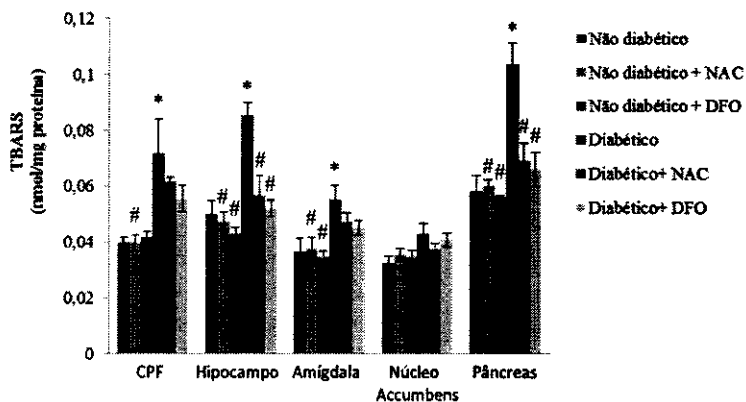


Figura 9 - Avaliação de níveis de TBARS

Em CPF, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens e pâncreas, dos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 5). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos e # $p < 0,05$ vs. ratos diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

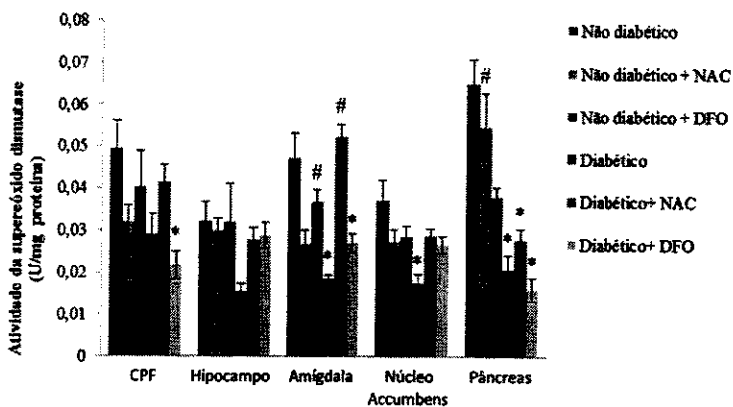


Figura 10 - Avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Em CPF, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens e pâncreas, dos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média+erro padrão da média ($n = 5$). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos e # $p < 0,05$ vs. ratos diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

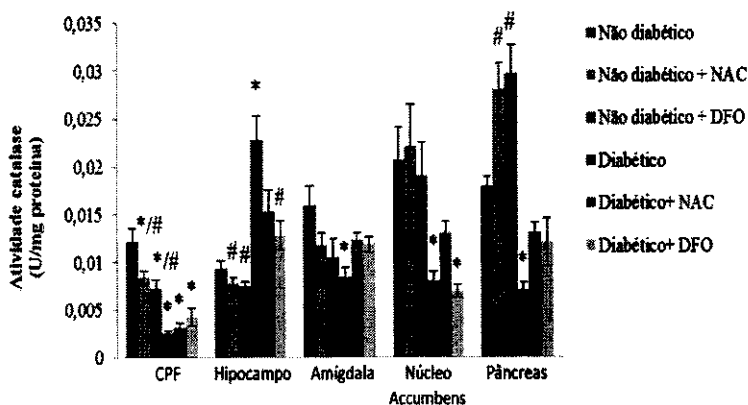


Figura 11 - Avaliação da atividade da catalase (CAT)

Em CPF, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens e pâncreas, dos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos e # $p < 0,05$ vs. ratos diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

4.5 IMUNOCONTEÚDO DE PROTEÍNAS

A Figura 12 e 13 ilustra os efeitos do tratamento com NAC ou DFO em modelo animal de diabetes induzido por aloxano no imunocontéudo das proteínas JNK e p38MAPK no cérebro de ratos. O imunocontéudo de JNK foi diminuído no CPF de ratos não diabéticos com a administração da DFO quando comparados com ratos diabéticos, e este mesmo imunocontéudo foi aumentado em CPF dos ratos diabéticos quando comparado com o controle ($p < 0,001$). No hipocampo não houve alterações significativas do imunocontéudo de JNK ($p < 0,05$). Na amígdala dos ratos diabéticos, o imunocontéudo de JNK foi aumentado quando comparada com o controle, e o tratamento com NAC reduziu o imunocontéudo, quando comparado com os ratos diabéticos ($p < 0,05$). O imunocontéudo de JNK no núcleo accumbens foi diminuído em ratos não diabéticos tratados com DFO quando comparados com o controle. E aumentado em ratos diabéticos tratados com DFO, quando comparados com o controle e com os ratos diabéticos ($p < 0,001$).

O imunocontéudo de p38MAPK foi demonstrada na figura 13. Quando comparado com o grupo controle no CPF o imunocontéudo de p38MAPK foi diminuído nos grupos de ratos diabéticos e não diabéticos que tiveram a administração de NAC. O imunocontéudo de p38MAPK foi diminuído também em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com DFO em comparação com o controle. E quando comparados com os ratos diabéticos, os ratos diabéticos tratados com DFO tiveram um imunocontéudo diminuído de p38MAPK ($p < 0,001$). Não foi visto alterações significativas no imunocontéudo de p38MAPK no hipocampo ($p < 0,05$) e na amígdala ($p < 0,05$). Já, no núcleo accumbens dos ratos diabéticos e não-diabéticos tratados com DFO e NAC, quando comparados com o grupo controle, houve uma diminuição do imunocontéudo de p38MAPK em todos esses grupos ($p < 0,001$).

Nas Figuras 14 e 15 estão ilustrados os efeitos do tratamento com NAC ou DFO em modelo animal de diabetes induzido por aloxano no imunocontéudo das proteínas PKA e PKC em tecido cerebral. Na figura 13, observou-se uma diminuição do imunocontéudo da PKA em CPF dos ratos não diabéticos tratados com DFO, quando comparados com os grupos controle e diabéticos ($p = 0,001$). Não houve alterações significativas no imunocontéudo de PKA no hipocampo ($p < 0,05$). O imunocontéudo da PKA na amígdala dos ratos diabéticos e diabéticos tratados com NAC aumentou quando comparado com o grupo controle; já, os ratos não diabéticos tratados com NAC ou DFO tiveram uma diminuição desse imunocontéudo, quando comparados com os grupos diabéticos ($p < 0,001$). Quando avaliado o imunocontéudo da PKA no núcleo accumbens, houve apenas aumento do imunocontéudo da PKA de ratos diabéticos tratados com NAC ($p = 0,001$).

Na figura 15 está demonstrado o imunocontéudo da PKC. O imunocontéudo da PKC no CPF, aumentou apenas em ratos não diabéticos tratados com NAC, quando comparado com o grupo diabético ($p < 0,05$). Em estruturas cerebrais como o hipocampo e núcleo accumbens não houve diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$ e $p < 0,05$). E na amígdala, o imunocontéudo da PKC diminuiu apenas em ratos não diabéticos tratados com DFO em comparação com ratos diabéticos ($p < 0,05$).

A Figura 16 ilustra os efeitos do tratamento com NAC ou DFO em um modelo animal de diabetes induzido por aloxano no imunocontéudo de BDNF em tecido cerebral de ratos. No CPF, houve uma diminuição do imunocontéudo do BDNF no grupo não diabético tratado com DFO, quando comparado com o controle ($p < 0,05$). No hipocampo, houve redução do imunocontéudo de BDNF nos grupos diabéticos e não

diabéticos tratados com NAC em comparação ao grupo controle. E em comparação ao grupo diabético, o grupo de não diabéticos tratados com NAC ou DFO aumentou este imunocontéudo ($P < 0,001$), assim como o grupo diabético tratado com DFO. Na avaliação do imunocontéudo do BDNF na amígdala, houve aumento significativo apenas em ratos não diabéticos tratados com DFO, em comparação com os diabéticos ($p < 0,05$). No núcleo accumbens, o imunocontéudo do BDNF foi aumentado unicamente em ratos diabéticos tratados com DFO, quando comparados aos diabéticos ($p < 0,05$).

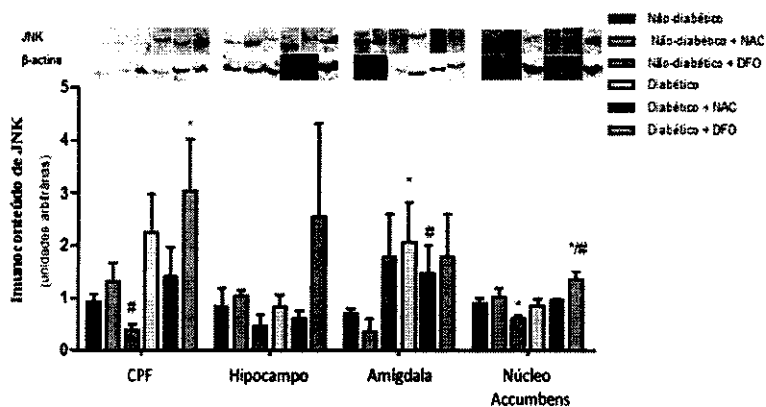


Figura 12 - Níveis do imunocontéudo da proteína JNK.

Em CPF, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens, dos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média+erro padrão da média ($n = 4$). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos e # $p < 0,05$ vs. ratos diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Fonte: elaborado pela autora.

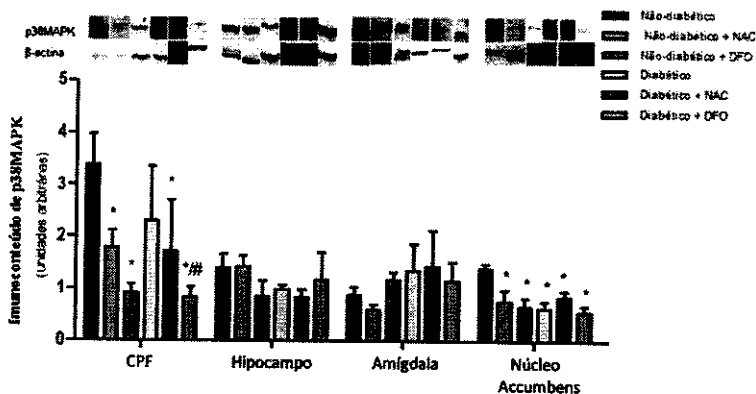


Figura 13 - Níveis do imunocontéudo da proteína p38 MAPK.

Em CPF, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens, dos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos e # $p < 0,05$ vs. ratos diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

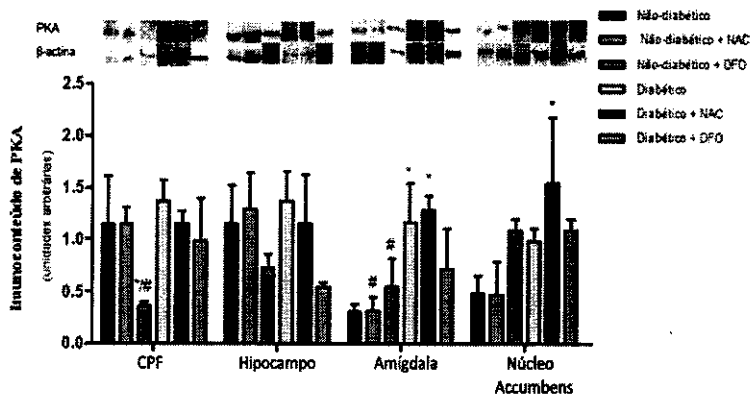


Figura 14 - Níveis do imunoc conteúdo da proteína PKA.

Em CPF, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens, dos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 4). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos e # $p < 0,05$ vs. ratos diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

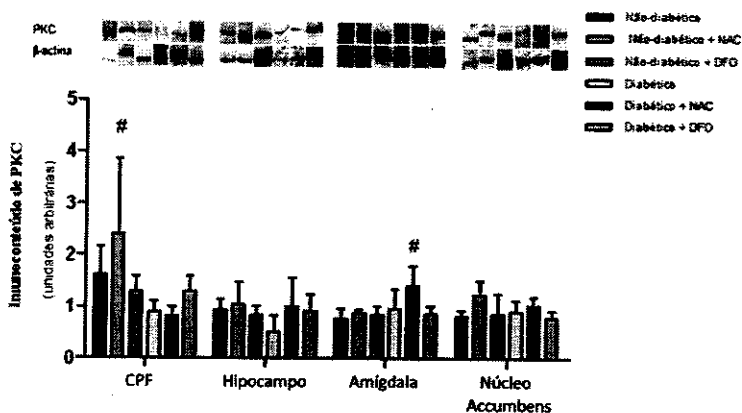


Figura 15 - Níveis do imunoconteúdo da proteína PKC.

Em CPF, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens, dos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 4$). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos e # $p < 0,05$ vs. ratos diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

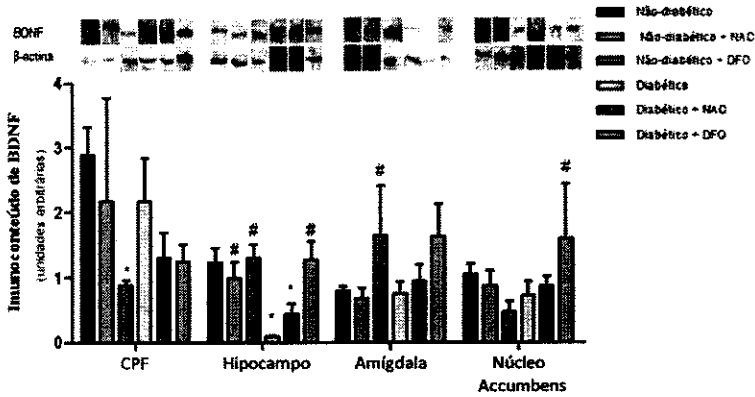


Figura 16 - Níveis do imunoconteúdo de BDNF.

Em CPF, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens, dos grupos: 1) não diabético + salina; 2) não diabético + NAC (20 mg/kg); 3) não diabético + DFO (20 mg/kg); 4) diabético + salina; 5) diabético + NAC (20 mg/kg); e 6) diabético + DFO (20 mg/kg). Valores estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 4$). * $p < 0,05$ vs. ratos não diabéticos e # $p < 0,05$ vs. ratos diabéticos de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey.

Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados obtidos nos testes comportamentais e nos parâmetros de estresse oxidativo foram publicados na revista *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* (DOI: 10.1002/dmrr.2732). Os resultados da expressão de proteínas foram submetidos à revista *Acta Daibetologica*.

5 DISCUSSÃO

O TDM e o DM são enfermidades extremamente prevalentes em todo o mundo (Wild et al., 2004; Dhavale et al., 2013), quando atuam separadamente causam dificuldades para os indivíduos acometidos pelas mesmas, porém os problemas aumentam quando ambos incidem o mesmo indivíduo. Pois, em função do TDM existe maior risco de um tratamento inadequado ou o paciente pode apresentar maior resistência ao tratamento, como também, existe maior afastamento do trabalho, a vida social fica empobrecida, outras doenças graves podem surgir e prejudicar significativamente a qualidade de vida do indivíduo e em casos mais graves levá-lo a morte precoce (Egede et al., 2005; Collins et al., 2009; Schram et al., 2009). Por isso, torna-se relevante o estudo do modelo animal de DM induzido pelo aloxano que representa o quadro diabético dependente de insulina, bem consolidado na literatura (Szkudelki, 2001; Lenzen, 2008). Bem como a avaliação de um posterior desenvolvimento do TDM após a indução do DM e também a ação de novos alvos terapêuticos capazes de serem correlacionados com a insulina que podem melhorar a qualidade de vida do paciente diabético com ou sem TDM.

No referido estudo, foi constatado o diabetes nos animais tanto no 3º dia, quanto no 15º dia, após a administração de aloxano, constatou-se ainda que a NAC e a DFO não reduziram os níveis de glicose sanguínea dos animais diabéticos. O peso dos animais diabéticos também sofreu alteração. No 7º e no 15º dia de experimento, os animais tiveram seus pesos reduzidos significativamente. Além disso, os ratos diabéticos demonstraram um comportamento tipo depressivo, sem alterações significativas na atividade locomotora. Fráguas et al. (2008) citam que um dos sintomas de depressão mais comuns relacionados ao diabetes é a perda de peso.

A depressão induzida pelo DM tem sido constatada em diversos trabalhos com animais e humanos (Gómez et al., 2003; Ceretta 2012a; Dhavale et al., 2013). Wayhs et al. (2010) induziram o diabetes em ratos e também constataram um maior tempo de imobilidade dos animais diabéticos em relação aos controles. Outro estudo, com pacientes diabéticos dependentes de insulina, demonstrou uma maior prevalência de transtornos depressivos e ideação suicida (Ceretta, 2012a).

Para o tratamento no presente estudo, foram utilizados dois antioxidantes, a NAC e DFO, e foi constatado, que quando avaliado o tempo de imobilidade, que a NAC reverteu o comportamento do tipo

depressivo em ratos diabéticos, porém o mesmo não ocorreu com a DFO. Até o presente momento, este é o segundo estudo que mostra uma reversão do comportamento do tipo depressivo somente pelo NAC, quando os dois antioxidantes estão sendo avaliados. Ferreira et al. (2008) utilizaram a NAC em diferentes doses (15, 50 e 150 mg) e também mostraram uma reversão de comportamento do tipo depressivo no teste de nado forçado. Outro estudo que avaliou o comportamento anedônico (um dos comportamentos depressivos) em ratos submetidos ao protocolo de estresse e tratados com NAC e DFO revelou que esses dois antioxidantes utilizados em conjunto reverteram o comportamento depressivo (Arent et al., 2012). A utilização do NAC isoladamente, também reverteu o comportamento tipo depressivo, porém de forma mais leve se comparada a associação dos dois antioxidantes. Quando testado em pacientes com TDM, o tratamento com NAC mostrou eficácia superior ao placebo após 16 semanas (Berk et al., 2014).

O modelo experimental de diabetes induzido por aloxano é um método muito simples e conveniente para se obter um modelo animal de DM (Szkudelski, 2001). O mecanismo de ação do aloxano baseia-se principalmente na destruição das células- β pancreáticas (Malaisse et al., 1982) o que leva à hiperglicemia. No presente estudo, demonstrou-se que ratos com diabetes induzido por aloxano, apresentaram indução de estresse oxidativo, como evidenciado pelo aumento do dano oxidativo a lipídeos e a proteínas, além da diminuição da atividade das enzimas antioxidantes em tecido cerebral e pâncreas. Este estudo corrobora dados publicados anteriormente, os quais mostraram que ratos diabéticos apresentam um aumento de dano oxidativo e um desequilíbrio entre enzimas antioxidantes em CPF, hipocampo, estriado e amígdala (Ceretta et al., 2012b). Além disso, outro estudo revelou um aumento de danos lipídicos e uma redução na atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT, glutatona peroxidase, glutatona redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em fígado e pâncreas de ratos diabéticos induzidos por aloxano (Oloyede et al., 2015).

O estresse oxidativo no diabetes tem sido associado à hiperglicemia e, consequentemente, a complicações cardiovasculares e também prejuízos ao SNC (Mangarinos et al., 2000; Jung et al., 2010; Pitocco et al., 2010). Além disso, a resistência à insulina e a disfunção das células- β pancreáticas parecem desempenhar um papel importante no estado de desequilíbrio redox (Pitocco et al., 2010). O estresse oxidativo no diabetes pode estar relacionado a uma disfunção do metabolismo energético mitocondrial, visto que, foi observado no cérebro de ratos diabéticos induzidos por aloxano, alterações nas atividades de

complexos mitocondriais I, II, II-III e IV e das enzimas citrato sintase e creatina cinase (Ceretta et al., 2010). O TDM também está associado à indução do estresse oxidativo em pacientes (Black et al., 2015). Estudos clínicos mostraram que indivíduos com TDM têm níveis elevados de peroxidação lipídica (Maes et al., 2010). Foi observado também que mulheres têm níveis maiores de peroxidação lipídica no plasma do que os homens (Katalinic et al., 2005). Os autores Talarowska et al. (2011) encontraram correlação entre os níveis de concentração plasmática de malondialdeído (MDA) com alterações da memória de trabalho e declarativa em pacientes com TDM, visto que a quantificação de MDA é amplamente utilizada como um marcador do dano oxidativo em moléculas lipídicas. Em modelos animais de depressão induzido por estresse crônico moderado ou privação materna, foram observados aumento de lipídeos e danos à proteínas, como também um desequilíbrio da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT (Lucca et al., 2009a; Lucca et al 2009b; Réus et al., 2015a; Réus et al 2015b) sugerindo que o dano oxidativo pode desempenhar um papel importante na relação entre o DM e o TDM.

Estratégias de tratamento com antioxidantes poderiam fornecer novas abordagens terapêuticas para reverter o estresse oxidativo presente em ambas as comorbidades estudadas neste trabalho. Um antioxidante muito utilizado em pesquisas é a NAC, que tem demonstrado efeito antidepressivo em estudos clínicos e pré-clínicos (Arent et al., 2012; Berk et al., 2008; Magalhães et al., 2011). Atua principalmente por meio do aumento da síntese de glutatona, mas também exibe propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras (Arent et al., 2012; Chen et al., 2008; Dean et al., 2011). A DFO também atua como antioxidante e demonstrou uma diminuição de ERO e danos oxidativos em animais com comportamento do tipo depressivo e mania (Arent et al., 2012; Halliwell, 1989; Valvassori et al., 2008). Em ratos submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado, o tratamento apenas com DFO não demonstrou efeitos antidepressivos. No entanto, em combinação com a NAC, o tratamento com DFO potencializou o efeito antidepressivo da NAC (Arent et al., 2012). Da mesma forma, no presente estudo foram encontrados efeitos antidepressivos em ratos diabéticos tratados com NAC. Por outro lado, tanto a NAC quanto a DFO reduziram o dano oxidativo aos lipídeos e as proteínas em cérebro e pâncreas dos animais diabéticos com comportamento do tipo depressivo. Os efeitos da NAC sobre o estresse oxidativo em diabetes foram documentados anteriormente. Kamboj e Sandhir (2011) também demonstraram que a suplementação com NAC bloqueou o estresse

oxidativo e a disfunção mitocondrial induzida por hiperglicemia em córtex cerebral de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Nesta mesma estrutura, o tratamento com NAC também diminuiu a peroxidação lipídica induzida por hiperglicemia, melhorando assim a composição, a fluidez da membrana e a atividade de enzimas ligadas à membrana (Kamboj et al., 2009). Além disso, em filhotes de ratas diabéticas, o tratamento com NAC reduziu os níveis de ERO e aumentou os níveis de glutathione no coração do feto, impedindo o desenvolvimento de problemas cardíacos congênitos (Moazzen et al., 2014). Juntos, esses dados reforçam a importância que o NAC pode desempenhar para diminuir o estresse oxidativo no cérebro e em outros órgãos afetados pela hiperglicemia.

O presente estudo foi o primeiro a mostrar os efeitos antioxidantes do NAC em pâncreas, CPF, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens de ratos diabéticos induzidos por aloxano que apresentavam comportamento do tipo depressivo. Estas áreas do cérebro estão interligadas e associadas com alterações e regulação da memória, além de estarem envolvidas com transtornos do humor, incluindo o TDM (Pittenger e Duman, 2008; Réus et al., 2014). As disfunções cerebrais também têm sido associadas a alterações cognitivas no DM (Bornstein et al., 2014). Neste estudo, foi demonstrado que os ratos diabéticos apresentavam menores atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT tanto no cérebro quanto no pâncreas. Porém, a atividade de CAT foi aumentada em hipocampo de ratos diabéticos. Esse aumento também foi constatado em uma pesquisa anterior (Ceretta et al., 2012b). Lucca et al. (2009a) ainda demonstrou um aumento na atividade de CAT em cerebelo, hipocampo, estriado e córtex cerebral, mas também uma diminuição da atividade de SOD em CPF, hipocampo, estriado e córtex cerebral de ratos submetidos ao modelo de estresse crônico moderado, corroborando a referida pesquisa. Um desequilíbrio da relação entre CAT e SOD pode ser um indicador de níveis elevados de ERO ou estresse oxidativo (Michel et al., 2004), como demonstrado neste trabalho. Embora o tratamento com NAC e DFO tenha diminuído os danos aos lipídeos e às proteínas, os efeitos não foram suficientes para melhorar a capacidade antioxidante em ratos diabéticos com comportamento do tipo depressivo. No cérebro de ratos submetidos ao estresse crônico, a combinação entre NAC e DFO melhorou os efeitos induzidos pelo estresse nas atividades da CAT e da SOD (Arent et al., 2012). Assim, sugere-se que a combinação entre NAC e DFO deve ser investigada em estudos futuros avaliando o estresse oxidativo em ratos diabéticos com comportamento do tipo depressivo.

Vários estudos revelam que o estresse oxidativo secundário à hiperglicemia ocorre antes das complicações mais tardias do DM se manifestarem clinicamente, incluindo os transtornos mentais. Por isso, acredita-se que ele desempenhe um papel particularmente relevante na patogênese desta doença (Rocha et al., 2006; Hamilton et al., 2007). Pesquisas revelam que o estresse oxidativo provoca alterações também nas vias de sinalização, o que poderia auxiliar no posterior desenvolvimento do TDM em pacientes diabéticos (Saltiel e Kahn, 2001; Taylor et al., 2005). Uma área muito explorada tem sido a regulação de vias celulares sensíveis ao estresse, que incluem a p38MAPK e a JNK (Ceriello e Motz, 2004).

Tanto a via p38MAPK quanto a via JNK são ativadas pelo estresse celular. A estimulação da cascata da via p38MAPK influencia um grande número de processos celulares envolvidos na inflamação, imunidade, crescimento celular e apoptose, entre outros (Lopes et al., 2008). Porém, no presente estudo, não houve um aumento significativo do imunoconteúdo dessa proteína em estruturas cerebrais, mesmo no grupo diabético que apresentou um comportamento tipo depressivo. Nesse sentido, outras pesquisas demonstraram resultados parecidos. Em um estudo com animais submetidos a condições de estresse, foi demonstrado que não houve alterações nessa mesma via (Liu et al., 2004). Outro estudo que avaliou o estresse com ratos submetidos ao teste de nado forçado mostrou que somente em hipocampo houve um pequeno aumento da via p38MAPK (Shen et al., 2004). Diferentemente dos dados acima, uma pesquisa que avaliou o imunoconteúdo da referida via em ratos submetidos ao modelo animal de diabetes encontrou alterações significativas em hipocampo, estriado e hipotálamo (Ramakrishnan et al., 2005).

Outro achado do presente estudo com relação à via p38MAPK foi a diminuição do seu imunoconteúdo em CPF e núcleo accumbens de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com NAC e DFO, em comparação ao controle. Esse resultado pode ser explicado em função de que os antioxidantes atuam diretamente sobre o estresse oxidativo, diminuem ERO e a inflamação, que são comuns tanto no DM quanto no TDM e, conseqüentemente, diminuem o imunoconteúdo da via p38MAPK (Ho et al., 1999; Francés et al., 2011; Gibson et al., 2011).

A via JNK funciona essencialmente como mediadora de estresse celular, tais como inflamação e apoptose (Shen et al., 2004). Um estudo sugere que a ativação constante dessa via pode ser um dos causadores da resistência à insulina, DM e obesidade (Benett et al., 2003). Porém, em condições diabéticas, a via da JNK também é ativada em vários tecidos,

provocando morte celular (Kaneto, 2005). No referido estudo, o grupo diabético teve o imunocontéudo dessa via aumentado somente na amígdala, confirmando o que o estudo anterior já relatou, também foi visto que o grupo diabético tratado com NAC conseguiu reverter este efeito, sugerindo que este antioxidante bloqueou a via JNK, como já ocorreu em outro estudo utilizando um diferente antioxidante, o ascorbato (vitamina C) (Ho et al., 2000; Evans et al., 2002).

No caso dos animais não diabéticos tratados com DFO, foi demonstrada uma diminuição do imunocontéudo de JNK em núcleo accumbens e CPF, mostrando que o antioxidante teve ação eficaz em animais saudáveis. Porém, mostrou-se diferente em sua ação no caso de animais diabéticos, pois aumentou significativamente o imunocontéudo dessa via nas mesmas estruturas cerebrais. Tanto em estudos com DM quanto com TDM, a DFO mostrou-se menos eficaz se administrado individualmente. Em uma pesquisa que submeteu ratos ao estresse crônico leve, foi visto que somente quando o DFO era associado à NAC o comportamento do tipo depressivo conseguia ser revertido (Arent et al., 2012). Em um estudo com ratos diabéticos, foi visto que a DFO teve uma ação inferior à NAC em relação à proteção nos parâmetros de estresse oxidativo em estruturas cerebrais (Réus et al., 2015).

Outras vias de sinalização diretamente envolvidas com o DM e o TDM são a PKA e a PKC. A expressão da PKA quando diminuída traz prejuízos para os pacientes diabéticos, pois interfere no transporte de glicose para dentro das células (Costes et al., 2006) e aumenta a geração de ERO (Oliveira et al., 2010). Estudos recentes sugerem que a diminuição da expressão da PKA está envolvida em vários transtornos mentais, incluindo o TDM (Shelton, 2007; Shelton et al., 2009a; Shelton et al 2009b). Foi visto em um estudo com cérebros *post-mortem* que pacientes depressivos vítimas de suicídio apresentavam uma diminuição da atividade da PKA no CPF (Dwivedi et al., 2002). No presente estudo, ratos diabéticos tratados com NAC tiveram um aumento do imunocontéudo de PKA no núcleo accumbens em relação ao controle, demonstrado que o antioxidante conseguiu auxiliar nesse aumento. A NAC reverteu o comportamento tipo depressivo em ratos diabéticos neste estudo, o que poderia explicar o aumento do imunocontéudo de PKA nessa estrutura cerebral que está envolvida diretamente com a depressão. Outro estudo com ratos submetidos a um modelo animal de depressão e também tratados com um antioxidante, o ácido fólico, mostrou que a PKA está diretamente envolvida com a ação antidepressiva desse antioxidante (Brocardo, 2008). Houve também um aumento do imunocontéudo de PKA na amígdala dos grupos de animais

diabéticos e diabéticos tratados com NAC, pois o funcionamento da amígdala apresenta-se aumentado em casos de ansiedade ou TDM (Turek, 2007), diferente das outras estruturas cerebrais, por ela estar ligada ao medo e a ansiedade (Paton et al., 2006) características presentes também no TDM. Uma pesquisa realizada com ratos submetidos ao nado forçado mostrou diminuição do imunocontéudo da amígdala em animais tratados com antidepressivos (Abelaira et al., 2011), demonstrando, assim, que no presente estudo a NAC não reverteu o imunocontéudo da PKA na amígdala.

A via da PKC está envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento (Idris et al., 2001). A família PKC inclui 12 isoformas que são distribuídas em vários tecidos do corpo, inclusive o cerebral (Newton, 1995). Seu principal ativador fisiológico é o DAG (Brownlee, 2001). No caso do DM, a hiperglicemia ativa a via DAG-PKC que está envolvida na transdução de sinais, regulação da permeabilidade vascular, proliferação celular, angiogênese, ação de citocinas, diminuição do fluxo sanguíneo aos nervos, problemas renais, cardiopatias e retinopatia diabética (Schaan, 2003; Reis et al., 2008). No presente trabalho, foi observado um aumento do imunocontéudo de PKC na amígdala de ratos diabéticos tratados com NAC, demonstrando que o antioxidante não reverteu essa alteração. O aumento da PKC pode causar alterações na amígdala, pois está ligado a danos celulares causados pela hiperglicemia e também correlacionados ao TDM, bem como, a atividade da amígdala aumentada também está relacionada com este transtorno (Turek, 2007). Estudos relatam que o aumento da atividade da via PKC, pode estar relacionado com TDM. Pandey et al. (1998) mostraram aumento da atividade da via PKC em plaquetas de pacientes deprimidos. Entretanto, existem estudos que divergem sobre a informação acima, pois demonstraram que a expressão de PKC está diminuída em pacientes depressivos, porém não em indivíduos saudáveis (Pandey et al., 2003; Pandey et al., 2004). Isso pode explicar o aumento do imunocontéudo de PKC no CPF do grupo não diabético tratado com NAC.

Várias pesquisas estão correlacionando a via de sinalização do BDNF com o DM e o possível desenvolvimento do TDM (Fujinami et al., 2008; Castillo-Quan et al., 2010; Marosi e Mattson, 2014). O BDNF é importante para o processo de sobrevivência celular, maturação e plasticidade sináptica (Brunoni et al., 2008). Em função disso, a sua diminuição é prejudicial para o correto funcionamento cerebral (Belmaker e Agan, 2008). Nesse sentido, estudos demonstraram que o

BDNF está ligado diretamente com a patogenia do TDM (Groves, 2007; Caruncho e Rivera-Baltanás, 2010). Relacionando o DM com o BDNF, foi visto que este último, ao agir no cérebro e na periferia, diminui a resistência à insulina em pacientes diabéticos (Marosi e Mattson, 2014) e protege as células pancreáticas de ratos induzidos ao DM (Yamanaka et al., 2006). No presente estudo, mostrou-se uma diminuição significativa do BDNF em hipocampo de ratos diabéticos em relação ao controle e somente o tratamento com DFO reverteu esse declínio. No núcleo Accumbens, o grupo diabético tratado com DFO igualmente apresentou um aumento do imunocontéudo de BDNF em relação ao grupo diabético, demonstrado que esse antioxidante também é capaz de aumentar esse imunocontéudo, de forma semelhante aos antidepressivos. Ceretta et al. (2012c) relataram um aumento de BDNF em CPF de ratos diabéticos que apresentavam comportamento tipo depressivo e foram tratados com o antidepressivo imipramina. Em outra pesquisa realizada com ratos que desenvolveram resistência à insulina, observou-se que os animais também tiveram níveis reduzidos de BDNF em hipocampo (Gómez-Pinilla, 2008). Um estudo desenvolvido por Krabbe et al. (2006) que buscou identificar a relação entre BDNF e DM2 demonstrou uma diminuição de BDNF em condições hiperglicemiantes nos pacientes estudados. Com relação ainda ao imunocontéudo de BDNF na amígdala, houve um aumento em ratos não diabéticos tratados com DFO, resultado encontrado em outro estudo, que comparou animais saudáveis com os submetidos ao protocolo de privação materna, e foi visto que esses animais saudáveis não tiveram diminuição de BDNF na amígdala (Abelaira et al., 2012), sugerindo que em bom estado de saúde o BDNF não sofre grandes alterações.

Resultados do presente trabalho sugerem que o DM pode desencadear o TDM, pois em função da hiperglicemia e da hipoinsulinemia presente constantemente no DM1, há indução de estresse oxidativo e desregulação em cascatas de sinalização celular. Também foi demonstrado que os antioxidantes atuaram desfazendo as alterações comportamentais e o estresse oxidativo, mas pouco auxiliaram nos danos às cascatas de sinalização celular. No entanto, mais estudos experimentais e clínicos são necessários para que se possa sugerir este tratamento adjuvante para a terapêutica do DM ou do TDM.

6 CONCLUSÕES

- Foi demonstrado por meio do teste de nado forçado, que os animais submetidos ao modelo animal de DM desenvolveram comportamento do tipo depressivo e o tratamento com a NAC reverteu esse comportamento.

- Os antioxidantes NAC e DFO utilizados nesta pesquisa agiram diretamente sobre o estresse oxidativo, diminuindo os níveis de dano oxidativo a proteínas e lipídeos. Porém, esse tratamento teve pouco efeito sobre a atividade de enzimas antioxidantes.

- A NAC e a DFO reverteram alterações significativas no imunoconteúdo das vias do BDNF e da JNK e isso demonstra uma nova direção para evitar neurodegenerações relacionadas com o DM.

REFERÊNCIAS

Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Zappellini G, Cipriano AL, Scaini G, Streck EL, Quevedo J. Lamotrigine treatment reverses depressive-like behavior and alters BDNF levels in the brains of maternally deprived adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;101(3):348-353

Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Zappellini G, Ferreira GK, Gomes LM, Carvalho-Silva M, Luciano TF, Marques SO, Streck EL, Souza CT, Quevedo J. Effects of acute and chronic treatment elicited by lamotrigine on behavior, energy metabolism, neurotrophins and signaling cascades in rats. *Neurochem Int.* 2011;59(8):1163-1174.

Abul-Ezz SR, Walker PD, Shah SV. Role of glutathione in an animal model of myoglobinuric acute renal failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(21):9833-9837.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126.

Amer MA, Ghattas MH, Abo-Elmatty DM, Abou-El-Ela SH. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. *Genet Mol Res.* 2011;10(4):3722-3730.

American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--1998. *Diabetes care.* 1998; 39(1):12-45.

American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes care.* 2013;36(1):S11-66.

American Psychiatric Association. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5ª ed. Porto Alegre (RS): Artmed; c2014. 948p.

Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes. *Diabet Care* 2001;24(6):1069-1078.

Arent CO, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Synergist effects of n-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. *Neurochem Int.* 2012;61(7): 1072-1080.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279-312.

Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Brasileiros Endocrinol Metabol.* 2008;52(6):940-946.

Bauer LK, Wulsin LR, Guadagno G. Acute psychosis and type 2 diabetes mellitus: should screening guidelines be revised? *Prim Care Companion CNS Disord.* 2011;13(1):1-13.

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. *Exp Neurol.* 2010;222:125-134.

Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med* 2008;358:55-68.

Bennett BI, Satoh Y, Lewis AJ. Jnk: A New Therapeutic Target For Diabetes. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(4):420-425.

Berk M, Dean OM, Cotton SM, Jeavons S, Tanious M, Kohlmann K, Hewitt K, Moss K, Allwang C, Schapkaizt I, Robbins J, Cobb H, Ng F, Dodd S, Bush AI, Malhi GS. The efficacy of adjunctive N-acetylcysteine in major depressive disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry.* 2014;75:628-636.

Bernard KD, Skinner TC, Peveler R. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 1 diabetes: systematic literature review. *Diabet Med.* 2006; 23:445-448.

Black CN, Bot M, Scheffer PG, Cuijpers P, Penninx BW. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology.* 2015;51:164-175.

Boquist L. Differences In The Blood Glucose Response Of Mice To Alloxan And Alloxan-Inhibiting Compounds. *Acta Endocrinol.* 1979;92:687-693.

Bot M, Pouwer F, Ormel J, Slaets JP, de Jonge P. Education and psychological aspects Predictors of incident major depression in diabetic outpatients with subthreshold depression. *Diabet Med.* 2010;27:1295–1301.

Briaud I, Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, Rhodes CJ. Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2003; 52(4):974-983.

Brocardo PS. Efeitos do ácido fólico em modelos animais de depressão e de mania [tese]. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. Florianópolis: UFSC. 2008.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813-820.

Brunoni AR, Lopes M, Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008;11:1169–1180

Cançado, RD. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. *Rev Bras Hematol. Hemoter.* 2007;29(3):316-326.

Caruncho HJ, Rivera-Baltanás T. Biomarcadores de la depresión. *Rev Neurol* 2010;50:470-476.

Centers for Disease Control and Prevention. National diabetes fact sheet. 2007. [acesso em junho 13, 2015]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/estimates07.htm#8>.

Ceretta LB, Reus GZ, Abelaira HM, Jornada LK, Schwalm MT, Hoepers NJ, Tomazzi CD, Gulbis KG, Ceretta RA, Quevedo J. Increased prevalence of mood disorders and suicidal ideation in type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol.* 2012a;49(1):227-234.

Ceretta LB, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Zappellini G, Felisbino FF, Steckert AV, Dal- Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res.* 2012b; 2012:1-20.

Ceretta LB, Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Zappellini G, Aguiar BW, Pfaffenseller B, Lersh C, Kapczynski F, Quevedo J. Imipramine treatment reverses depressive-like behavior in alloxan-diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012c;28:139-144.

Ceriello A. Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr Pract*. 2006;12(1):60-62.

Chan O, Chan S, Inouye K, Vranic M, Matthews SG. Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment. *Endocrinology*. 2001;142(11):4872-4879.

Chang CC, Chang CY, Wu YT, Huang JP, Yen TH, Hung LM. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *J Biomed Sci*. 2011;18(1):47.

Chen G, Zeng WZ, Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Zhao ZH, Manji HK. The mood stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem*. 1999;72:879-82.

Cheng D. Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. *Nutr Metab (Lond)*. 2005;18:2-29.

Chowdhury TA. Diabetes and Cancer. *QJM*. 2010;103:905-915.
Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biot*. 2004;26:249-261.

Collins MM, Corcoran P, Perry JJ. Anxiety and depression symptoms in patients with diabetes. *Diabet Med*. 2009;26(2):153-161.

Costes S, Broca C, Bertrand G, Lajoix AD, Bataille D, Bockeaert J, Dalle S. ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 2006;55(8):2220-2230.

da Silva Haeser A, Sitta A, Barschak AG, Deon M, Barden AT, Schmitt GO, Landgraft S, Gomez R, Barros HM, Vargas CR. Oxidative stress

parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test: the clonazepam effect. *Brain Res.* 2007;18(1154):137-143.

Dal-Pizzol F, Klamt F, Frota ML Jr, Andrade ME, Caregnato FF, Vianna MM, Schoder N, Quevedo J, Izquierdo I, Archer T, Moreira JC. Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult wistar rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001;130(1):109-114.

Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 1995;369(2-3):131-135.
De Flora S, Izzotti A, D'Agostin F, Cesarone CF. Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am J Med.* 1991;91(3C): 122–130.

Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci.* 2011;36:78–86.

Della FP, Abelaira HM, Réus GZ, Antunes AR, Dos Santos MA, Zappelinni G, Steckert AV, Vuolo F, Galant LS, Dal-Pizzol F, Kapczinski F, Quevedo J. Tianeptine exerts neuroprotective effects in the brain tissue of rats exposed to the chronic stress model. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;103:395-402.

Dhavale HS, Panikkar V, Jadhav BS, Ghulghule M, Agari AD. Depression and diabetes: impact of antidepressant medications on glycaemic control. *J Assoc Physicians India.* 2013;61(12):896-899.
Duman RS. Structural alterations in depression: cellular mechanisms underlying pathology and treatment of mood disorders. *CNS Spectr.* 2002;7:140-142.

Dwivedi Y, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN. [(3)H]cAMP binding sites and protein kinase A activity in the prefrontal cortex of suicide victims. *Am J Psychiatry.* 2002;159: 66-73.
Egede LE, Nietert PJ, Zheng D. Depression and all-cause and coronary heart disease mortality among adults with and without diabetes. *Diabet Care.* 2005;28:1339–1345.

Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C, Cabantchik ZI. Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation. *Blood.* 2003;102: 2670-2677.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. **Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes.** *Endocri Rev.* 2002;23:599-622.

Ferreira FR, Biojone C, Joça SR, Guimarães FS. **Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats.** *Behav Pharmacol.* 2008;19:747-750.

Fráguas R, Soares SM, Bronstein MD. **Depressão e diabetes mellitus.** *Rev psiquiatr clín.* 2009;36(3):93-9.

Francés DE, Ronco MT, Monti JA, Ingaramo PI, Pisani GB, Parody JP, Pellegrino JM, Sanz PM, Carrillo MC, Carnovale CE. **Hyperglycemia induces apoptosis in rat liver through the increase of hydroxyl radical: new insights into the insulin effect.** *J Endocrinol.* 2010;205:187-200.

Fujinami A, Ohta K, Obayashi H, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Kozai H, Imai S, Ohta M. **Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship to glucose metabolism and biomarkers of insulin resistance.** *Clin Biochem.* 2008;41(10-11):812-817.

Garcia-Bailo B, El-Soheiry A, Haddad PS, Arora P, Benzaied F, Karmali M, Badawi A. **Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 diabetes mellitus: modulation of inflammation and oxidative stress.** *Biologics.* 2011;5:7-19.

Gibson KR, Winterburn TJ, Barrett F, Sharma S, MacRury SM, Megson IL. **Therapeutic potential of N-acetylcysteine as an antiplatelet agent in patients with type-2 diabetes.** *Cardiovasc Diabetol.* 2011;21:10-43.

Gois C, Barbosa A, Ferro A, Santos AL, Sousa F, Akiskal H, Akiskal K, Figueira ML. **The role of affective temperaments in metabolic control in patients with type 2 diabetes.** *J Affect Disord.* 2011;134(1-3):52-58.

Gómez-Pinilla F. **Brain foods: the effects of nutrients on brain function.** *Nat Rev Neurosci.* 2008;9:568-578.

Gould TD, Manji HK. **Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders.** *J. Psychosom Res.* 2002;53:687-697.

Grigsby AB, Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. Prevalence of anxiety in adults with diabetes: A systematic review. *J Psychosom Res.* 2002;53:1053-1060.

Groop PH, Thomas MC, Moran JL, Wadèn J, Thorn LM, Mäkinen VP, Rosengård-Bärlund M, Saraheimo M, Hietala K, Heikkilä O, Forsblom C; FinnDiane Study Group. The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2009;58:1651-1658.

Groves JO. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Mol Psychiatry* 2007;12:1079-1088.

Halliwell B. Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action? *Free Radic Biol Med.* 1989;7:645-651.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine.* 3rded, Oxford: Oxford Science; 1999.

Hamilton SJ, Chew GT, Watts GF. Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2007;4:89-102.

Ho E, Chen G, Brain TM. Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NFκB activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *FASEB J.* 1999;13:1845-1854.

Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Lin-shiau SY. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation.* 2000;101: 2618-2624.

Idris I, Gray S, Donnelly. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetol.* 2001;44:659-673.

International Diabetes Federation [Internet]. *Bruxelas: Diabetes Atlas* 2012. [Acesso em 2015 apr 20]. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.

Jiang H, Luan Z, Wang J, Xie J. Neuroprotective effects of iron chelator Desferal on dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats with iron-overload. *Neurochem Int.* 2006; 49:605-609.

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. *J Neural Transm.* 2010;117(12):1411-1418.

Kaihara KA, Dickson LM, Ellenbroek JH, Orr CM, Layden BT, Wicksteed B. PKA Enhances the Acute Insulin Response Leading to the Restoration of Glucose Control. *Diabetes.* 2015;64(5):1688-1697.

Kamboj SS, Chopra K, Sandhir R. Hyperglycemia-induced alterations in synaptosomal membrane fluidity and activity of membrane bound enzyme : beneficial effect of Nacetylcysteine supplementation. *Neuroscience.* 2009;162:349-358.

Kamboj SS, Sandhir R. Protective effect of N-acetylcysteine supplementation on mitochondrial oxidative stress and mitochondrial enzymes in cerebral cortex of streptozotocin-treated diabetic rats. *Mitochondrion.* 2011;11:214-222.

Kan C , Silva N , Ouro SH , Rajala L , Timonen M , Stahl D , Ismail K. A Systematic Review and Meta-analysis of the Association Between Depression and Insulin Resistance. *Diabet Care.* 2013;36(8):480-489.
Kaneto H. The JNK pathway as a therapeutic target for diabetes. *Expert Opin Ther Targets.* 2005;9(3):581-592.

Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2, 20 -azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6- sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol.* 2005; 140: 47-52.

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.

Lasselin J, Capuron L. Chronic low-grade inflammation in metabolic disorders: relevance for behavioral symptoms.

Neuroimmunomodulation. 2014;2:95–101.

Leal RB, Cordova FM, Lynn H, Bobrovskaya L, Dunkley PR. Lead-stimulate p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. Toxicol Appl Pharmacol. 2002;178:44-51.

Leal RB, Ribeiro SJ, Posser T, Cordova FM, Rigon AP, Zaniboni-Filho E, Bairy ACD. Modulation of ERK1/2 and p38MAPK by lead in the cerebellum of Brazilian catfish *Rhamdia quelen*. Aquatic Toxicol. 2006;77:98-104.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2008;51:216-226.

Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini SA, Padovani CR. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. Acta Cir Bras.2003;18(2):132-142.

Lesuy SF. “Introducción y Especies Activas de Oxígeno”. In marrón, NP: Estresse Oxidativo e Antioxidantes. Canoas: Editora Ulbra, 2002. p. 21-32.

Li C, Ford ES, Zhao G, Ahluwalia IB, Pearson WS, Mokdad AH. Prevalence and correlates of undiagnosed depression among U.S. adults with diabetes: the Behavioral Risk Factor Surveillance System. Diabetes Res Clin Pract. 2009;83(2):268–279.

Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. JAMA. 2009;302(2):179-188.

Lin EH, Von Korff M, Alonso J, Angermeyer MC, Anthony J, Bromet E, Bruffaerts R, Gasquet I, de Girolamo G, Gureje O, Haro JM, Karam E, Lara C, Lee S, Levinson D, Ormel JH, Posada-Villa J, Scott K, Watanabe M, Williams D. Mental disorders among persons with diabetes--results from the World Mental Health Surveys. J Psychosom Res. 2008;65(6):571-580.

Liu YF, Bertan K, Perides G, McEwen BS, Wang D. Stress induces activation of stress-activated kinases in the mouse brain. *J Neurochem.* 2004;89(4):1034-1043.

Lopes JP, Moreira SM, Soares Fortunato J. Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas relação com as complicações da diabetes mellitus tipo 2. *Acta Med Port.* 2008;21(3):293-302.

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. *Neurochem Int.* 2009a;54:358-362.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Gavioli EC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. *J Psychiatr Res.* 2009b;43:864-869.

Lustman PJ, Anderson RJ, Freedland KE, de Groot M, Carney RM, Clouse RE. Depression and poor glycemic control. *Diabetes Care* 2000;23(7):934-942.

Lustman PJ, Griffith LS, Clouse RE. Depression in adults with diabetes. *Semin Clin Neuropsychiatry.* 1997;2(1):15-23.

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans, E. Increased plasma peroxides and serumoxidized lowdensity lipoprotein antibodies in major depression: markers that further explain the higher incidence of neurodegeneration and coronary artery disease. *J Affect Disord.* 2010;125:287-294.

Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35(3):676-692.

Magalhaes PV, Dean OM, Bush AI, Copolov DL, Malhi GS, Kohlmann K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Berk M. N-

acetylcysteine for major depressive episodes in bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011;33:374–378.

Magariños AM, McEwen BS. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(20):11056–11061.

Malaisse Wj, Malaisse-Lagae F, Sener A, Pipeleers Dg. Determinants Of The Selective Toxicity Of Alloxan To The Pancreatic B Cell. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79:927-930.

Manjarrez-Gutiérrez G, Rocío Herrera-Márquez JR, Bueno-Santoyo S, González-Ramírez M, Hernández J. Changes in brain serotonin biosynthesis in rats with diabetes mellitus induced by streptozocin: effect of insulin treatment. *Rev Invest Clin.* 2000;52(5):509-516.

Mann CD, Vu TB, Hrdina PD. Protein kinase C in rat brain cortex and hippocampus: effect of repeated administration of fluoxetine and desipramine. *J Pharmacol.* 1995;115:595-600.

Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(2):89-98.

Mesilato de desferroxamina. [Bula]. Itapira (SP): Cristália; 2015.
Michel TM, Thome 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. *J Neural Transm.* 2004;111:1191–1201.

Moazzen H, Lu X, Ma NL, Velenosi TJ, Urquhart BL, Wisse LJ, Gittenberger-de Groot AC, Feng Q. N-Acetylcysteine prevents congenital heart defects induced by pregestational diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:46.

Molina MF, Sanchez-Reus I, Iglesias I, Benedi J. Quercetin, a flavomoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. *Biol Pharm Bull.* 2003;26:1398-1402.

Moreira RO, Papelbaum M, Appolinario JC, Matos AG, Coutinho WF, Meirelles RMR, Ellinger VCM, Zagury L. Diabetes mellitus e Depressão: Uma Revisão Sistemática Diabetes mellitus e depressão: uma revisão sistemática. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(1):19-29.

Musselman DL, Betan E, Larsen H, Phillips LS. Relationship of depression to diabetes types 1 and 2: epidemiology, biology, and treatment. *Biol Psychiatry.* 2003;54(3):317-329.

Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B; Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2005;353:2643–2653.

Newton AC. Protein kinase C: structure, function and regulation: minireview. *J Biol Chem.* 1995;270:28495-28498.

Oliveira BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM. The role of oxidative stress in the aging process. *Scientific World J.* 2010;10:1121-1128.

Oloyede HO, Bello TO, Ajiboye TO, Salawu MO. Antidiabetic and antidyslipidemic activities of aqueous leaf extract of *Dioscoreophyllum cumminsii* (Stapf) Diels in alloxaninduced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2015;166:313-322.

Pandey GN, Dwivedi Y, Kumari R, Janicak PG. Protein kinase C in platelets of depressed patients. *Biol Psychiatry.* 1998;44:909-911.

Pandey GN, Dwivedi Y, Ren X, Rizavi HR, Roberts RC, Conley RR, Tamminga C. Altered expression and phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) in postmortem brain of suicide victims with or without depression. *J Psychiatry Res.* 2003;37:421-432.

Pandey GN, Dwivedi Y, Ren X, Rizavi HS, Mondal AC, Shukla PK, Conley RR. Brain region specific alterations in the protein and mRNA levels of protein kinase A subunits in the post-mortem brain of teenage suicide victims. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30:1548–1556.

Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Ren X, Conley RR. Decreased catalytic activity and expression of protein kinase C isozymes in teenage suicide victims: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61:685-693.

Pandey GN, Dwivedi Y, Sridhararao J, Ren X, Janicak PG, Sharma R. Protein kinase C and phospholipase C activity and expression of their specific isozymes is decreased and expression of MARCKS is increased in platelets of bipolar but not in unipolar patients. *Neuropsychopharmacology*. 2002;26:216-228.

Park MJ, Lee SK, Lima MA, Chung HS, Cho SI, Jang CG, Lee SM. Effect of alpha-tocopherol and deferoxamine on methamphetamine-induced neurotoxicity. *Brain Res*. 2006;1109:176-182.

Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci*. 2004;15(117):131-132.

Paton JJ, Belova MA, Morrison SE, Salzman CD. The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. *Nature*. 2006;439:865-870.

Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud*. 2010;7:15-25.

Pittenger C, Duman R. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33:88-109.

Pootrakul P, Breuer W, Sametband M, Sirankapracha P, Hershko C, Cabantchik ZI. Labile plasma iron (LPI) as an indicator of chelatable plasma redox activity in ironoverloaded beta-thalassemia/HbE patients treated with an oral chelator. *Blood*. 2004;104:1504-1510.

Ramakrishnan R, Kempuraj D, Prabhakaran K, Jayakumar AR, Devi RS, Suthanthirarajan N, Namasivayam A. A short-term diabetes induced changes of catecholamines and p38-MAPK in discrete areas of rat brain. *Life Sci*. 2005;77;1825-1835.

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.

Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361:1545-1564.

Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no Diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52(7):1096-1105.

Réus GZ, Abelaira HM, Leffa DD, Quevedo J. Cognitive dysfunction in depression: lessons learned from animal models. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2014;13:1860-70.

Réus GZ, Abelaira HM, Maciel AL, Dos Santos MA, Carlessi AS, Steckert AV, Ferreira GK, De Prá SD, Streck EL, Macêdo DS, Quevedo J. Minocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. *Metab Brain Dis.* 2015b;30:545-553.

Réus GZ, Carlessi AS, Titus SE, Abelaira HM, Ignácio ZM, da Luz JR, Matias BI, Bruchchen L, Florentino D, Vieira A, Petronilho F, Quevedo J. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *Dev Neurobiol.* 2015. (*in press*).

Réus GZ, Dos Santos MA, Abelaira HM, Titus SE, Carlessi AS, Matias BI, Bruchchen L, Florentino D, Vieira A, Petronilho F, Ceretta LB, Zugno AI, Quevedo J. Antioxidant treatment ameliorates experimental diabetes-induced depressive-like behavior and reduces oxidative stress in brain and pancreas. *Diabetes Metab Res Rev.* 2015. (*in press*)

Réus GZ, Nacif MP, Abelaira HM, Tomaz DB, dos Santos MA, Carlessi AS, da Luz JR, Gonçalves RC, Vuolo F, Dal-Pizzol F, Carvalho AF, Quevedo J. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. *Neurosci Lett.* 2015a;584:83-87.

Rocha FD, Teixeira VL, Pereira RC, Kaplan MA. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. *Rev Bras Farm* 2006;87(2):49-54.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-126.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414:799-806.

Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*. 1997;46(11):1853-1858.

Schaan BD. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003;47(6):654-662.

Schram M, Baan CA, Pouwer F. Depression and quality of life in patients with diabetes: a systematic review from the European. Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium. *Cur Diab Rev*. 2009;5:112-119.

Shelton RC, Hal Manier D, Lewis DA. Protein kinases A and C in post-mortem prefrontal cortex from persons with major depression and normal controls. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009a;12:1223-1332.

Shelton RC, Sanders-Bush E, Manier DH, Lewis DA. Elevated 5-HT 2a receptors in postmortem prefrontal cortex in major depression is associated with reduced activity of protein kinase A. *Neuroscience*. 2009;158:1406-1415.

Shelton RC. The molecular neurobiology of depression. *Psych Clin North Am*. 2007;30:1-11.

Shen CP, Tsimberg Y, Salvatore C, Meller E. Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neurosci*. 2004;20(5):36.

Singh NP McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-191.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. 3ª Ed. Barueri: GEN; 2009.

Szkudelski T. The Mechanism Of Alloxan And Streptozotocin Action In B Cells Of The Rat Pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-546.

Talarowska M, Galecki P, Maes M, Gardner A, Chamielec M, Orzechowska A, Bobinska K, Kowalczyk E. Malondialdehyde plasma concentration correlates with declarative and working memory in patients with recurrent depressive disorder. *Mol Biol Rep.* 2011;39:5359–5366.

Taxman DJ, Holley-Guthrie EA, Huang MT, Moore CB, Bergstralh DT, Allen IC, Lei Y, Gris D, Ting JP. The NLR adaptor ASC/PYCARD regulates DUSP10, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and chemokine induction independent of the inflammasome. *J Biol Chem.* 2011;286:19605–19616.

Taylor C, Fricker AD, Devi LA, Gomes I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cell Signal.* 2005;17:549-557.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-221.

Tsai ML, Huang HP, Hsu JD, Lai YR, Hsiao YP, Lu FJ, Chang HR. Topical N-acetylcysteine accelerates wound healing in vitro and in vivo via the PKC/Stat3 pathway. *Int J Mol Sci.* 2014;15(5):7563-7578.

Turek FW. From circadian rhythms to clock genes in depression. *Int Clin Psychopharmacol.* 2007;22:1-8.

Valvassori SS, Petronilho FC, Reus GZ, Steckert AV, Oliveira VB, Boeck CR, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Effect of n-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008;32:1064–1068.

Villela IV, Oliveira IM; Silva JDA, Henriques JAP. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mut Res.* 2006;605(1-2):78-86.

Wayhs CA, Manfredini V, Sitta A, Deon M, Ribas G, Vanzin C, Biancini G, Ferri M, Nin M, Barros HM, Vargas CR. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. *Metab Brain Dis.* 2010;25(3):297-304.

Wenham RM, Landt M, Easom RA. Glucose activates the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in isolated rat pancreatic islets. *J Biol Chem.* 1994; 269(7): 4947–Whitmer RA. Type 2 diabetes and risk of cognitive impairment and dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2007;7(5):373-380.

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(5):1047-1053.

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.

Yoshihiro Taniyama, Kathy K. Griendling. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension.* 2003;42:1075-1108.

Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF TrkB signaling in synapse maturation, plasticity and disease. *Dev Neurobiol.* 2010;70:304-322.

ANEXO

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecida pelo Ministério de Educação/Câmaras Proprietas de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 0102012

Professor:

João Luciano Quevedo

Título: ESTUDO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E MOLECULARES RELACIONADAS A DIABETES A PARTIR DE UM MODELO ANIMAL.

STUDY OF MOLECULAR AND BEHAVIORAL CHANGES RELATED TO DIABETES FROM AN ANIMAL MODEL.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas consultar a CEUA. ceua@unisc.br

Crusma, 11 de julho de 2012.

Patricia Fernanda Schmidt

Coordenadora da CEUA