

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Investigação do efeito periférico da insulina e do clonazepam sobre o estresse  
oxidativo em modelo animal experimental de diabetes e depressão

CARLOS ALBERTO YASIN WAYHS

PORTO ALEGRE, 2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Investigação do efeito periférico da insulina e do clonazepam sobre o estresse oxidativo em modelo animal experimental de diabetes e depressão**

Dissertação apresentada por **Carlos Alberto Yasin Wayhs** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dr. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, 2010.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr. Solange Cristina Garcia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr. Rosane Gomez  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof<sup>a</sup>. Dr. Fernanda Urruth Fontella  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

W359i Wayhs, Carlos Alberto Yasin  
Investigação do efeito periférico da insulina e do clonazepam sobre o estresse oxidativo em modelo animal experimental de diabetes e depressão / Carlos Alberto Yasin Wayhs. – Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xvii, 120 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Estresse oxidativo. 2. Diabetes. 3. Insulina. 4. Clonazepam. 5. Depressão. 6. Modelos animais de doenças. I. Vargas, Carmen Regla. II. Título.

CDU: 616-074.12

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (Laboratório 38) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Agradecimento especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), órgão financiador da bolsa de mestrado e de projeto de pesquisa para o desenvolvimento deste trabalho.



*“Dedico esta Dissertação a toda a  
minha família, em especial aos meus  
queridos pais, Carlos Alberto e Âmina,  
minha irmã, Sâmia, e meus avós,  
Bruno e Miréia Wayhs”.*





## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos avós, Dr. Bruno e Dra. Miréia Wayhs, pelo exemplo que são, por serem os pilares que fornecem toda a estrutura da nossa família. Ainda, por serem os meus maiores exemplos de profissionais da área da saúde, e pela presença constante em toda a minha vida.

Ao meu Pai, Carlos Alberto Simões Pires Wayhs, o maior incentivador para que eu realizasse esta jornada, por todo carinho, dedicação, aporte financeiro e, principalmente, por abdicar de inúmeros sonhos para que nada faltasse a mim e a minha irmã. Pelo prazer de poder ser filho e amigo ao mesmo tempo. Pelo companheirismo de sempre, em especial nesses últimos dois anos, em que pudemos estar mais tempo juntos em função do MBA.

À minha Mãe, Âmina Yasin Wayhs, exemplo de mãe, esposa, profissional, sempre responsável pela harmonia da casa, principalmente quando todos estavam fora. Por chamar para si a responsabilidade em cuidar de todos nós: meu Pai, minha irmã e eu. Pelo capricho como cuida dos nossos pertences. Também, pelo prazer de ser filho e amigo ao mesmo tempo, assim como pelo companheirismo. Por dizer que sou o “orgulho da mamãe e a alegria da casa”.

À minha irmã, Sâmia Yasin Wayhs, minha companheira em Porto Alegre até o início da residência. Estamos longe, mas somente na distância. Pela experiência de vida me passada, pelo crescimento pessoal intelectual proporcionado, muito em virtude de nossas controvérsias de cunho científico, em especial nos aspectos farmacológicos. Por me incentivar a iniciar a ser um pesquisador, através da iniciação científica. Por ser um exemplo de garra e determinação e, por isso, fazer nos lembrar sempre da Vó Miréia.

À minha orientadora, Profa. Dra. Carmen Regla Vargas, por apostar em mim, pela oportunidade, pelo aprendizado e, principalmente, pela disponibilidade, mesmo tendo tantos outros compromissos importantes. Por ser um exemplo de pessoa e de pesquisadora.

Às minhas queridas colegas de laboratório, que foram importantíssimas e essenciais para a realização deste trabalho: Profa. Dra. Vanusa, a qual domina todas as metodologias das técnicas de laboratório de cabeça; Profa. Angela Sitta, sempre disponível para ouvir minhas dúvidas e me ajudar explicar certos resultados, assim como a Dra. Marion Deon e a Profa. Dra. Alethéa Barschack. À Graziela S.

Ribas, por ser um exemplo de pesquisadora e pela sua emoção contagiante ao obtermos resultados inovadores em nossos experimentos. Às demais colegas de Pós-Graduação, Caroline Mescka, Letícia Filippon, Franciele Cipriani e, é claro, agradecimento especial as nossas bolsistas, Camila Vanzin e Giovana Biancini, que a partir de agora são nossas colegas de Pós-Graduação. Ainda, às bolsistas Diana Atik e Izabela Pereira.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Farmacologia da UFCSPA, em nome da Profa. Dra. Helena Barros, Departamento de Bioquímica da UFRGS e Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pelo apoio e estrutura para que esse trabalho fosse realizado.

Ao Prof. Dr. Paulo Saraiva, pela ajuda nas dosagens de insulina em seu laboratório e pela disponibilidade para discutir os resultados. Também, pelo exemplo de profissional e de professor que és.

Ao Maurício Nin, Marcelo Ferri e Mário, pelo auxílio fundamental nos experimentos animais.

À diretoria da Associação dos Farmacêuticos do Rio Grande do Sul, que são pessoas que representam e valorizam o profissional farmacêutico do Rio Grande do Sul.

Aos meus amigos e colegas, os que estiveram presentes, mas também os ausentes. Agradeço pelos momentos agradáveis e pelo crescimento a que me proporcionaram, principalmente nos aspectos lúdicos. Em especial, ao Ricardo Marques Nader, Rodrigo Fortunato, Max Kegler, Tiago Kriger, Serginho Dutra, Rafa Wayhs, Tiago Bonfada, Adriano Funck, e ainda, ao Jules Stucky, pela presença constante nesses dois últimos anos.

À minha mais do que colega e amiga, Kristiane Mariotti, colega desde a graduação até o final do mestrado, pela convivência próxima, pelos estudos em conjunto, por dividir as mesmas angústias e me ajudar a ter uma compreensão crítica, mas também engraçada das situações de nosso cotidiano. Por me acolher nos momentos difíceis e, principalmente, pelo exemplo de lealdade. Espero que continuemos da mesma maneira no Doutorado.

## RESUMO

Foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos ao teste de natação forçada (STZ) e o efeito do tratamento agudo com insulina (STZ-INS) e/ou clonazepam (STZ-CNZ e STZ-INS-CNZ) sobre este modelo animal experimental. O dano oxidativo às proteínas medido como conteúdo de grupamentos carbonilas no plasma foi significativamente maior no grupo STZ em comparação com os grupos STZ tratados e controle. Os níveis plasmáticos de malondialdeído foram significativamente aumentados nos grupos STZ, STZ-INS e STZ-CNZ quando comparados ao grupo controle e significativamente reduzidos nos grupos STZ-INS e STZ-INS-CNZ quando comparados aos ratos STZ, sendo que o grupo STZ-INS-CNZ apresentou níveis de malondialdeído significativamente menores quando comparado com o grupo STZ-INS. As atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase não apresentaram diferenças significativas entre todos os grupos de animais. Através do ensaio cometa, observou-se que o índice de dano ao DNA foi significativamente maior no grupo STZ quando comparado aos grupos STZ tratados e ao grupo controle. Além disso, observou-se uma reversão no índice de dano do grupo STZ-INS-CZP a níveis iguais aos do grupo controle. Estes resultados mostram que o dano oxidativo a proteínas e a lipídios, assim como o dano ao DNA ocorre neste modelo animal de diabetes/depressão e que o tratamento associado da insulina e do clonazepam é capaz de proteger contra este dano oxidativo neste modelo experimental.

**Palavras-chave:** Estresse Oxidativo, Diabetes, Depressão, Insulina, Clonazepam.



## ABSTRACT

We investigated oxidative stress parameters in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test (STZ) and evaluated the effect of insulin (STZ-INS) and/or clonazepam (STZ-CNZ and STZ-INS-CNZ) acute treatment on these animal model. Oxidative damage to proteins measured as carbonyl content in plasma was significantly increased in STZ group compared to STZ treated groups and controls. Malondialdehyde plasma levels were significantly increased in STZ, STZ-CNZ and STZ-INS groups when compared to control group and significantly reduced in STZ-INS and STZ-INS-CNZ groups when compared to STZ rats, being significantly reduced in STZ-INS-CNZ than STZ-INS group. The activities of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase showed no significant differences among all groups of animals. The DNA damage index evaluated by comet assay, was significantly higher in STZ rats when compared to all STZ treated and control groups. Furthermore, it was observed a reversion in damage index at level of controls in STZ-INS-CNZ animals. These findings showed that the protein, lipid and DNA damage occurs in this diabetes/depression animal model and that the associated treatment with insulin and clonazepam is capable to protect against oxidative damage in this experimental model.

**Key words:** Oxidative Stress; Diabetes; Depression; Insulin; Clonazepam.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT – Catalase

CNZ – Clonazepam

DALY – *Disability adjusted life years*

DM – *Diabetes Mellitus*

DNA – Ácido desoxirribonuclêico

DSM – *Diagnostics and statistical manual of mental disorders*

ERN – Espécie reativas do nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FDA – *Food and Drug administration*

FST – *Forced swimming test*

GABA – Ácido γ aminobutírico

GAD – Ácido glutâmico descarboxilase

GSH-Px – Glutathiona peroxidase

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MAO – Monoaminoxidase

MDA – Malondialdeído

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

SSRI – Inibidores da recaptação de serotonina

STZ – Estreptozotocina

YLDS – *Years lived with disability*





## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Estresse oxidativo.....	3
1.2 Diabetes.....	7
1.3 Depressão.....	11
1.4 Estresse oxidativo, diabetes, depressão.....	14
2 OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivos gerais .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
3 ARTIGO SUBMETIDO Nº 1.....	21
4 ARTIGO SUBMETIDO Nº 2.....	53
5 DISCUSSÃO GERAL.....	81
6 CONCLUSÕES.....	93
6.1 Conclusões específicas.....	95
6.2 Conclusão geral.....	96
7 PERSPECTIVAS .....	97
8 REFERÊNCIAS .....	101



## 1. INTRODUÇÃO

---



## 1.1) Estresse Oxidativo

Em essência, o termo estresse oxidativo refere-se a um grave desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. Sies (1991) definiu-o como um distúrbio no equilíbrio pró-oxidantes/antioxidantes, em favor dos primeiros, levando a danos potenciais (Figura 1). São produzidas, normalmente, durante o metabolismo celular aeróbico, várias substâncias eletricamente instáveis e potencialmente reativas (radicais livres) com moléculas biológicas capazes de causar oxidação e dano irreversível à célula. Nos organismos saudáveis, geralmente existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. Entretanto, situações patológicas podem causar o rompimento deste equilíbrio, seja através da diminuição das defesas antioxidantes, seja pelo aumento na produção de espécies reativas e/ou radicais livres, ou, até mesmo, através da combinação de ambas as situações, resultando na situação denominada estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

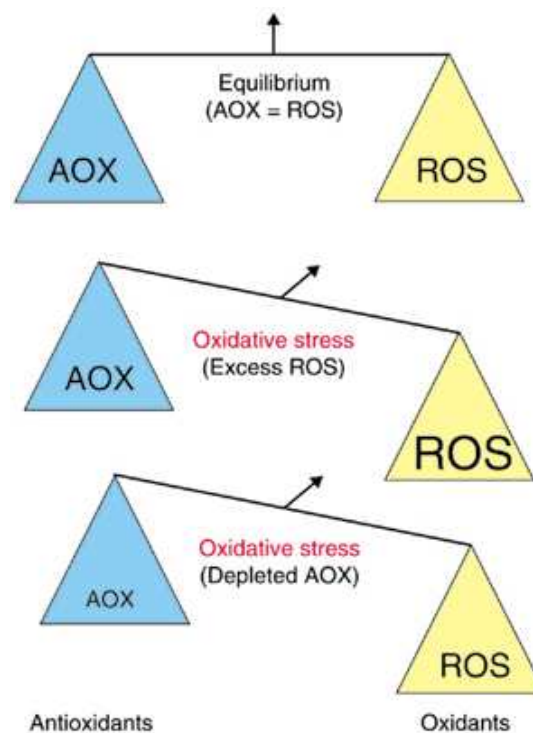


Figura 1: Estresse Oxidativo (SCANDALIOS, 2002).

Os radicais livres foram descobertos em materiais biológicos na década de 50 (COMMONER et al., 1954). Um radical livre é qualquer espécie capaz de ter existência independente (daí o termo livre) que contém um ou mais elétrons

desemparelhados. Um elétron desemparelhado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular por si só. Isto os torna moléculas ou átomos instáveis, extraordinariamente reativos e com uma enorme capacidade para combinar-se inespecificamente com diversas moléculas integrantes da estrutura celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Existem diversas fontes geradoras de radicais livres nos sistemas biológicos. Eles podem ser formados por diversos mecanismos, como a adição de um único elétron a um não radical e, ainda, através da quebra da ligação covalente quando um elétron do par vínculo permanece em cada átomo (HALLIWELL, 2006). Existem as espécies reativas de oxigênio (ERO), como por exemplo, o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e o ácido hipocloroso (HOCl), e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), como por exemplo, o óxido nítrico, o peroxinitrito ( $^{\bullet}OONO$ ) e o dióxido de nitrogênio (POON et al., 2004; HASNIS et al., 2007; CASH et al., 2007).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) não é um radical livre, mas pode reagir com o ânion superóxido e formar o radical hidroxila. O oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ) também não é um radical, mas pode sofrer um rearranjo de elétrons que o torna mais reativo, ficando no estado excitado, sendo que pode gerar luz química (quimioluminescência) quando muda do estado excitado para seu estado fundamental, reagindo com cadeias laterais de ácidos graxos polinsaturados dos lipídeos de membrana e, assim, formando peróxidos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Radicais livres e espécies reativas podem ser gerados endogenamente, a partir de subprodutos do metabolismo aeróbico, como por exemplo, o oxigênio, que, ao mesmo tempo, é necessário e tóxico aos organismos. Em organismos aeróbios o oxigênio é necessário para a respiração celular por ser aceptor final da cadeia transportadora de elétrons, sendo então reduzido à água. Nesse processo de oxirredução ocorre a formação de diversos subprodutos intermediários (ERO), os quais podem ocasionar dano a proteínas, lipídeos e ao DNA. Cabe salientar, que aproximadamente 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo o  $O_2^{\bullet-}$ . A partir deste, uma série de reações são passíveis de ocorrer, gerando compostos como o  $H_2O_2$  e o  $OH^{\bullet}$ , o mais reativo e danoso radical formado (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Além da redução do oxigênio na mitocôndria, as principais fontes endógenas responsáveis pela geração de ERO em uma célula são a

degradação de ácidos graxos nos peroxissomos, o complexo enzimático citocromo P450, o processo de fagocitose e a atividade combinada da xantina oxidase e xantina desidrogenase, que produzem  $O^{2-}$  e  $H_2O_2$ , respectivamente (BECKMAN e AMES, 1998).

Os radicais livres podem, também, advir de fontes exógenas, através da alimentação, em que alguns íons ingeridos, como por exemplo, o ferro e o cobre, podem promover a geração de peróxidos tanto nos alimentos quanto no organismo (VAN DYCK e ADAMS, 2003). Nesse contexto, pode-se destacar a possibilidade de ocorrência da reação de Fenton, na qual o  $Fe^{2+}$  reage com o  $H_2O_2$ , produzindo o radical hidroxila (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Outras fontes exógenas formadoras de radicais livres são a radiação gama e ultravioleta, alguns solventes orgânicos, pesticidas, radiação solar, micotoxinas, traumas, cigarro, ozônio, medicamentos, dentre outras (BIANCHI et al., 1999; CHIHUAILAF et al., 2002; VAN DYCK e ADAMS, 2003; HASNIS et al., 2007).

Diversas são as ações biológicas dos radicais livres e das espécies reativas, ocorrendo elas tanto em processos fisiológicos quanto em patológicos. Quando formadas em excesso, elas podem induzir lesões no DNA, incluindo oxidação de bases, quebras no DNA e formação de ligações cruzadas entre DNA e proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Podem induzir a peroxidação de lipídeos e diversos danos às proteínas, o que pode vir a produzir mutações e compostos citotóxicos como os aldeídos (SIES 1991; HALLIWELL e WHITEMAN 2004).

Para controlar o fluxo e a ação de radicais livres e espécies reativas, as células aeróbicas desenvolveram um sistema de defesa antioxidante, o qual envolve mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (AHMED, 2005). A Catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GSH-Px) são as principais enzimas que removem e protegem as células dos radicais livres (SADI et al., 2008) (Figura 2). Além disso, existem as defesas antioxidantes não enzimáticas, que englobam algumas vitaminas (vitamina E e alfa-tocoferol, ácido ascórbico), glutathiona reduzida (GSH), co-fatores (ácido úrico, bilirrubinas), flavonóides, hormônios, proteínas quelantes de metais (transferrina, ceruloplasmina, hemopexina) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

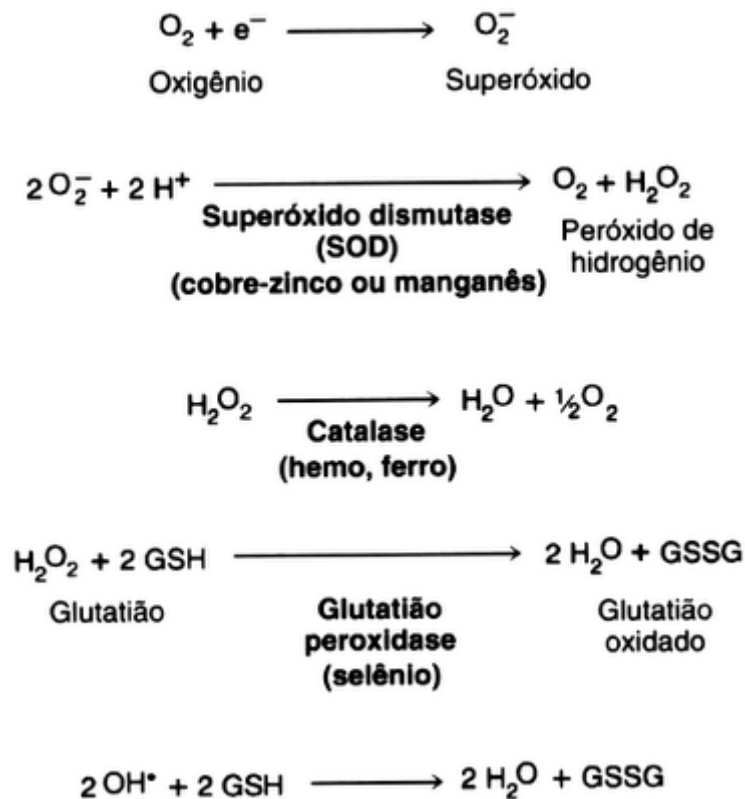


Figura 2: Reações das enzimas antioxidantes: SOD, CAT e GSH-Px.

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. Em condições normais, as ERO produzidas numa célula reagem com as defesas antioxidantes enzimáticas e/ou não-enzimáticas. Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a formação dos compostos oxidantes e antioxidantes do organismo, estabelece-se uma condição denominada de estresse oxidativo, onde os radicais livres e/ou espécies reativas em excesso começam a produzir danos às macromoléculas biológicas como lipídeos (lipoperoxidação), proteínas e DNA (BECKMAN e AMES, 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo está envolvido com o mecanismo de instalação de diversas doenças neurodegenerativas, crônico-inflamatórias, vasculares, genéticas e em vários tipos de câncer. Dentre elas, pode-se destacar: encefalopatia diabética, doença de Parkinson e de Alzheimer, esclerose múltipla, distrofia muscular, catarata e retinopatias, aterosclerose, infarto do miocárdio, enfisema pulmonar, cirrose hepática, fenilcetonúria, acidemias metilmalônica, propiônica e glutárica, doença do xarope do bordo, adrenoleucodistrofia (FONTELLA et al., 2000; DRÖGE, 2002;



HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; BARSCHACK et al., 2008; DEON et al., 2007; SITTA et al., 2009; MONNIER et al., 2009).

Evidências tanto em estudos experimentais quanto clínicos vem sugerindo que o estresse oxidativo e as espécies reativas desempenham um papel importante no desenvolvimento das complicações do diabetes (IMAEDA et al., 2001; MARITIM et al., 2003; MONNIER et al., 2009), uma vez que a hiperglicemia gera níveis elevados de radicais livres pela oxidação de glicose (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2004; RAMAKRISHNA e JAILKHANI, 2007; SADI et al., 2008; PAN et al., 2008). Estes radicais livres podem causar danos de oxidação, atacando as macromoléculas como lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (STETINA et al., 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

## 1.2) Diabetes

*Diabetes Mellitus* (DM) consiste num grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia secundária a defeitos na secreção da insulina, na ação da insulina ou em ambos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010). O DM é uma das maiores causas de morbimortalidade em todo o mundo, atingindo, após a década de 50, proporções epidêmicas em diversas localidades (ZIMMET et al., 2001). Isso demonstra que o DM, principalmente em função das suas complicações a longo prazo, configura-se num importante caso de saúde pública (KUHAD e CHOPRA, 2009).

Segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde, a cada ano o Diabetes causa cerca de 5% de todas as mortes no mundo. Atualmente, cerca de 80% das pessoas com diabetes vivem em países de baixa e média renda, sendo que a maioria delas é de meia-idade (45-64 anos). A estimativa do número de mortes em função do Diabetes é de aumentar em mais de 50% nos próximos 10 anos caso não haja uma intervenção urgente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010a).

No Brasil, a prevalência de Diabetes no ano 2000 era de aproximadamente quatro milhões e meio de pessoas, sendo que a estimativa para o ano de 2025 é ainda mais alarmante, podendo ultrapassar dos onze milhões de indivíduos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010b). Obtendo-se como base a matriz de

cálculo para estimativa da população nacional, estadual ou municipal, tomando-se como exemplo a população total brasileira de 184 milhões de habitantes, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) referentes a dezembro de 2007, pode-se fazer a estimativa das prevalências do Diabetes nas três faixas etárias da população brasileira (Figura 3): abaixo de 30 anos, o que corresponde aproximadamente 58% da população, apresenta prevalência de Diabetes de 0,1%. Entre 30 e 69 anos, aproximadamente 38% da população, prevalência de 12%, e prevalência de 20% na faixa etária acima de 69 anos, o que representa aproximadamente 4% da população brasileira. Ainda, de posse desses dados, cabe ressaltar que a estimativa do total de portadores de Diabetes no Brasil está em aproximadamente 6% da população total (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010). Nesse contexto, cabe salientar que a estimativa da Organização Mundial da Saúde para o ano de 2025 já foi praticamente alcançada no ano de 2007, corroborando para a afirmação de que a pandemia do Diabetes realmente configura-se num importante caso de saúde pública (KUHAD e CHOPRA, 2009).



Figura 3: Estimativa das prevalências do Diabetes nas três faixas etárias da população brasileira (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

*Diabetes Mellitus* pode ser classificado em Diabetes gestacional, Diabetes tipo 1 e Diabetes tipo 2. O *Diabetes Mellitus* tipo 1, também chamado de auto-imune, compreende aproximadamente apenas 5 a 10% dos casos de Diabetes, resultado

de uma destruição auto-imune das células  $\beta$  do pâncreas. Os marcadores bioquímicos da destruição imunológica das células  $\beta$  do pâncreas incluem a presença de anticorpos anti-ilhotas, anticorpos anti-insulina, auto-anticorpos anti-GAD (ácido glutâmico descarboxilase) e auto-anticorpos para a tirosina fosfatases IA-2 e IA-2 $\beta$ . Um ou geralmente mais de um desses auto-anticorpos estão presentes em cerca de 85 a 90% dos indivíduos quando a hiperglicemia de jejum é avaliada. Neste tipo de Diabetes, a taxa de destruição das células  $\beta$  é bastante variável, sendo rápida em alguns indivíduos (principalmente bebês e crianças) e lenta em outras (principalmente em adultos). Alguns pacientes, especialmente crianças e adolescentes, podem apresentar cetoacidose diabética como primeira manifestação da doença. Outros tem modesta hiperglicemia de jejum, o que pode mudar rapidamente para uma hiperglicemia grave e/ou cetoacidose na presença de infecção ou alguma outra forma de estresse. Ainda, especialmente os adultos, podem manter a função residual das células  $\beta$  por muitos anos, o que é suficiente para evitar a cetoacidose, embora essas pessoas eventualmente tornam-se dependentes de insulina para a sobrevivência. No último estágio da doença, há pouca ou nenhuma secreção de insulina, o que pode ser detectado através da dosagem de peptídeo C em baixos níveis ou, até mesmo, em níveis indetectáveis no plasma. Diabetes tipo 1 ocorre geralmente na infância e na adolescência, mas pode ocorrer em qualquer idade (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

O *Diabetes Mellitus* tipo 2 compreende aproximadamente 90 a 95% dos casos de Diabetes, abrangendo os indivíduos que tem resistência e relativa resistência (não absoluta) à insulina. Ao menos inicialmente, e muitas vezes ao longo da vida, estes indivíduos não precisam de tratamento com insulina para sobreviver. Há muitas causas diferentes desta forma de diabetes. Embora a etiologia específica não seja completamente conhecida até o momento, a destruição auto-imune das células  $\beta$  do pâncreas não ocorre. A maioria dos pacientes com este tipo de diabetes são obesos e a obesidade em si provoca algum grau de resistência à insulina. Pacientes que não são obesos por critérios tradicionais de peso podem ter um percentual maior de gordura corporal distribuída predominantemente na região abdominal. Raramente ocorre cetoacidose espontaneamente neste tipo de diabetes, e quando ocorre, geralmente surge em associação com o estresse de outra doença, como infecção. Esta forma de diabetes frequentemente não é diagnosticada por muitos anos, porque a hiperglicemia desenvolve-se gradualmente e, em fases iniciais da

doença, os sintomas clínicos não são evidentes podendo passar despercebidos pelos pacientes. No entanto, esses pacientes estão com risco aumentado de desenvolver complicações micro e macrovasculares. Os doentes com este tipo de diabetes podem ter níveis de insulina normais ou elevados, porém, a secreção de insulina é deficiente nestes pacientes e é insuficiente para compensar a resistência à insulina. A resistência à insulina pode melhorar com redução de peso e/ou tratamento farmacológico da hiperglicemia, mas é raro que se normalize. O risco de desenvolver o diabetes tipo 2 aumenta com a idade, obesidade e falta de atividade física. Ocorre mais frequentemente em mulheres com diabetes gestacional prévio e em indivíduos com hipertensão ou dislipidemia, sendo que sua frequência varia em diferentes subgrupos raciais e étnicos. É muitas vezes associado a uma forte predisposição genética, mais do que a forma auto-imune do diabetes tipo 1. No entanto, a genética desta forma de diabetes é extremamente complexa e ainda não está claramente definida (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

A indução do Diabetes em animais experimentais é muito comum pela administração de altas doses de drogas betacitotóxicas, como por exemplo, a Estreptozotocina (STZ). Desse modo, modelos animais vem sendo largamente utilizados para melhor elucidar a fisiopatologia do diabetes. Nesse contexto, o modelo experimental de diabetes induzido por estreptozotocina é reconhecido como um dos mais utilizados em todo o mundo (SZKUDELSKI, 2001).

O controle dos níveis de glicemia é de extrema importância no tratamento de pacientes diabéticos. Nesse contexto, o tratamento farmacológico com insulina é essencial para pacientes diabéticos do tipo 1 e, ainda, para pacientes diabéticos do tipo 2 que apresentam resistência à insulina. A insulina (Figura 4) é um hormônio polipeptídico sintetizado pelas células beta-pancreáticas, as quais são verdadeiros sensores da concentração plasmática de glicose. A insulina pode ser classificada quanto a sua origem (bovina, suína e humana), forma de apresentação e tempo de ação (regular ou simples, de ação rápida; NPH, de ação intermediária; de ação lenta; de ação ultra-lenta; misturas, como NPH e regular; e ainda, análogos da insulina, como lispro, aspartat e glargina) (DAVIS, 2006).



Figura 4: Estrutura da Insulina.

O mecanismo de ação da insulina envolve a sua ligação a receptores de membrana denominados de receptores de insulina, os quais, quando ligados à insulina, desencadeiam uma série de reações dentro da célula (cascata de sinalização intracelular). Esse evento faz com que haja a ativação de vesículas contendo transportadores de glicose (GLUT 4). Quando ativadas, essas vesículas são transportadas para a membrana plasmática da célula e esse conjunto de transportadores de glicose culmina com o aumento na permeabilidade da célula à glicose (DAVIS, 2006).

### 1.3) Depressão

A depressão é um transtorno mental comum cujas manifestações clínicas incluem: humor deprimido, perda de interesse ou prazer, sentimentos de culpa e baixa auto-estima, distúrbios do sono ou apetite, baixa energia e baixa capacidade de concentração. Estes problemas podem tornar-se crônicos ou recorrentes levando a prejuízos substanciais na capacidade das pessoas em realizar suas responsabilidades diárias. Em alguns casos, a depressão pode levar ao suicídio, uma fatalidade trágica a qual está associada à perda de cerca de 850.000 mil vidas a cada ano. A depressão é a principal causa de incapacidade medida pelo YLDs (*Years Lived with Disability*) e o quarto maior contribuinte do DALY (*Disability Adjusted Life Years*). Até o ano de 2020, a depressão é projetada para alcançar o segundo lugar do ranking DALY, que é calculado para todas as idades, ambos os sexos. Hoje, a depressão já é a segunda do ranking DALY na faixa etária 15-44 anos para ambos os sexos. Segundo dados recentes da Organização Mundial da Saúde, cerca de 121 milhões de pessoas estão acometidas com depressão em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010c).

O conceito de depressão foi introduzido há cerca de 30 anos atrás no DSM-III (*Diagnosics and Statistical Manual of Mental Disorders – third edition*). O critério subsequente, encontrado no DSM-IV, difere apenas levemente do original (PARKER e BROTHIE, 2009). Sendo assim, de acordo com o DSM – IV, a depressão clínica pode ser observada tanto na Depressão Maior, quanto no distúrbio bipolar. A característica essencial de um episódio depressivo maior é um período mínimo de duas semanas, durante as quais há um humor deprimido, ou perda de interesse e prazer por quase todas as atividades (anedonia). Podendo apresentar alterações no apetite ou peso, sono e atividade psicomotora, diminuição da energia, sentimentos de desvalia ou culpa, dificuldade para pensar, concentrar-se ou tomar decisões, além de pensamentos recorrentes sobre morte ou ideação suicida, planos ou tentativas de suicídio. Porém, um diagnóstico de episódio depressivo maior somente será definido como tal quando o curso clínico seja caracterizado por um ou mais episódios depressivos maiores, sem história de episódios maníacos, mistos ou hipomaníacos, ainda que não seja explicado por outros fatores como induzido por substâncias (drogas de abuso, medicamentos, toxinas), transtorno delirante ou transtorno psicótico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000).

Diversos fatores intrínsecos as desordens do humor já estão bem fundamentados: fisiológicos, psicológicos e sócio-culturais. Certos sistemas de neurotransmissores, como o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), serotonina, noradrenalina, e dopamina, são implicados na etiologia da depressão, sendo que suas reais participações na patofisiologia da depressão podem ser estudadas indiretamente através da pesquisa com fármacos agonistas ou antagonistas destes sistemas. De maneira geral, o que atualmente se compreende sobre a patofisiologia da depressão está baseado na farmacologia dos agentes terapêuticos utilizados (KALIA, 2005).

O tratamento da depressão baseia-se em um grupo variado de agentes terapêuticos. Dentre esses, podemos citar os inibidores da captação das monoaminas (antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptção de 5-HT e outros), inibidores da monoamino oxidase (MAO) e antidepressivos atípicos (RANG et al., 2003).

Mais recentemente, outros agentes vem sendo estudados por suas ações em sistemas de neurotransmissão, que até então não eram considerados relacionados à

depressão, como os neurotransmissores aminoácidos. O glutamato e o GABA são os principais neurotransmissores do SNC com função excitatória e inibitória, respectivamente (PETROFF, 2002). Existem evidências de que alterações em ambos sistemas destes neurotransmissores podem contribuir para a patofisiologia da depressão (KRYSTAL et al., 2002; CRYAN e KAUPMANN, 2005), contudo o sistema GABAérgico vem sendo cada vez mais estudado em relação a esta doença (LLOYD et al., 1989; SHIAH e YATHAM, 1998; BRAMBILLA et al., 2003; TUNNICLIFF e MALATYNSKA, 2003).

Através de ensaios clínicos, foi verificado que os níveis plasmáticos de GABA encontravam-se diminuídos em pacientes com desordem depressiva (PETTY et al., 1992), sendo que estes níveis plasmáticos estão diretamente relacionados a concentrações de GABA nos espaços extracelulares cerebrais e no fluído cerebrospinal (PETTY et al., 1993). Já a severidade da depressão está inversamente relacionada com a concentração de GABA no fluído cerebrospinal (GERBER e HARE, 1981).

Estudos com modelos animais mostram que há uma correlação inversa entre os níveis de GABA extracelulares e o comportamento tipo depressivo no teste de natação forçada, e que a concentração de GABA no estriado de ratos tratados com antidepressivos encontra-se aumentada (PARENT et al., 2002; GOMEZ e BARROS, 2003). Nesse contexto, ratos diabéticos apresentaram níveis diminuídos de GABA durante o teste da natação forçada e, ainda, apresentaram tempo de imobilidade aumentado quando comparado aos ratos do grupo controle, sugerindo um comportamento do tipo depressivo (GOMEZ et al., 2003; HAESER et al., 2007). Ainda, o clonazepam mostrou-se capaz de reverter este tempo de imobilidade em ratos diabéticos por STZ submetidos ao teste de natação forçada, mostrando ter propriedades antidepressivas (GOMEZ e BARROS, 2000; HAESER et al., 2007).

O clonazepam (Figura 5), um derivado 7-nitro-benzodiazepínico, é um benzodiazepínico que atua de modo seletivo sobre os receptores A do GABA, que mediam a transmissão sináptica inibitória rápida, através do sistema nervoso central (SNC). Os benzodiazepínicos potencializam a resposta ao GABA, por facilitarem a abertura dos canais de cloreto ativados pelo GABA. Eles se ligam de modo específico em um sítio regulador do receptor, distinto do sítio ligante de GABA, e agem de modo alostérico, aumentando a afinidade do GABA para o receptor. Dentre as suas vantagens, pode-se destacar a presença de apenas um metabólito ativo, a

sua menor toxicidade e, ainda, o fato de atuar somente em receptores centrais. Inicialmente o uso do clonazepam foi aprovado pelo FDA como antiepilético, embora, atualmente o seu uso mais pronunciado seja como ansiolítico (RANG et al., 2003). Entretanto, como abordado anteriormente, tem sido relatado alguns estudos avaliando uma possível atividade antidepressiva deste benzodiazepínico.

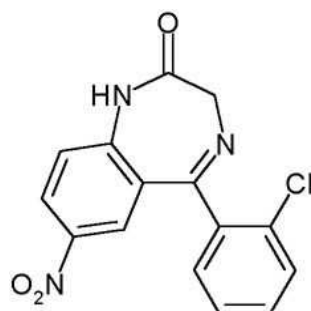


Figura 5: Estrutura do Clonazepam.

#### 1.4) Estresse Oxidativo, Diabetes e Depressão

Evidências de estudos transversais e prospectivos sugerem que os sintomas depressivos influenciam negativamente o metabolismo da glicose (MCCAFFERY et al., 2003; SUAREZ, 2006). Embora existam evidências conflitantes que relacionam sintomas depressivos com o controle da glicemia em pacientes com diabetes (VAN TILBURG et al., 2007), dados consistentes reforçam a relação de sintomas depressivos ao risco de desenvolver diabetes (CARNETHON et al., 2003; KAWAKAMI et al., 1999; EVERSON-ROSE et al., 2004; GOLDEN et al., 2008; SHEHATAH et al., 2009).

O estresse oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento do diabetes e nas suas complicações (IMAEDA et al., 2001; WIERNSPERGER, 2003; MARITIM et al., 2003; MONNIER et al., 2009). A hiperglicemia induz uma produção aumentada de radicais livres de oxigênio e conseqüentemente aumenta a oxidação de proteínas e lipídeos. Uma significativa diferença na concentração do status antioxidante total no plasma é observada em pacientes diabéticos dependentes de insulina, sugerindo que o Diabetes é um estado metabólico de oxidação-redução alterado, e é conveniente a intervenção terapêutica com o uso de antioxidantes (RAMAKRISHNA e JAILKHANI, 2007).



O cérebro tem baixa concentração de enzimas antioxidantes e alta concentração de conteúdo lipídico, com grandes quantidades de ácidos graxos insaturados e catecolaminas, os quais são substratos suscetíveis ao ataque pelas espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Várias doenças neurológicas nas quais parece haver envolvimento de radicais livres em sua fisiopatologia estão descritas, dentre elas a encefalopatia diabética e a depressão (REZNICK e PACKER, 1993; PRZEDBORSKI et al., 1996; BEN-MENACHEM et al., 2000; BIESSELS et al., 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; MONNIER et al., 2009).

Distúrbios vasculares e metabólicos induzidos pelo diabetes geram o desenvolvimento gradual de alterações no cérebro, o que pode ser comprovado por alterações estruturais e eletrofisiológicas e comprometimento do funcionamento cognitivo (ARTOLA, 2008). A disfunção cognitiva dos indivíduos diabéticos foi inicialmente descrita no início do século XX (MILES e ROOT, 1922) e, desse modo, vários estudos em indivíduos diabéticos descrevem alterações neuropsicológicas e neurocomportamentais nesses pacientes (STRACHAN et al., 1997; STEWARD e LIOLITSA, 1999), sugerindo que a encefalopatia diabética pode ser reconhecida como uma das complicações do diabetes (BIESSELS et al., 2002; SIMA et al., 2004). Ainda, manifestações psiquiátricas parecem acompanhar esta encefalopatia já que a prevalência da depressão é comprovadamente maior em diabéticos, quando comparado com a população não diabética (GOLDEN et al., 2008; SHEHATAH et al., 2009).

Modelos animais de diabetes e de comportamento do tipo depressivo, como o de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e como o teste de natação forçada (FST), respectivamente, são extremamente úteis para a compreensão e o esclarecimento das alterações neurais e comportamentais subjacentes à encefalopatia diabética e aos mecanismos relacionados à depressão ligada ao diabetes e ao declínio cognitivo. Estudos anteriores com animais reproduziram estas alterações no comportamento do tipo depressivo, e o tempo de duração da imobilidade no FST, foi maior em animais diabéticos quando comparado aos animais não-diabéticos (GOMEZ e BARROS, 2000). O tratamento com insulina reverteu a imobilidade prolongada (HILAKIVI-CLARKE et al., 1990) e impediu o dano neuronal no córtex de ratos diabéticos induzidos por STZ (GUYOT et al., 2001), proporcionando evidências adicionais para uma associação entre as alterações

comportamentais e o diabetes. Além disso, verificou-se que a insulina afeta o transporte sináptico do glutamato e do GABA sob condições de estresse oxidativo (DUARTE et al., 2004), e o clonazepam, um modulador positivo dos receptores GABA<sub>A</sub>, reverte o tempo de imobilidade de ratos diabéticos no FST, mostrando um efeito antidepressivo nestes animais (RAJTAR et al., 2002; HAESER et al., 2007).

Tendo em vista que o estresse oxidativo está envolvido na fisiopatologia do diabetes e da depressão; que a encefalopatia diabética é reconhecida como uma das complicações do diabetes; que parece haver envolvimento de radicais livres na encefalopatia diabética e na depressão; que a hiperglicemia está associada ao aumento do estresse oxidativo; que o tratamento com insulina previne a variação comportamental (depressão) de ratos diabéticos; que o tratamento com clonazepam reverte o comportamento do tipo depressivo em ratos; que a insulina parece diminuir o estresse oxidativo, assim como o clonazepam; este trabalho propõe avaliar o efeito da insulina e do clonazepam sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em ratos diabéticos submetidos a um modelo experimental de depressão, o teste de natação forçada.

## 2. OBJETIVOS

---



## **2.1) Objetivo Geral**

Avaliar o estresse oxidativo em modelo animal experimental de diabetes e depressão, verificando o efeito da insulina e do clonazepam.

## **2.2) Objetivos Específicos**

2.2.1) Avaliar o estresse oxidativo (dano a proteínas, lipídeos e DNA) a partir do sangue de ratos diabéticos submetidos ao teste de natação forçada tratados ou não com insulina e/ou clonazepam através dos seguintes parâmetros:

- a) Determinação do conteúdo de grupamentos carbonilas em plasma;
- b) Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) em plasma;
- c) Medidas das atividades enzimáticas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase) em eritrócitos;
- d) Ensaio cometa em leucócitos.

2.2.2) Avaliar os parâmetros comportamentais de ratos diabéticos submetidos ao teste de natação forçada tratados ou não com insulina e/ou clonazepam.

2.2.3) Correlacionar os parâmetros de estresse oxidativo com a glicemia dos animais submetidos ao modelo experimental de diabetes e depressão tratados ou não com insulina e/ou clonazepam.



### **3. ARTIGO SUBMETIDO Nº 1**

**Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats  
submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect**

**Metabolic Brain Disease**

**JCR: 1.825**

**Manuscript**

**Data submetida: 18/02/2010**

---





**Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect**

Carlos Alberto Yasin Wayhs<sup>1,2\*</sup>; Vanusa Manfredini<sup>1,2</sup>; Angela Sitta<sup>2,3</sup>; Marion Deon<sup>2</sup>; Graziela Ribas<sup>1,2</sup>; Camila Vanzin<sup>2</sup>; Giovana Biancini<sup>2</sup>; Marcelo Ferri<sup>4</sup>; Maurício Nin<sup>4</sup>; Helena Maria Tannhauser Barros<sup>4</sup>; Carmen Regla Vargas<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Farmacologia, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

---

**\* Corresponding authors:**

Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90.035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: +55 51 33598011

Fax: +55 51 33598010

E-mail address: [crvargas@hcpa.ufrgs.br](mailto:crvargas@hcpa.ufrgs.br) (Carmen Regla Vargas)

[manowayhs@yahoo.com.br](mailto:manowayhs@yahoo.com.br) (Carlos Alberto Yasin Wayhs)

## **Abstract**

Diabetes may modify central nervous system functions and is associated with moderate cognitive deficits and changes in the brain, a condition that may be referred to as diabetic encephalopathy. The prevalence of depression in diabetic patients is higher than in the general population, and clonazepam is being used to treat this complication. Oxidative stress may play a role in the development of diabetes complications. We investigated oxidative stress parameters in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test (STZ) and evaluated the effect of insulin (STZ-INS) and/or clonazepam (STZ-CNZ and STZ-INS-CNZ) acute treatment on these animal model. Oxidative damage to proteins measured as carbonyl content in plasma was significantly increased in STZ group compared to STZ treated groups. Malondialdehyde plasma levels were significantly reduced in STZ-INS and STZ-INS-CNZ groups when compared to STZ rats, being significantly reduced in STZ-INS-CNZ than STZ-INS rats. The activities of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase showed no significant differences among all groups of animals. These findings showed that protein and lipid damage occurs in this diabetes/depression animal model and that the associated treatment of insulin and clonazepam is capable to protect against oxidative damage in this experimental model.

**Key words:** Oxidative Stress; Diabetes; Insulin; Clonazepam; Forced Swimming Test.

## **Introduction**

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects on insulin secretion, insulin action, or both (American Diabetes Association 2009). Diabetic pandemic is a major cause of morbidity and mortality worldwide, with diabetic complications being a very important public health issue (Kuhad and Chopra 2009). The vast majority of diabetic patients develop serious chronic complications over time in target organ-specific, like eyes, kidneys, nerves, heart, and blood vessels (American Diabetes Association 2009). Besides, the central nervous system is also included, since there are increasing evidences that both type 1 and type 2 diabetes can lead to clinically relevant end-organ damages to the brain (Artola 2008).

Diabetes-induced metabolic and vascular disturbances produce gradually developing alterations to the brain that may present themselves by electrophysiological and structural changes and impairment of cognitive functioning (Artola 2008). Since the early 20<sup>th</sup> century the cognitive dysfunction of diabetic subjects has been recognized (Miles and Root 1922) and several studies of diabetic subjects have described neuropsychological and neurobehavioral changes (Strachan et al. 1997; Steward and Liolitsa 1999), suggesting that diabetic encephalopathy could be recognized as a complication of diabetes (Biessels et al. 2002; Sima et al. 2004). In this context, it is important to emphasize that the prevalence of depression in diabetic patients is higher than in general population and CNZ is being used to treat this patients (Morishita, 2009). Evidence from cross-sectional and prospective studies suggests that depressive symptoms negatively influence glucose metabolism (Mccaffery et al. 2003; Suarez 2006). Hormonal abnormalities associated with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis have been associated with depression, including hypercortisolism. It has been hypothesized that depression may be associated with insulin resistance secondary to

hypercortisolism, based on the effect of elevated plasma glucocorticoid levels to decrease insulin sensitivity (Tsigos and Chrousos 2002; Vogelzangs et al. 2007).

Experimental animal models of diabetes and depression-like behavioral, such as streptozotocin-induced diabetic rats and the forced swimming test (FST), respectively, can be useful by understanding the underlying neural and behavioral changes that mediate the diabetic encephalopathy and the mechanisms for diabetes-related depression and cognitive decline. Previous animal studies have been demonstrating these depression-like behavioral changes, since the duration of immobility time in the FST is longer in diabetic animals when compared to nondiabetic animals (Gomez and Barros 2000). Insulin treatment reversed the prolonged immobility (Hilakivi-Clarke et al. 1990) and prevented the neuronal damage in cortex of streptozotocin-induced diabetic rats (Guyot et al. 2001). Also, it was verified that insulin affects synaptosomal GABA and glutamate transport under oxidative stress conditions (Duarte et al. 2004) and clonazepam (CNZ), a positive GABA<sub>A</sub> receptor modulator, reverses the longer immobility in the FST of diabetic rats, showing an antidepressant effect in these animals (Haeser et al. 2007). Otherwise, Rajtar et al. (2002) verified that clonazepam exerted an *in vitro* inhibitory effect on reactive oxygen species produced by formyl methionyl leucyl phenylalanine stimulated neutrophils, suggesting that CNZ may down-regulate platelet activation and release some proinflammatory mediator by stimulated neutrophils.

Oxidative stress represents the imbalance between enhanced generation of reactive species, like reactive oxygen species (ROS), and low cellular content of antioxidants (Halliwell and Whiteman 2004). There are increasing evidences, both in experimental and clinical studies, suggesting that oxidative stress (Maritim et al. 2003) and reactive oxygen species (ROS) play an important role in the development of diabetes complications (Imaeda et al. 2001), since hyperglycemia generates abnormally high levels of free radicals by autoxidation of glucose (Bonfont-Rousselot et al. 2004). These free radicals can cause

oxidation injury by attacking macromolecules like lipids, carbohydrates, proteins and nucleic acids (Sies 1991; Halliwell and Whiteman 2004).

The present work aimed to investigate protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test and evaluates the effect of insulin and/or clonazepam acute treatment in these animals. Therefore, oxidative stress parameters such as plasma carbonyl content and malondialdehyde measurement, as well as the activities of the antioxidants enzymes catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes were evaluated.

## Methods

### Animals

Male Wistar rats ( $250 \pm 50$ g) were obtained from the Animal House of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). The animals were housed in groups of four per polypropylene cage. Food and water were available *ad libitum*, except when otherwise stated and the animals were maintained in a temperature-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) under a light–dark cycle (7:00 a.m.–7:00 p.m.). The animals were divided in five groups: Controls; Diabetics (STZ); Diabetics treated with insulin (STZ-INS); Diabetics treated with clonazepam (STZ-CNZ); Diabetics treated with insulin plus clonazepam (STZ-INS-CNZ). All groups were submitted to Forced Swimming Test (FST) plus Streptozotocin (STZ), except control group that was not submitted to STZ. All *in vivo* experiments followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of UFCSPA (08404). All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

### Reagents

All chemicals were of PA purity and purchased from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO).

### Drugs

Insulin (4 IU/mL; Humulin®, Lilly, USA) was prepared in saline, CNZ (0.25 mg/mL; Rivotril®, Roche, Brazil) was prepared in saline with Tween 0.05% (v.v) and Streptozotocin (STZ) – Sigma, St. Louis, MO, USA – 60 mg/mL was prepared in citrate buffer (pH 4.3). All solutions were prepared immediately before I.P. administration.

## Diabetes induction

Diabetes was induced by a single I.P. dose of STZ 60 mg/kg as already described (Gomez and Barros 2000). Increased blood glucose levels ( $\geq 250$  mg/dL) of the STZ group rats were confirmed with a glucometer (Accu Chek Aviva, Roche, Germany) after 72 h to confirm the hyperglycemic status. Nondiabetic control rats received intraperitoneal injections of saline (1mL/kg) and were also submitted to blood glucose measurement.

## Forced swimming test (FST)

After 21 days of diabetes induction by a single I.P. dose of STZ 60 mg/kg, animals were submitted to the forced swimming test (Porsolt et al. 1977; Sanvitto et al. 1992). In the first day, the animals were introduced for 15 min in aquarium (22×22×35 cm) with 27 cm of height of water (temperature of 24–26 °C), 24 h before the test. Soon after, the rats were dry with towels and were administered with the first dose of 4 IU/kg of insulin, 0.25 mg/kg of CNZ, insulin plus CNZ at the same doses, or 1 ml/kg of saline, as each group, corresponding the dose 24 h before the test (Porsolt et al. 1977). Before the swimming test the animals received repeated dosing of the same treatments 5 h and 1 h before being submitted again to the forced swimming test. The behavioral experiments were performed between 8 h and 18 h. The FST session was videotape recorder for further analysis.

## Blood sample collection

Thirty minutes after the FST, animals were sacrificed by decapitation and whole blood samples were collected under sterile conditions in heparinized vials. Whole blood was centrifuged at 1,000 ×g, plasma was removed by aspiration and frozen at –80 °C until determinations. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (sodium

chloride 0.153 M). Lysates were prepared by addition of 100  $\mu$ L of washed erythrocytes to 1 mL of distilled water and frozen at  $-80$  °C until determination of the antioxidant enzyme activities. For antioxidant enzyme activity determination, erythrocytes were frozen and thawed three times, centrifuged at  $13,500 \times g$  for 10 min. The supernatant was diluted to approximately 0.5 mg/mL of protein.

#### Carbonyl content

Protein carbonyl formation was measured spectrophotometrically according to Levine (1990). One hundred microlitre of plasma was treated with 1 mL of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) dissolved in 2.5N HCl or with 2.5N HCl (blank) and left in the dark for 90 min. Samples were then precipitated with 500  $\mu$ L 20% TCA and centrifuged for 5 min at  $10,000 \times g$ . The pellet was then washed with 1 mL ethanol:ethyl acetate (1:1, v/v) and dissolved in 200  $\mu$ L 6M guanidine prepared in 2.5N HCl at 37 °C for 5 min. The difference between the DNPH-treated and HCl-treated samples (blank) was used to calculate the carbonyl content determined at 370 nm. The results were calculated as nmol of carbonyl groups/mg of protein.

#### Malondialdehyde measurement (MDA)

MDA was measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) following method described by Karatepe (2004). One hundred microlitre of 0.1 M perchloric acid and 1 mL of distilled water were added to a 100  $\mu$ L aliquot portion of plasma. Addition of perchloric acid was necessary to precipitate proteins and release the MDA bound to the amino groups of proteins and other amino compounds. The samples then were centrifugated at  $1,500 \times g$  for 5 min and used for HPLC analysis. The mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)-methanol, the column used was Supelcosil C18



(5 $\mu$ m) 15 cm x 4.6 mm, the flow rate was 1.2 mL/min and the chromatograms were monitored at 250 nm. The system was calibrated with a standard solution of MDA, which was used for quantification. Results were expressed in  $\mu$ M.

#### Catalase assay (CAT)

CAT activity was assayed measuring the absorbance decrease at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 and 0.1–0.3 mg protein/mL (Aebi 1984). One unit of the enzyme is defined as one  $\mu$ mol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute and the specific activity is reported as units per mg protein.

#### Superoxide dismutase (SOD)

SOD activity was determined using the RANSOD kit (Randox, Antrim, United Kingdom). The method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride and superoxide radical (produced in the incubation medium from the xanthine-xanthine oxidase reaction system), which is assayed spectrophotometrically at 505 nm. The inhibition of the produced chromogen is proportional to the activity of the SOD present in the sample. A 50% inhibition is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as units per mg protein.

#### Glutathione Peroxidase (GSH-Px)

GSH-Px was measured using the RANSEL kit (Randox, United Kingdom). The method is based on Paglia and Valentine (1967). Glutathione peroxidase catalyses the oxidation of glutathione by cumene hydroperoxide. In the presence of glutathione reductase and NADPH, oxidized glutathione is immediately converted to its reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP<sup>+</sup>. The decrease in absorbance at 340 nm is

measured. One GSH-Px unit is defined as 1  $\mu\text{mol}$  of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as units per mg protein.

#### Total protein determination

Total protein concentrations were determined in plasma by Biuret method (Labtest Kit<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) and in erythrocytes by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

#### Statistical analyses

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan multiple range test when F value was significant. A *p* value of less than 0.05 was considered to be significant. The values were presented as mean  $\pm$  S.D. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

## Results

Glycemia of the animals from different groups after FST and before the decapitation is showed in Figure 1. It can be observed that isolated insulin or insulin plus clonazepam acute treatment significantly decreased glycemia when compared to non treated STZ rats [ $F_{(4,53)}=14.185$   $p<0,05$ ].

Figure 2 shows the immobility time of STZ rats submitted to FST treated or not with insulin and/or CNZ and controls. It is possible to observe that STZ-induced diabetic rats presented longer immobility time when compared to control group [ $F_{(4,57)}=4.211$   $p<0,05$ ]. The association of insulin plus CNZ acute treatment was capable to partially reverse this effect. Moreover, immobility latency time (Figure 3) corroborate with this result, showing that STZ group presented lower immobility latency time, when compared to control group, and STZ-INS-CNZ group presented higher immobility latency time, when compared to the STZ group [ $F_{(4,55)}=2.853$   $p<0,05$ ].

The plasma carbonyl content from STZ-induced diabetic rats submitted to FST treated or not with insulin and/or CNZ is presented in figure 4. The level of protein oxidation expressed as carbonyl content indicates the extent of oxidative damage to proteins in plasma and this value was significantly higher in STZ group when compared to STZ treated groups and control [ $F_{(4,54)}=3.675$ ,  $p<0.05$ ].

The lipid peroxidation index was determined on the basis of MDA levels (figure 5). It can be verified that plasma MDA levels were significantly increased in STZ group when compared to control animals and significantly reduced in STZ-INS and STZ-INS-CNZ groups when compared STZ and STZ-CNZ rats. In addition, STZ-INS-CNZ group presented plasma levels of MDA significantly lower than the STZ-INS animals [ $F_{(4,51)}=29.571$ ,  $p<0.05$ ].

The activities of the antioxidant enzymes CAT, SOD and GSH-Px determined in erythrocytes of STZ animals is showed in figures 6, 7 and 8, respectively. No significant differences in antioxidant enzymes activities where observed among the groups of animals.

## Discussion

Oxidative stress is known to be a component of molecular and cellular damage mechanism in a wide spectrum of human diseases (Halliwell 2001; Dalle-Donne et al. 2006; Halliwell and Gutteridge 2007). It is well known that oxidative stress is a contributor to the development of complications in DM. There are several evidences indicating that oxidative stress is increased in diabetes (Monnier et al. 2009) due to the overproduction of ROS and decreased efficiency of antioxidant defenses as a result of hyperglycemia (Wiernsperger 2003; Ramakrishna and Jaikhani 2007; Sadi et al. 2008; Pan et al. 2008). Protein glycation, oxidation of lipids and other macromolecules (such DNA) and inflammation are major causes of diabetic complications in persons with type 1 or type 2 diabetes (Brownlee 2001; Brownlee 2005; Stetina et al. 2006).

Previous studies in STZ-induced diabetic rats showed that the increased oxidative stress is an important factor in the pathogenesis of the disease (Maritim et al. 2003; Kamalakkannan and Prince, 2003). Balkis et al. (2008) reported that in STZ-induced diabetic rats oxidative stress parameters (MDA and tail moment in comet assay) were higher and antioxidant status (SOD and Vitamin C) was lower than in nondiabetic rats. In this context, a previous study from our laboratory showed a significant increase of thiobarbituric acid-reactive species (TBARS), a lipid peroxidation parameter, and a significant decrease of total antioxidant reactivity (TAR) in plasma from STZ-induced diabetic rats submitted to forced swimming test, an experimental model of depression. Additionally, clonazepam, a positive GABA<sub>A</sub> receptor modulator, reverted these alterations (Haeser et al. 2007).

Considering that insulin has effect on cognitive functions (Laron 2009), modulating synaptosomal GABA and/or glutamate transport, with a neuroprotective role under oxidizing and/or diabetic conditions (Duarte et al. 2004) and that CNZ exerts protective effect upon

oxidative stress, decreasing immobility in the FST of diabetic rats (Haeser et al. 2007), our goal in this work was to evaluate the effect of insulin and/or CNZ acute treatment on protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test. To our knowledge, this is the first report that evaluated the effect of these drugs upon oxidative stress parameters studied in this experimental animal model.

Therefore, we determined the level of protein oxidation expressed as carbonyl content in plasma. It was verified a significant higher carbonyl group content in STZ group when compared to control rats. Treatment with insulin and/or CNZ significantly reduced carbonyl content to similar levels of controls. Protein oxidation is involved in the pathogenesis of a large number of diseases, including diabetes (Witko-Sarsat et al. 1998; Kalousova et al. 2002; Cakatay 2005; Piwowar et al. 2008). Many different types of protein oxidative modifications can be induced by free radicals. Protein carbonyl content is the most general and well-used biomarker of severe oxidative protein damage, being considered an early and stable marker of protein oxidation (Pan et al. 2008; Cakatay 2005). Therefore, our results allow to suggest that protein oxidative damage occurs in STZ diabetic rats submitted to forced swimming test and that insulin and clonazepam have a protecting action upon these process.

Lipid peroxidation is initiated by free radicals attack to membrane lipids, generating large amounts of reactive products, which have been implicated in diabetes and its complications. MDA is a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. Increased serum MDA levels have been found in diabetes mellitus patients (Sundaram et al. 1996; Kedziora-Kornatowska et al. 1998; Bhatia et al. 2003; Pan et al. 2008). In our study we found a significantly higher MDA plasma levels in STZ and STZ-CNZ groups when compared to control rats and that treatment with insulin alone or in association with CNZ decreased significantly MDA plasma levels when compared with STZ group. STZ-INS-CNZ group presented plasma levels of MDA significantly lower than the STZ-INS group,

suggesting that CNZ when administered in association with insulin has a possible important effect against lipid peroxidation.

To control the flux of ROS, aerobic cells have developed an antioxidant defense system which includes enzymatic and non-enzymatic components (Ahmed 2005). CAT, SOD and GSH-Px are the major enzymes that remove and protect cells from free radicals (Sadi et al. 2008). The stability and capacity of antioxidants status during chronic diabetes significantly influences the outcome of the long-term complications caused by oxidative stress (Sasvári and Nyakas 2003). Our investigation of the erythrocytes antioxidant enzymes activities (CAT, SOD and GSH-Px) in an acute model of diabetic (STZ) rats submitted to forced swimming test treated or not with insulin and/or CNZ showed no significant differences among the groups. However it is important to emphasize that there is a tendency to a decrease in SOD activity in STZ, STZ-INS and STZ-CNZ groups when compared to control group, suggesting that the association INS-CNZ could revert these effect.

Our findings showed that protein and lipid oxidative damage were increased in plasma of this diabetes/depression experimental animal model and that the associated treatment with insulin and clonazepam was capable to protect against this process. The benefits upon oxidative stress are probably more related to the action of insulin than CNZ. Insulin acute treatment probably acts by controlling glycemia, since hyperglycemic status leads to oxidative stress, increasing the production of free radicals and reducing the antioxidant potential (Wiernsperger 2003). Moreover, the hyperglycemic status can lead, through the imbalance between production of reactive species and antioxidant defenses to protein glycation, to lipid peroxidation and to DNA damage (Imaeda et al. 2002). Besides, insulin could be acting as an antioxidant scavenger, since it was demonstrated that the application of intensive insulin treatment regime significantly improves total antioxidant plasma capacity as compared to the application of conventional therapy regime insulin (Kocic et al. 2007).

There are evidences that CNZ reverse the immobility time and did not alter the glycemia in diabetic rats submitted to FST (Gomez and Barros 2000; Haeser et al. 2007). Our findings showed that STZ-induced diabetic rats really presented a significantly longer immobility time when compared to control group. Only the association of insulin and CNZ acute treatment was capable to partially reverse this effect in the dosage tested, which could be related to either altered GABA function and/or glutamate transmission. Besides, it is believed by some authors that increase in serotonin, dopamine and noradrenaline synthesis and enhancement of serotonin and monoamine function mediated via de GABA system are related to antidepressive effects. (Borowicz et al. 1999; Harvey, 2008; Morishita, 2009). Moreover, immobility latency time, which is the time elapsed between the introduction of the animal in the water until it is completely immobile for the first time (Contreras et al. 1998), corroborate with the result above, showing that STZ group presented lower immobility latency time when compared to the control group. This behavior, as well as the total duration of immobility, reflects a depressive-like behavior in animals. In this context, STZ-INS-CNZ group was capable to partially reverse this effect. These results allow to suggest that the association of insulin and CNZ has a possible important antidepressant effect under the depressive-like behavior in this experimental animal model.

Chevassus et al. (2004) described that CNZ may significantly decrease the glucose tolerance, insulin secretion and glucose effectiveness at basal insulin in volunteers. Besides, Pearce et al. (2004) showed that diabetic animals present low levels of GABA in the CNS, as well as a reduction of dopamine and serotonin, which is known be related to depressive symptoms. So, the reduction of the levels of GABA could be related to the destruction of GABAergic neurons and may be a causal role in diabetic encephalopathy.

The results presented here may suggest that the association of insulin plus CNZ could be clinically useful for diabetic depressed patients, since these drugs may be having an



antioxidant effect in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to FST, protecting against the action of ROS which can contribute for the development and complications of diabetes. Moreover, it is possible to hypothesize that oxidative stress could lead the destruction of GABAergic neurons, which could be involved in the pathophysiology of depression in diabetes and that CNZ associated with insulin could have a protective action upon this process.

In conclusion, this work provide the first experimental evidence that insulin in association with CNZ is capable to protect against protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test.

## **Acknowledgements**

This work was supported in part by grants from CAPES, CNPq and FINEP/HCPA-Brazil.

## **Conflict of interest disclosure**

The authors declare that there is no conflict of interest disclosure associated with this manuscript.

## References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121–126.
- Ahmed, R.G. (2005). The physiological and biochemical effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. *Med. J. Islamic World Acad. Sci.* 15(1): 31-42.
- American Diabetes Association. (2009). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care.* 32: suppl 1:s62-7.
- Artola, A. (2008). Diabetes-, stress- and ageing-related changes in synaptic plasticity in hippocampus and neocortex - the same metaplastic process? *Eur. J. Pharmacol.* 585:153–62.
- Balkis, S.B., Fadilah, R.N., Ezlan, A., Khairul, O., Mokhtar, A.B., Jamaludin, M. (2008). Oxidative Stress and DNA Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effects of Alpha Lipoic Acid. *J. Biol. Sci.* 8(3):622-627.
- Bhatia, S., Shukla, R., Venkata, M.S., Kaur, G.J., Madhava, P.K. (2003). Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin. Biochem.* 36:557–562.
- Biessels, G.J., Van Der Heide, L.P., Kamal, A., Bleys, R.L., Gispen, W.H. (2002). Aging and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* 441:1–14.
- Bonnefont-Rousselot, D., Beaudoux, J.L., Therond, P., Peynet, J., Legrand, A., Delattre, J. (2004). Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *Ann. Pharm. Fr.* 62:147–157.
- Borowicz, K.K., Luszczki, J., Szadkowski, M., Kleinrok, Z., Czuczwar, S.J. (1999). Influence of LY 300164, an antagonist of AMPA/kainate receptors, on the anticonvulsant activity of clonazepam. *Eur. J. Pharmacol.* 10:67-72.

- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414:813-820.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 54:1615-1625.
- Cakatay, U. (2005). Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab*. 31:551–557.
- Chevassus, H., Mourand, I., Molinier, N. Lacarelle, B., Brun, J.F., Petit, P. (2004). Assessment of single-dose benzodiazepines on insulin secretion, insulin sensitivity and glucose effectiveness in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized cross-over trial. *BMC Clin. Pharmacol*. 4:3.
- Contreras, C.M., Martínez-Mota, L., Saavedra, M. (1998). Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 22(7):1121-8.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. (2006). Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin. Chem*. 52(4):601-623.
- Duarte, A.I., Santos, M.S., Seica, R., Oliveira, C.R. (2004). Oxidative stress affects synaptosomal gamma-aminobutyric acid and glutamate transport in diabetic rats: the role of insulin. *Diabetes*. 53(8):2110–2116.
- Gomez, R., Barros, H.M.T. (2000). Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 66:329–335.
- Guyot, L.L., Diaz, F.G., O'regan, M.H., Song, D., Phillis, J.W. (2001). The effect of streptozotocin-induced diabetes on the release of excitotoxic and other amino acids from the ischemic rat cerebral cortex. *Neurosurgery*. 48:385–391.
- Haeser, A.S., Sitta, A., Barschak, A.G., Deon, M., Barden, A.T., Schmitt, G.O., Landgraff, S., Gomez, R., Barros, H.M.T., Vargas, C.R. (2007). Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test: the clonazepam effect. *Brain Res*. 1154:335-338.

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 18:685-716.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press; 936.

Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142:231-55.

Harvey, B.H. (2008). Is major depressive disorder a metabolic encephalopathy? *Hum. Psychopharmacol.* 23:371-84.

Hilakivi-Clarke, L.A., Wozniak, K.M., Durcan, M.J., Linnoila, M. (1990). Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiol. Behav.* 48:429–433.

Imaeda, A., Kaneko, T., Aoki, T., Kondo, Y., Nagase, H. (2002). DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice. *Food. Chem. Toxicol.* 40(7):979-987.

Imaeda, V., Aoki, T., Kondo, Y., Hori, M., Ogata, M., Obayashi, H., Hasegawa, G., Nakamura, N., Tokuda, K., Nishino, H., Yoshikawa, T., Kondo, M. (2001). Protective effects of fluvastatin against reactive oxygen species induced DNA damage and mutagenesis. *Free Radic. Res.* 34(1):33–44.

Kalousova, M., Skrha, J., Zima, T. (2002). Advanced glycation endproducts and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol. Res.* 51:597–604.

Kamalakkannan, N., Prince, P.S. (2003). Hypoglycaemic effect of water extracts of *Aegle marmelos* fruits in streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 87(2-3):207-10.

Karatepe, M. (2004). Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC North America.* 22:362-365.

Kedziora-Kornatowska, K.Z., Luciak, M., Blaszczyk, J., Pawlak, W. (1998). Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin

dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transpl.* 13:2829–2832.

Kocic, R., Pavlovic, D., Kocic, G. (2007). Impact of intensive insulin treatment on the development and consequences of oxidative stress in insulin-dependent diabetes mellitus. *Vojnosanit Pregled.* 64(9): 623-628.

Kuhad, A., Chopra, K. (2009). Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: involvement of NFkB signaling pathway. *Life Sci.* 27;84(9-10):296-301.

Laron, Z. (2009). Insulin and the brain. *Arch. Physiol. Biochem.* 2; 115 (2):112-116.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, L., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shalithiel, S., Stadman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 186:464-478.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis-Farr, A., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.

Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants : a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17:24-38.

McCaffery, J.M., Niaura, R., Todaro, J.F., Swan, G.E., Carmelli, D. (2003). Depressive symptoms and metabolic risk in adult male twins enrolled in the National Heart, Lung, and Blood Institute Twin Study. *Psychosom. Med.* 65:490–497.

Miles, W.R., Root, H.F. (1922). Psychologic tests applied to diabetic patients. *Arch. Int. Med.* 30:767–777.

Monnier, L., Colette, C., Mas, E., Michel, F., Cristol, J.P., Boegner, C., Owens, D.R. (2009). Regulation of oxidative stress by glycaemic control: evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy. *Diabetologia.* 53(3):562-571.

Morishita, S. (2009). Clonazepam as a therapeutic adjunct to improve the management of depression: a brief review. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 24:191-198.

- Paglia, D.E., Valentine, W.N. (1967). Glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70:158.
- Pan, H.Z., Zhang, H., Chang, D., Li, H., Sui, H. (2008). The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 92:548–551.
- Pearce, D.A., Atkinson, M., Tagle, D.A. (2004). Glutamic acid decarboxylase autoimmunity in Batten disease and other disorders. *Neurology.* 63(11):2001-2005.
- Piwowar, A., Knapik-Kordecka, M., Szczecin´ska, J., Warwas, M. (2008). Plasma glycooxidation protein products in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 24:549–553.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977). Depression: a new model sensitive to antidepressant treatment. *Nature* 266:730–732.
- Rajtar, G., Zolkowska, D., Keinrok, Z. (2002). Effect of diazepam and clonazepam on the function of isolated rat platelet and neutrophils. *Intern. Med. J. Exp. Clin. Res.* 8(4): 37–44.
- Ramakrishna, V., Jaiikhani, R. (2007). Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients. *Diagn. Pathol.* 2:22.
- Sadi, G., Yimaz, O., Güray, T. (2008). Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. *Mol. Cell. Biochem.* 309(1-2):109-116.
- Sanvitto, G.L., Barros, H.M., Ribeiro, M.F., Marques, M. (1992). Decreased specific insulin binding to hypothalamus from rats submitted to Porsolt´s swim test. *Med. Sci. Res.* 20:699-700.
- Sasvári, M., Nyakas, C. (2003). Time dependent changes in oxidative metabolism during chronic diabetes in rats. *Acta. Biol. Szegediensis.* 47(1):153-158.
- Sies, H. (1991). *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants.* New York, Academic press.
- Sima, A.A., Kamiya, H., Li, Z.G. (2004). Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 490:187– 197.

Stetina, R., Varvarovska, J., Rusavy, Z., Pomahacova, R., Racek, J., Lacigová, S., Trefil, L., Siala, K., Stozicky, F. (2006). Oxidative Stress, DNA damage and DNA repair capacity in children with type 1 diabetes mellitus. *Toxicol. Lett.* 164(suppl):S1-134.

Stewart, R., Liolitsa, D. (1999). Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabet. Med.* 16:93–112.

Strachan, M.W., Deary, I.J., Ewing, F.M., Frier, B.M. (1997). Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. *Diabetes Care.* 20:438–445.

Suarez, E.C. (2006). Sex differences in the relation of depressive symptoms, hostility, and anger expression indices of glucose metabolism in nondiabetics. *Health Psychol.* 25: 484–492.

Sundaram, R.K., Bhaskar, A., Vijayalingam, S., Viswanathan, M., Mohan, R., Shanmugasundaram, K.R. (1996). Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin. Sci. (Lond)* 4:255–260.

Tsigos, C., Chrousos, G.P. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* 53:865-871.

Vogelzangs, N., Suthers, K., Ferrucci, L., Simonsick, E.M., Ble, A., Schragar, M., Bandinelli, S., Lauretani, F., Giannelli, S.V., Penninx, B.W. (2007). Hypercortisolemic depression is associated with the metabolic syndrome in late-life. *Psychoneuroendocrinology*, 32:151-159.

Wiernsperger, N.F. (2003). Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab.* 29:579-585.

Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Khoa, T.N., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Drüeke, T., Descamps-Latscha, B. (1998) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J. Immunol.* 161:2524–2532.



## Figure legends

Fig. 1 Glycemia from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test not treated (STZ) and treated with insulin (STZ-INS) or clonazepam (STZ-CNZ) or insulin plus clonazepam (STZ-INS-CNZ) (n = 12-13) and controls (n = 8). Data represent mean  $\pm$  S.D. \* p < 0.05 compared to the control group; # p < 0.05 compared to the STZ group (ANOVA followed by DUNCAN test).

Fig. 2 Immobility time of streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test not treated (STZ) and treated with insulin (STZ-INS) or clonazepam (STZ-CNZ) or insulin plus clonazepam (STZ-INS-CNZ) (n = 12-13) and controls (n = 12). Data represent mean  $\pm$  S.D. \* p < 0.05 compared to the control group (ANOVA followed by DUNCAN test).

Fig. 3 Immobility latency time of streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test not treated (STZ) and treated with insulin (STZ-INS) or clonazepam (STZ-CNZ) or insulin plus clonazepam (STZ-INS-CNZ) (n = 12-13) and controls (n = 12). Data represent mean  $\pm$  S.D. \* p < 0.05 compared to the control group (ANOVA followed by DUNCAN test).

Fig. 4 Measure of carbonyl content in plasma from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test not treated (STZ) and treated with insulin (STZ-INS) or clonazepam (STZ-CNZ) or insulin plus clonazepam (STZ-INS-CNZ) (n = 11-13) and controls (n = 11). Data represent mean  $\pm$  S.D. \* p < 0.05 compared to the control group; # p < 0.05 compared to the STZ group (ANOVA followed by DUNCAN test).

Fig. 5 Measure of malondialdehyde (MDA) in plasma from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test not treated (STZ) and treated with insulin (STZ-INS) or clonazepam (STZ-CNZ) or insulin plus clonazepam (STZ-INS-CNZ) (n = 10-12) and controls (n = 11). Data represent mean  $\pm$  S.D. \*  $p < 0.05$  compared to the control group; #  $p < 0.05$  compared to the STZ group; a  $p < 0.05$  compared to the STZ-INS group (ANOVA followed by DUNCAN test).

Fig. 6 Activity measurement of catalase in erythrocytes from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test not treated (STZ) and treated with insulin (STZ-INS) or clonazepam (STZ-CNZ) or insulin plus clonazepam (STZ-INS-CNZ) (n = 10-11) and controls (n = 10). Data represent mean  $\pm$  S.D.  $p > 0.05$  (ANOVA followed by DUNCAN test).

Fig. 7 Activity measurement of superoxide dismutase (SOD) in erythrocytes from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test not treated (STZ) and treated with insulin (STZ-INS) or clonazepam (STZ-CNZ) or insulin plus clonazepam (STZ-INS-CNZ) (n = 12-13) and controls (n = 10). Data represent mean  $\pm$  S.D.  $p > 0.05$  (ANOVA followed by DUNCAN test).

Fig. 8 Activity measurement of glutathione peroxidase (GSH-Px) in plasma from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test not treated (STZ) and treated with insulin (STZ-INS) or clonazepam (STZ-CNZ) or insulin plus clonazepam (STZ-INS-CNZ) (n = 9-12) and controls (n = 10). Data represent mean  $\pm$  S.D.  $p > 0.05$  (ANOVA followed by DUNCAN test).

Figure 1:

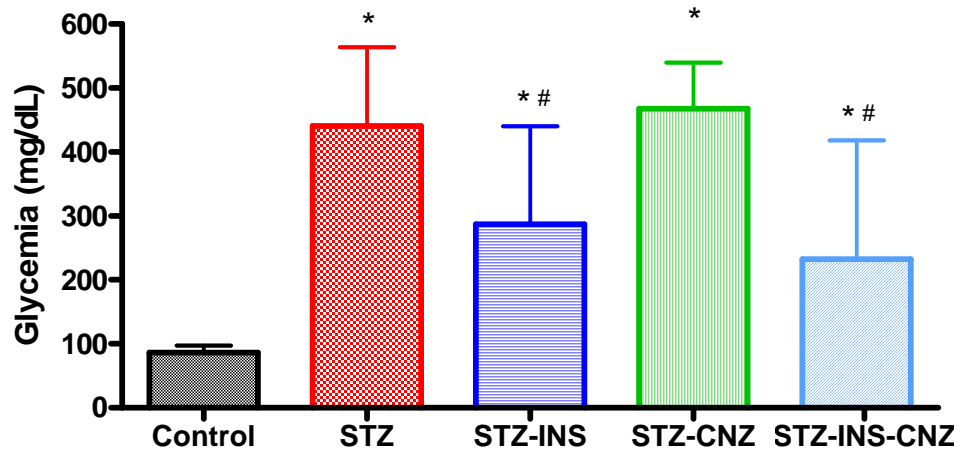


Figure 2:

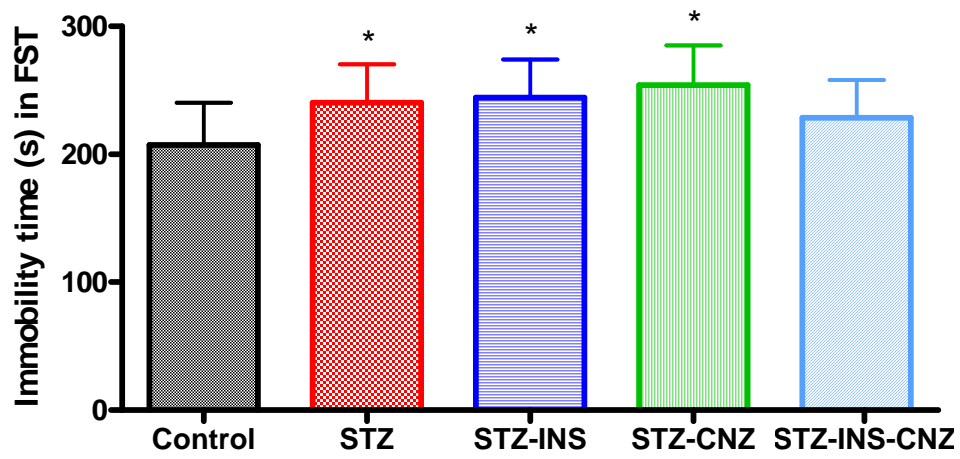


Figure 3:

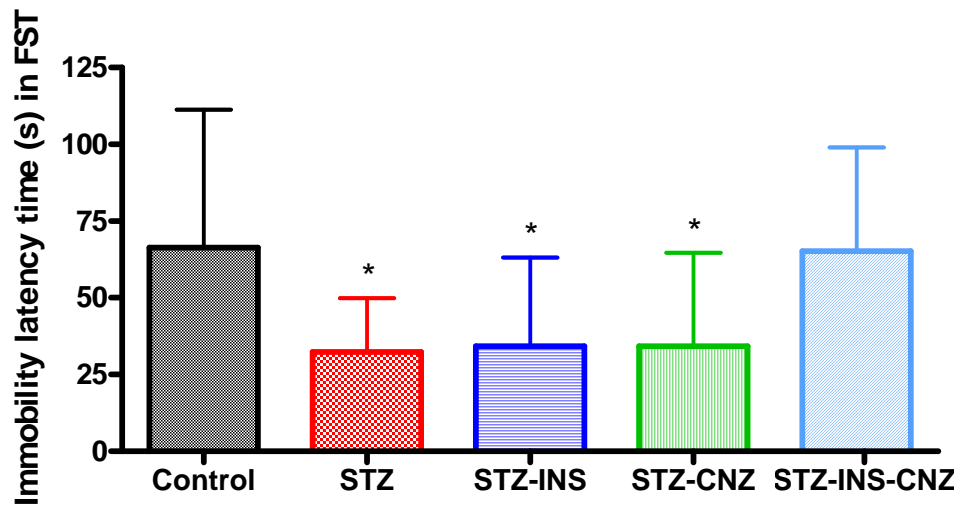


Figure 4:

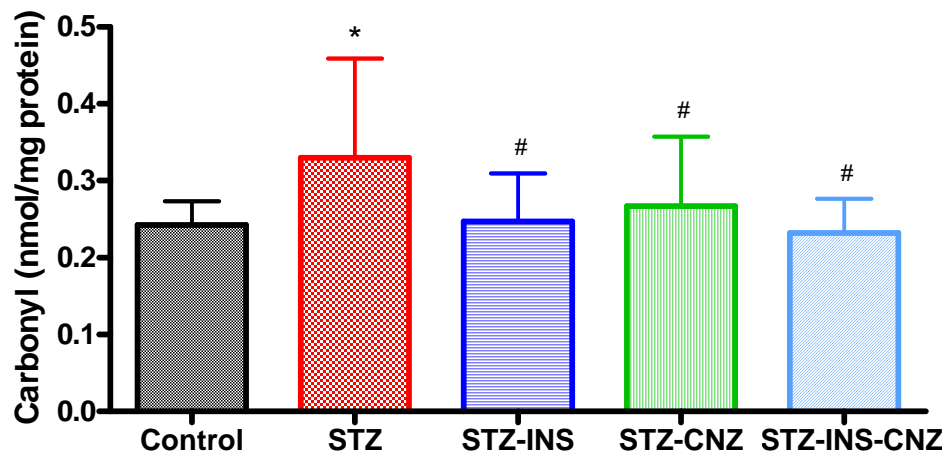


Figure 5:

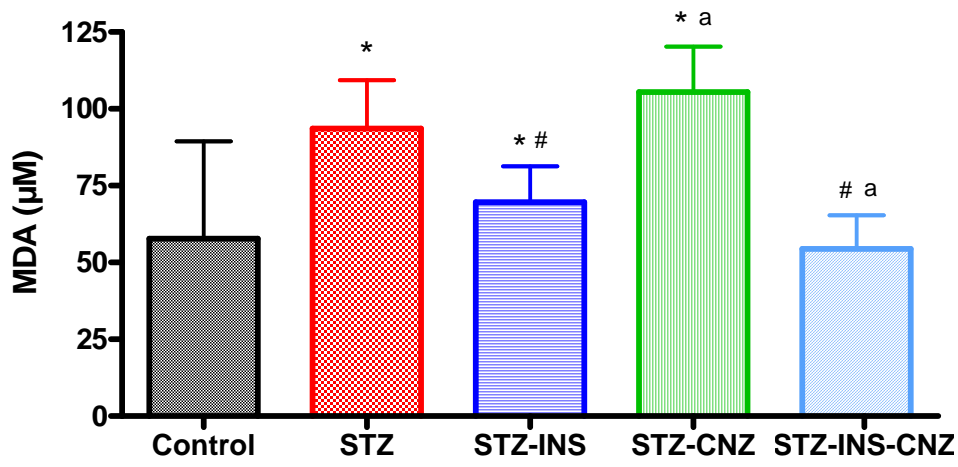


Figure 6:

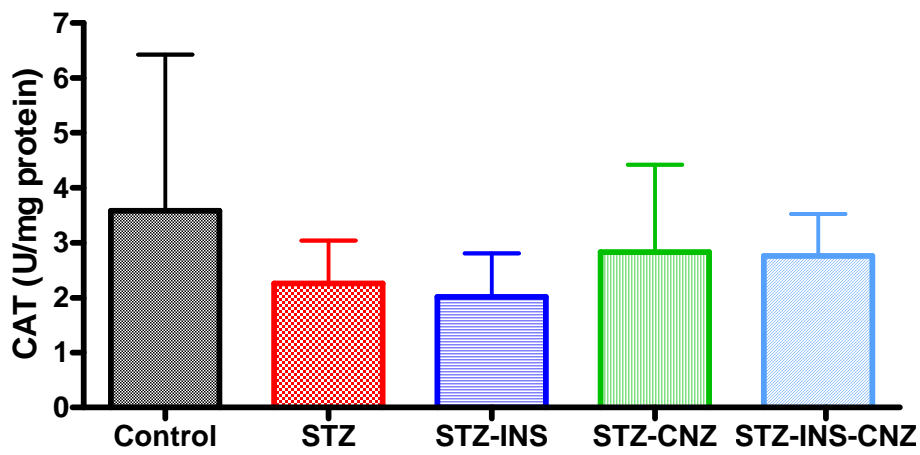


Figure 7:

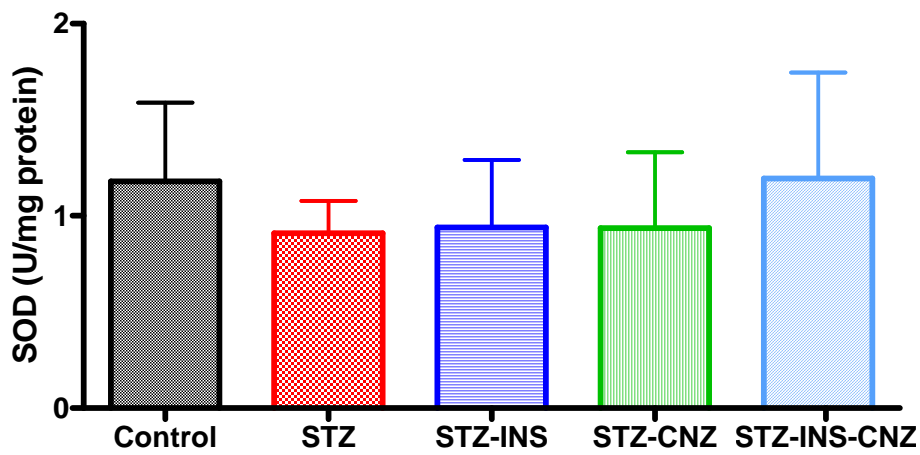
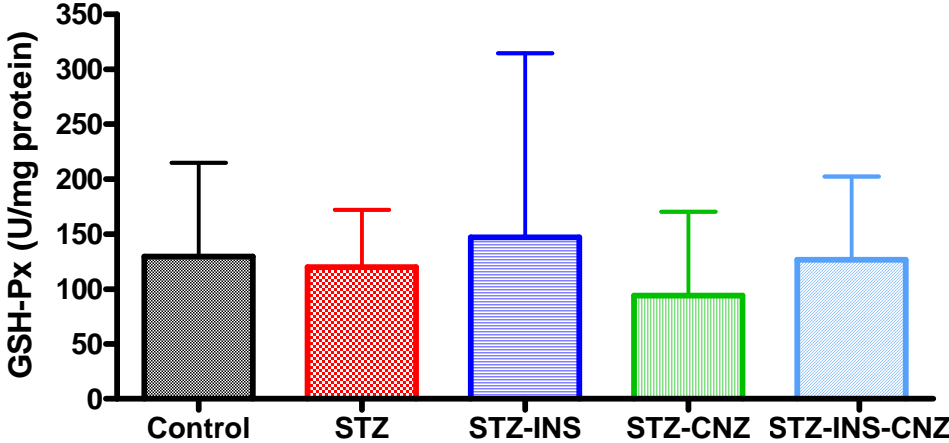


Figure 8:



#### **4. ARTIGO SUBMETIDO Nº 2 I**

---

**DNA Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Submitted to Forced  
Swimming Test: The Insulin and Clonazepam Effect**

**Diabetologia**

**JCR: 6.418**

**Manuscript**

**Data submetida: 18/02/2010**





**DNA Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Submitted to Forced  
Swimming Test: The Insulin and Clonazepam Effect**

C. A. Y. Wayhs<sup>1,2\*</sup>; V. Manfredini<sup>1,2</sup>; A. Sitta<sup>2,3</sup>; M. Deon<sup>2</sup>; G. S. Ribas<sup>1,2</sup>; C. S. Vanzin<sup>2</sup>; G. B. Biancini<sup>2</sup>; M. S. Nin<sup>4</sup>; H. M. T. Barros<sup>4</sup>; C. R. Vargas<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Farmacologia, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

**\* Corresponding authors:**

Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90.035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: +55 51 33598011

Telefax: +55 51 33598010

E-mail address: [crvargas@hcpa.ufrgs.br](mailto:crvargas@hcpa.ufrgs.br) (C. R. Vargas)

[manowayhs@yahoo.com.br](mailto:manowayhs@yahoo.com.br) (C. A. Y. Wayhs)

Word count: 2,679 (both of abstract and main text).

Word count (abstract): 173.

Word count (Main text): 2,506

## **Abstract**

*Aims/hypothesis* In this work we investigated DNA damage in peripheral whole blood leukocytes from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test and evaluate the effect of insulin and clonazepam acute treatment. *Methods* We analyzed DNA damage using the alkaline (pH > 13) comet assay in peripheral whole blood leukocytes from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test. *Results* Our results showed a greater and significant DNA migration in terms of damage index in diabetic group (DI =  $61.00 \pm 4.95$ ) when compared to the control group (DI =  $34.00 \pm 1.26$ ). Additionally, diabetic animals treated with insulin (DI =  $45.00 \pm 1.82$ ) or clonazepam (DI =  $52.00 \pm 1.22$ ) presented a significant decrease in damage index, when compared to untreated animals. Furthermore, it was observed a reversion in damage index at level of controls in diabetic rats treated with insulin plus clonazepam (DI =  $39.50 \pm 1.68$ ). *Conclusions/Interpretation* These results may suggest that the treatment with insulin plus clonazepam protect against DNA damage in diabetic rats submitted to forced swimming test.

**Key words:** Comet Assay; DNA Damage; Diabetes; Depression; Insulin; Clonazepam.

## Introduction

Diabetes Mellitus (DM), a metabolic disorder characterized by a hyperglycemic chronic state, is considered one of the major metabolic diseases of 21<sup>st</sup> century [1], being able to cause complications affecting the retina, kidney, muscle and blood vessels, besides the central nervous system (CNS) [2]. Cognitive dysfunction in diabetic subjects has been recognized since the early 20<sup>th</sup> century [3]. Since then, a wealth of studies have described a series of neuropsychological and neurobehavioral changes in both type 1 and type 2 diabetic subjects, suggesting that diabetic encephalopathy should be recognized as a complication of diabetes [4, 5]. In fact, psychiatric manifestations seem to accompany this encephalopathy, since the prevalence of depression in diabetic patients is much higher than in the general population [6-9].

In this context, it well established that in animal models of diabetes the encephalopathy may be replicated, since diabetic mice and rats also present depressive-like behavior when submitted to the forced swimming test (FST) [10-12]. Studies have demonstrated that insulin is able to prevent the neuronal damage in cortex of streptozotocin (STZ) diabetic rats and also produce behavioral changes in diabetic rats [11, 13]. Also, it was verified that insulin affects synaptosomal GABA and glutamate transport under oxidative stress conditions [14] and that clonazepam (CNZ), a positive GABA<sub>A</sub> receptor modulator, decreases immobility of diabetic rats in the FST, showing an antidepressant effect in these animals [10, 15].

Oxidative stress may play a role in the development of diabetes complications [16], since hyperglycemia generates abnormally high levels of free radicals by autoxidation of glucose and by protein glycation [17]. These free radicals induce a variety of lesions in DNA, including oxidized bases, abasic sites, DNA strand breaks and formation of cross-links

between DNA and proteins. It was shown that hydroxyl radical, which is produced by the Fenton reaction in the presence of transition metal ions, is responsible for DNA damage [18].

In this context, the present work aimed to investigate DNA damage in peripheral whole blood leukocytes from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test and evaluate the effect of insulin and clonazepam acute treatment using the comet assay.

## Methods

### Animals

Male Wistar rats ( $250 \pm 50$ g) were obtained from the Animal House of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). The animals were housed in groups of four per polypropylene cage. Food and water were available *ad libitum*, except when otherwise stated and the animals were maintained in a temperature-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) under a light–dark cycle (7:00 a.m.–7:00 p.m.). The animals were divided in five groups: Control (nondiabetic); Diabetics (STZ); Diabetics treated with insulin (STZ-INS); Diabetics treated with clonazepam (STZ-CNZ); Diabetics treated with insulin plus clonazepam (STZ-INS-CNZ). All *in vivo* experiments followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of UFCSPA (08404). All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

### Drugs

Insulin (4 IU/mL; Humulin®, Lilly, USA) was prepared in saline immediately before intraperitoneal (I.P.) administration. CNZ (0.25 mg/mL; Rivotril®, Roche, Brazil) was prepared in saline with Tween 0.05% (v.v) immediately before I.P. administration. Streptozotocin (STZ) – Sigma, St. Louis, MO, USA – 60 mg/mL was prepared in citrate buffer (pH 4.3) immediately before I.P. administration.

### Diabetes induction

Diabetes was induced by a single I.P. dose of STZ 60 mg/kg as already described [10]. Increased blood glucose levels ( $\geq 250$  mg/dL) of the STZ group rats were confirmed with a

glucometer (Accu Chek Aviva®, Roche, Germany) after 72 h. Nondiabetic control rats received I.P. injections of saline (1 mL/kg) and were also submitted to blood glucose measurement.

#### Forced swimming test (FST)

After 21 days of diabetes induction, animals were submitted to the forced swimming test [10, 19]. In the first day, the animals were introduced for 15 minutes in aquarium (22×22×35 cm) with 27 cm of height of water (temperature of 24–26 °C), 24 h before the test. Soon after, the rats were dry with towels and were administered insulin (4 IU/kg I.P.), CNZ (0.25 mg/kg I.P.) or saline (1 mL/kg) 24, 5 and 1h before the test [19]. The FST session was videotape recorder for further analysis.

#### Blood sample

Thirty minutes after the FST, animals were sacrificed by decapitation, and whole blood was collected under sterile conditions in heparinized vials. Whole blood was frozen at –80°C until analysis.

#### Single cell gel electrophoresis (Comet Assay)

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al (1988) [20]. The assay was performed in accordance with general guidelines for use of the comet assay [21, 22]. Isolated human leukocytes were suspended in agarose and spread into a glass microscope slide pre-coated with agarose. Agarose was allowed to set at 4°C for 5 min. Slides were incubated in ice-cold lysis solution to remove cell proteins, leaving DNA as “nucleoids”. After the lysis procedure, slides were placed on a horizontal electrophoresis unit, covered with fresh buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min at 4°C to allow

DNA unwinding and the expression of alkali-labile-sites. Electrophoresis was performed for 20 min (25 V; 300 mA; 0.9 V/cm). Slides were then neutralized, washed in bi-distilled water and stained using a silver staining protocol [23]. After drying at room temperature overnight, gels were analyzed using an optical microscope. One hundred cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected, and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and receive scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration) according to tail intensity. Therefore, the damage index (DI) for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions at least by two different individuals.

#### Statistical analyses

Blood glucose measurement were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan multiple range test when F value was significant. A *p* value of less than 0.05 was considered to be significant.

Comet assay data were analyzed using nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U-test. A *p* value lower than 0.05 was considered significant. Correlation between variables was calculated using the Spearman correlation test. The values were presented as median  $\pm$  S.E. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.

## Results

Tables 1-5 show individual DI values and the number of cells found in each damage class for each one of the five groups, respectively. Figure 1 shows glycemia of the animals after 30 minutes of the section of FST and before the decapitation of different groups of animals. It can be observed that isolated insulin or insulin plus clonazepam acute treatment significantly decrease glycemia [ $F_{(4,53)}=14,185$ ,  $p<0,05$ ]. Figure 2 shows the effect of the insulin and CNZ acute treatment on DNA damage in peripheral blood leukocytes of STZ-induced diabetic rats submitted to FST and controls. We verified a significantly increased damage index (DI =  $61.00 \pm 4.95$ ) in STZ group when compared to the control group (DI =  $34.00 \pm 1.26$ ). Additionally, STZ animals treated with insulin (DI =  $45.00 \pm 1.82$ ) or CNZ (DI =  $52.00 \pm 1.22$ ) presented a significant decrease in damage index, when compared to STZ untreated rats. Furthermore, in STZ rats treated with insulin plus CNZ (DI =  $39.50 \pm 1.68$ ) there was a reversion on the damage index to equal statistical level presented by the control group. In addition, it was verified a positive significant correlation between glycemia and damage index ( $r=0.4460$ ;  $p<0.05$ ) in treated and non treated rats submitted to FST.



## Discussion

Oxidative stress has been suggested as a potential contributor to the development of complications in DM. Growing evidences indicate that oxidative stress is increased in diabetes due to the overproduction of reactive oxygen species (ROS) and decreased efficiency of antioxidant defenses as a result of hyperglycemia [24]. Oxidation of lipids, proteins and others macromolecules such as DNA occurs during the development of diabetes and its complications [25].

DNA is a molecule that can be harmed easily. The DNA in every cell of the human body is exposed to attack of free radicals approximately 10,000 times a day and DNA-targeted free-radical attacks causes mutations and cell deaths to take place [26-28]. Besides the DNA being affected by aggravated glycosylation products in DM, chromosomal changes, breaks in DNA chain, failures in DNA repair, replication, and transcription may occur. In diabetic hyperglycemias, acceleration of these events may cause early cell aging and death [29].

In this context, studies demonstrated the significantly higher DNA damage in lymphocytes from streptozotocin-induced diabetic rats, measured by percentage of tail DNA in the comet assay, when compared with non diabetic rats [30, 31]. Furthermore, tail moment, which is defined as the product of the tail length and the fraction of DNA in the tail, has been measured in diabetic showing significantly higher levels of tail moment than non diabetic rats [32].

Studies with comet assay have shown increased levels of oxidative DNA breakage in peripheral blood lymphocytes of diabetic patients with poor glycemia control, but not in patients with normal glycemia [33, 34]. Dandona et al. (1996) [35] reported that in DM patients of both type 1 and type 2, oxidative DNA damage are higher than in healthy control

group. Type 1 male and female DM patients were investigated by Dinçer et al (2003) [36] and it was verified that the DNA damage in mononuclear leukocyte, analyzed by comet assay, were increased significantly compared with the healthy control group.

Considering that the risk to develop depression is greater in patients with diabetes than in the general population [37], that insulin modulates synaptosomal GABA and/or glutamate transport, thus having a neuroprotective role under oxidizing and/or diabetic conditions [14], that oxidative stress occurs in diabetic rats submitted to experimental depression model and that CNZ exerts protective effect upon oxidative stress, decreasing immobility in the FST of diabetic rats [12], our goal in this work was to evaluate the effect of insulin and CNZ acute treatment on DNA damage in leukocytes from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test.

We determined DNA damage in leukocytes by using the alkaline comet assay that measures DNA strand breaks in single cells. In the alkaline (pH > 13) version of the comet assay (single cell gel electrophoresis) developed by Singh et al. (1988) [20], increased DNA migration can be associated with incomplete excision repair sites [21], which are generated as an intermediate step during the action of different DNA repair systems [38]. This assay possesses a number of advantages when compared to other tests, being extremely sensitive to detect low levels of DNA damage, besides its low cost and short time necessary to perform the assay [39].

We verified significantly increased levels of DNA migration, and thus DNA damage, in leukocytes from diabetic group when compared to the control group. It has been demonstrated in literature that DNA damage occurs in diabetic rats [30-32]. Additionally, STZ animals treated with insulin or clonazepam presented significant decrease in damage index. Treatment of diabetic rats with insulin plus clonazepam reverted the greater DNA migration that was found in the diabetic group to equal statistical level presented in control

group. To our knowledge, this is the first report that measured DNA damage in diabetic rats submitted to FST evaluating the effect of insulin and a benzodiazepine (CNZ).

It is also important to emphasize that a significant positive correlation was observed between glycemia and DNA damage index in streptozotocin-induced diabetic rats. So, our results reinforce previous studies in diabetes showing that DNA damage can be provoked by an oxidative event, since the hyperglycemia leads to high free radicals production attacking essential molecules as DNA.

When comparing the distribution of damage class in studied groups, it is possible to observe that the differences were primarily caused by an increased number of cells in damage class 1, reflecting a homogeneously distributed increase in the number of slightly damage cells rather than a low number of highly damage cells. On the other hand, a significant number of cells presented damage class 2 and 3 in diabetic rats, when compared to the control group and diabetic treated with insulin and clonazepam groups. Moreover, just one animal of diabetic group presented cells with damage class 4. In this context, it should be emphasized that the association of the two treatments (insulin plus CNZ) presented better results, in terms of oxidative DNA damage, when compared to each one alone, once the distribution of cells in damage classes 3 and 4 were very similar to the control group.

Our findings showed that the DNA damage index is increased in this diabetes/depression animal model, and that the associated treatment with insulin and clonazepam is capable to protect against DNA damage. The effect of insulin can be explained by the combat to the hyperglycemia, since this pathological chronic state leads to oxidative stress, increasing the production of free radicals and reducing the antioxidant potential [24]. Oxidative stress is able to produce modifications in DNA bases, strand breakage and various other DNA damages [40]. On the other hand, insulin acute treatment may be acting as an antioxidant scavenger, since KOCIC et al. (2007) [41] demonstrated that the application of

intensive insulin treatment regime significantly improves total antioxidant plasma capacity as compared to the application of conventional therapy regime insulin. In addition, Monnier et al. (2009) [42] showed an independent inhibitory effect on oxidative stress in patients with type 1 and type 2 diabetes.

In a previous study [12] it was demonstrated that CNZ treatment reverted the immobility time in diabetic rats submitted to FST, suggesting that this drug could be clinically useful for diabetic depressed patients. Moreover, it was showed that CNZ exerts an antioxidant effect in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to FST, protecting against the action of free radicals which can contribute for the development of diabetes long-term complications, like oxidative DNA damage. This could be related with the reduction of the levels of GABA, through the destruction of GABAergic neurons in diabetic encephalopathy.

It was described that CNZ may significantly decrease the glucose tolerance, insulin secretion and glucose effectiveness at basal insulin in volunteers [43]. Besides, diabetic animals present low levels of GABA in the CNS [44], as well as a reduction of dopamine and serotonin. It was also described that diabetic patients have high titer of anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies (anti-GAD) in serum and cerebrospinal fluid, the enzyme responsible for the synthesis of GABA in CNS [45]. So, it is possible to hypothesized that oxidative stress could lead to destruction of the GABAergic neurons, which could be involved in the pathophysiology of depression in diabetes and that CNZ associated with insulin could have a protect action upon this process.

In conclusion, this work provide experimental evidence that DNA damage is increased in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test and the treatment of insulin and clonazepam associated is capable to protect against oxidative DNA damage.

**Acknowledgements**

This work was supported in part by grants from FAPERGS, CAPES, CNPq and FINEP/HCPA-Brazil.

**Duality of interest**

The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

## References

1. Apelqvist J, Bakker K, Van Houtum WH et al (2008) Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot: based upon the International Consensus on the Diabetic Foot (2007) Prepared by the International Working Group on the Diabetic Foot. *Diabetes Metab Res Rev* 24(Suppl 1): S116–S118.
2. Bellush LL, Reid SG, North D (1991) The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. *Physiol Behav* 50: 973–981.
3. Miles WR, Root HF (1922) Psychologic tests applied to diabetic patients. *Arch Int Med* 30: 767–777.
4. Biessels GJ, Van Der Heide LP, Kamal A et al (2002) Aging and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* 441: 1–14.
5. Sima AA, Kamiya H, Li ZG (2004) Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *Eur J Pharmacol* 490: 187–197.
6. Gavard JA, Lustman PJ, Clouse RE (1993) Prevalence of depression in adults with diabetes. *Diab Care* 16: 1167–1178.
7. Téllez-Zentero JF, Cardiel MH (2002) Risk factors associated with depression in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 33: 53–60.
8. Lustman PJ, Griffith LS, Gavard JA et al (1992) Depression in adults with diabetes. *Diab Care* 15: 1631–1639.
9. Shehatah A, Rabie MA, Al-Shahry A (2009) Prevalence and correlates of depressive disorders in elderly with type 2 diabetes in primary health care settings. *J Affect Disord* (in press).
10. Gomez R, Barros HMT (2000) Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 66: 329–335.
11. Hilakivi-Clarke LA, Wozniak KM, Durcan MJ et al (1990) Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiol Behav* 48: 429–433.
12. Haeser AS, Sitta A, Barschak AG et al (2007) Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test: the clonazepam effect. *Brain Research*. 1154: 335–338.
13. Guyot LL, Diaz FG, O'regan MH et al (2001) The effect of streptozotocin-induced diabetes on the release of excitotoxic and other amino acids from the ischemic rat cerebral cortex. *Neurosurgery* 48: 385–391.
14. Duarte AI, Santos MS, Seica R et al (2004) Oxidative stress affects synaptosomal gamma-aminobutyric acid and glutamate transport in diabetic rats: the role of insulin. *Diabetes* 53(8): 2110–2116.

15. Rajtar G, Zolkowska D, Keinrok Z (2002) Effect of diazepam and clonazepam on the function of isolated rat platelet and neutrophils. *Intern Med J Exp Clin Res.* 8(4): 37–44.
16. Imaeda V, Aoki T, Kondo Y et al (2001) Protective effects of fluvastatin against reactive oxygen species induced DNA damage and mutagenesis. *Free Radic Res* 34(1): 33–44.
17. Bonnefont-Rousselot D, Beaudoux JL, Therond P et al (2004) Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *Ann Pharm Fr* 62:147–157.
18. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edition, Oxford University Press, New York.
19. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new model sensitive to antidepressant treatment. *Nature* 266: 730–732.
20. Singh N, McCoy M, Tice R et al (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184–191.
21. Tice RR, Agurell D, Anderson D et al (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206–221.
22. Hartmann A, Agurell E, Beevers C et al (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis* 18: 45–51.
23. Nadin S, Vargas-Roig L, Ciocca D (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J Histochem Cytochem* 49: 1183–1186.
24. Wiernsperger NF (2003) Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab* 29: 579–585.
25. Stetina R, Varvarovska J, Rusavy Z et al (2006) Oxidative Stress, DNA damage and DNA repair capacity in children with type 1 diabetes mellitus. *Toxicol Lett* 164(suppl): S1–134.
26. Aruoma OI, Halliwell B, Dizdaroglu M (1989) Iron iondependent modification of bases in DNA by the superoxide radicalgenerating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 264: 13024–13028.
27. Halliwell B, Dizdaroglu M (1992) The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Rad Res Comm* 16: 75–87.
28. Weitberg AB, Weitzman SA, Clark EP et al (1985) Effects of antioxidants on oxidant-induced sister chromatid exchange formation. *Journal of Clinical Investigation* 75: 1835–1841.
29. Türkmen F, Akkuş İ, Büyükbaş S et al (1990). Biochemical Changes and Complications in Diabetes Mellitus. *Turkiye Klinikleri Journal Medical Sciences* 10: 1–10.

30. Wu H, Guo H, Zhao R (2006) Effect of Lycium barbarum Polysaccharide on the improvement of antioxidant ability and DNA damage in NIDDM Rats. *Yakugaku Zasshi* 126(5): 365-371.
31. Fidan A, Dündar Y (2008) The effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* on DNA damage, protein oxidation, lipid peroxidation, and some biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Diabetes Complications* 22(5): 348–356.
32. Siti Balkis B, Nor Fadilah R, Ezlan A et al (2008) Oxidative Stress and DNA Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effects of Alpha Lipoic Acid. *Journal of Biological Sciences* 8(3): 622-627.
33. Saydah SH, Platz EA, Rifai N et al (2003) Association of markers of insulin and glucose control with subsequent colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 412-418.
34. Anderson D, Yu TW, Wright J et al (1998) An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients. *Mutat Res* 398(1-2): 151-161.
35. Dandona P, Thuru K, Cook S et al (1996) Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347: 444–445.
36. Dinçer Y, Akçay T, İlkova H et al (2003) DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus. *Mutat Res* 527: 49–55.
37. Leonard EE (2004) Effects of depression on work loss and disability bed days in individuals with diabetes. *Diab Care* 27: 1751–1753.
38. Speit G, Hartmann A (1995) The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10: 555–559.
39. Liao W, McNutt MA, Zhu WG (2009) The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48: 46-53.
40. Imaeda A., Kaneko T, Aoki T et al (2002) DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice. *Food Chem Toxicol* 40(7): 979-987.
41. Kocic R; Pavlovic D; Kocic G (2007) Impact of intensive insulin treatment on the development and consequences of oxidative stress in insulin-dependent diabetes mellitus. *Vojnosanit Pregled* 64(9): 623-628.
42. Monnier L, Colette C, Mas E et al (2009) Regulation of oxidative stress by glycaemic control: evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy. *Diabetologia* (in press).
43. Chevassus H, Mourand I, Molinier N et al (2004) Assessment of single-dose benzodiazepines on insulin secretion, insulin sensitivity and glucose effectiveness in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized cross-over trial. *BMC Clin Pharmacol* 4.



44. Pearce DA, Atkinson M, Tagle DA (2004) Glutamic acid decarboxylase autoimmunity in Batten disease and other disorders. *Neurology* 63(11): 2001-2005.
45. Yoshimoto T, Doi M, Fukai N et al (2005) Type 1 diabetes mellitus and drug-resistant epilepsy: presence of high titer of anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies in serum and cerebrospinal fluid. *Intern Med* 44(11): 1174-1177.

## Figure legends

Fig. 1 Glycemia from Streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test (n = 12-13) and controls (n = 8). Data represent mean  $\pm$  S.D. \* p < 0.05 compared to the control; # p < 0.05 compared to the diabetic group (ANOVA followed by DUNCAN test)

Fig. 2 DNA damage (comet assay) of peripheral blood leukocytes from streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test (n = 9-12) and controls (n = 9). Data represent median  $\pm$  S.E. \* p < 0.05 compared to the control; # p < 0.05 compared to STZ group; <sup>a</sup> p < 0.05 compared to STZ-INS. <sup>b</sup> p < 0.05 compared to STZ-CNZ (Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U-test)

Table1 Individual DI values and number of cells found in each damage class in the Control group

<i>Rats</i>	<i>DI</i>	<i>Damage Class</i>				
		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1	33	67	33	0	0	0
2	31	73	26	0	0	0
3	31	70	29	1	0	0
4	40	62	36	2	0	0
5	34	66	34	0	0	0
6	34	68	30	2	0	0
7	37	63	37	0	0	0
8	42	67	26	5	2	0
9	35	72	21	7	0	0
$\Sigma$		608	272	17	2	0

DI: damage index

Table 2 Individual DI values and number of cells found in each damage class in the STZ group

<i>Rats</i>	<i>DI</i>	<i>Damage Class</i>				
		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1	75	44	39	15	2	0
2	74	46	34	20	0	0
3	61	52	38	7	3	0
4	40	68	28	2	0	2
5	59	52	39	6	3	0
6	63	52	37	7	4	0
7	70	50	36	8	6	0
8	31	69	31	0	0	0
9	60	54	34	10	2	0
$\Sigma$		487	316	75	20	2

DI: damage index

Table 3 Individual DI values and number of cells found in each damage class in the STZ group treated with insulin

<i>Rats</i>	<i>DI</i>	<i>Damage Class</i>				
		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1	46	57	40	3	0	0
2	44	58	40	2	0	0
3	50	54	42	4	0	0
4	33	70	27	3	0	0
5	48	56	40	4	0	0
6	45	58	39	3	0	0
7	33	70	27	3	0	0
8	49	56	40	3	1	0
9	45	58	39	3	0	0
10	45	58	39	3	0	0
11	37	66	32	1	1	0
$\Sigma$		661	405	32	2	0

DI: damage index

Table 4 Individual DI values and number of cells found in each damage class in the STZ group treated with clonazepam

<i>Rats</i>	<i>DI</i>	<i>Damage Class</i>				
		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1	44	58	40	2	0	0
2	53	54	41	3	2	0
3	50	54	42	4	0	0
4	55	54	39	5	2	0
5	52	55	40	3	2	0
6	56	53	40	5	2	0
7	53	56	38	3	3	0
8	46	56	42	2	0	0
9	52	55	40	3	2	0
10	48	61	32	5	2	0
$\Sigma$		556	394	35	15	0

DI: damage index

Table 5 Individual DI values and number of cells found in each damage class in the STZ group treated with insulin and clonazepam

<i>Rats</i>	<i>DI</i>	<i>Damage Class</i>				
		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1	40	61	38	1	0	0
2	38	62	38	0	0	0
3	34	67	32	1	0	0
4	34	67	32	1	0	0
5	42	60	38	2	0	0
6	34	70	27	2	1	0
7	40	61	38	1	0	0
8	45	57	41	2	0	0
9	28	74	24	2	0	0
10	48	55	42	3	0	0
11	46	56	42	2	0	0
12	39	62	37	1	0	0
$\Sigma$		752	429	18	1	0

DI: damage index

Fig. 1

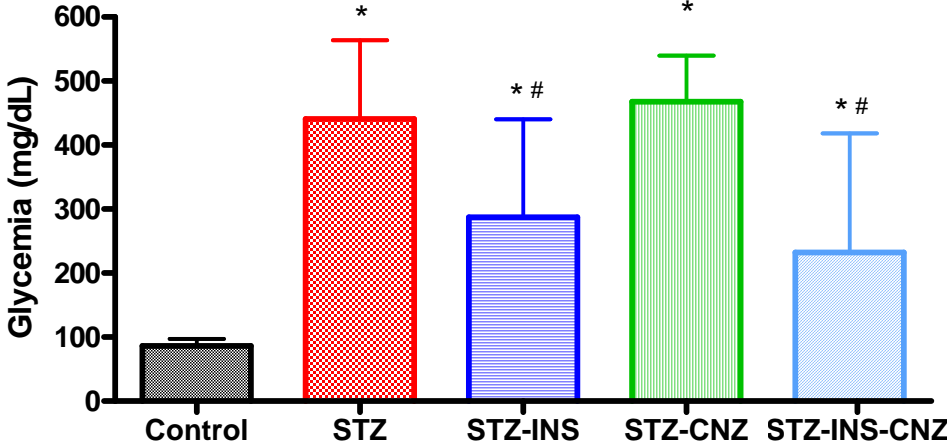
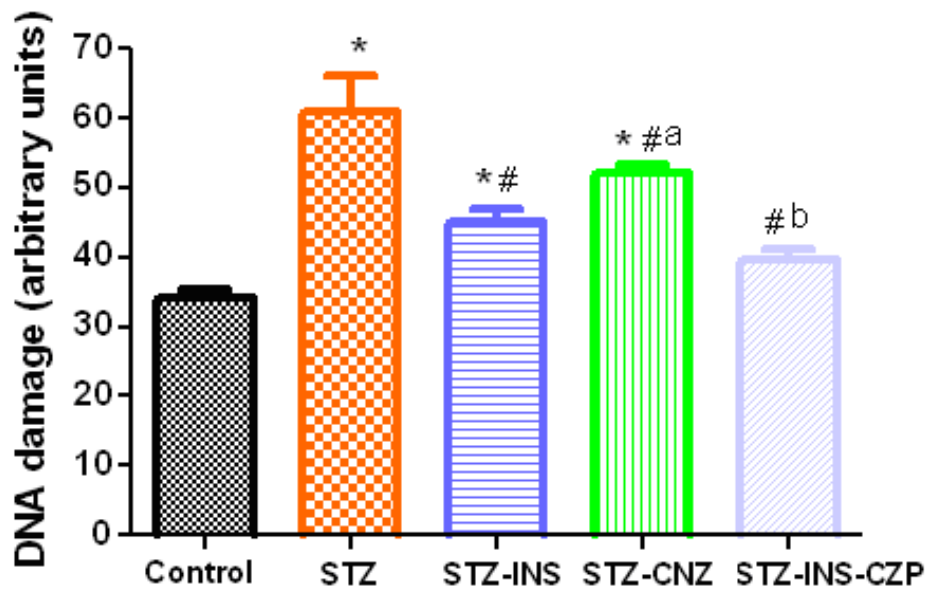




Fig. 2





## 5. DISCUSSÃO GERAL

---



Existem várias evidências indicando que o estresse oxidativo está aumentado no diabetes (MONNIER et al., 2009) e contribui para o desenvolvimento de suas complicações. Ainda, o estresse oxidativo é conhecido por estar envolvido no mecanismo de danos moleculares e celulares em um amplo espectro de doenças humanas (DALLE-DONNE et al., 2006; HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007). A glicação de proteínas, oxidação de lipídeos e outras macromoléculas (DNA) e inflamação são as principais causas de complicações nas pessoas com diabetes tipo 1 ou tipo 2 (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; STETINA et al., 2006). Essas causas podem ser explicadas em virtude da superprodução de ERO e a diminuição das defesas antioxidantes, como resultado da hiperglicemia no decorrer do desenvolvimento do DM (WIERNSPERGER, 2003; RAMAKRISHNA e JAILKHANI, 2007; SADI et al., 2008 ; PAN et al., 2008).

A indução do diabetes em animais experimentais através da administração de estreptozotocina (STZ) vem sendo intensamente utilizada para melhor elucidar a fisiopatologia do diabetes. A resposta metabólica à STZ é trifásica, iniciando com hiperglicemia que dura de 12 a 24 horas, seguida de uma fase marcada pela hipoglicemia decorrente da destruição das células  $\beta$  e conseqüente liberação da insulina armazenada. A terceira, e, última fase, resulta em hiperglicemia permanente e diabetes, dose-dependente, proporcional aos danos causados sobre as células. Os picos hiperglicêmicos estabilizam-se em 72 horas.

Uma das vantagens do estudo do diabetes por STZ em ratos está no fato de que é possível isolar e manipular diretamente variáveis individuais, caracterizando a relação entre elas, além do que, em doses apropriadas, os animais sobrevivem sem insulina. Desta forma, as conseqüências fisiológicas da hiperglicemia crônica e o tratamento com insulina podem ser observados independentemente. Embora devam ser tomados cuidados na extrapolação de resultados obtidos com modelos animais para desordens clínicas em humanos, o estudo do diabetes em animais tem explicado muitas das alterações metabólicas complexas induzidas pelo diabetes. Esse método é de fácil execução e permite a utilização de um grande número de animais, destruindo a parte endócrina do pâncreas, com preservação de sua função exócrina.

Em nosso estudo foi possível evidenciar algumas características clínicas apresentadas pelos animais ao longo do seguimento do modelo de diabetes por STZ. Os animais diabéticos apresentaram progressiva queda em seu estado geral,

quando comparados aos animais não diabéticos. Foi possível notar uma perda inicial de massa corporal após a indução do diabetes, e ganho de massa corporal significativamente menor ( $235,32\text{g} \pm 28,43$ ;  $n=50$ ) em relação aos ratos do grupo controle ( $280,83\text{g} \pm 13,62$ ;  $n=12$ ) após os vinte e um dias de indução do diabetes. A ingestão hídrica por caixa (quatro ratos por caixa) dos animais diabéticos em 24 horas analisada após treze dias da indução do diabetes por STZ apresentou valores significativamente elevados ( $489,28\text{ mL} \pm 101,03$ ;  $n=14$ ), quando comparados com os dos ratos do grupo controle ( $200,00 \pm 86,60$ ;  $n=3$ ). Também observamos alteração na pelagem dos animais diabéticos, pois o pêlo tonou-se menos brilhoso e mais amarelado, muito em função da diurese extremamente elevada desses animais, quando comparado aos do grupo controle.

Estudos anteriores em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, bem como em pacientes, mostraram que o estresse oxidativo está aumentado e é um fator importante na patogênese e progressão da doença (MARITIM et al., 2003; KAMALAKKANNAN e PRINCE, 2003). RAMAKRISHNA e JAILKHANI (2007) relataram que foi observado níveis estatisticamente maiores de grupamentos carbonilas (dano a proteínas) e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (dano a lipídeos) em pacientes diabéticos, sugerindo que a hiperglicemia induz uma alta produção de radicais livres de oxigênio, e conseqüentemente, aumenta a oxidação de proteínas e lipídeos. Ainda, observaram uma diminuição estatisticamente significativa na concentração média do *status* antioxidante total (vitaminas A, C, E;  $\beta$ -caroteno, CAT, SOD e GSH-Px) desses pacientes diabéticos, quando comparado com o grupo controle. BALKIS e col. (2008) relataram que em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, os parâmetros de estresse oxidativo (MDA e o tamanho da cauda no ensaio cometa) foram maiores e o *status* antioxidante (SOD e vitamina C) foi inferior quando comparado com ratos não-diabéticos. Além disso, pesquisas com modelos experimentais que estudam os efeitos do diabetes não controlado na fisiopatologia da doença tem demonstrado que o diabetes diminui a capacidade antioxidante do cérebro de ratos, provoca grandes alterações neuroquímicas e estruturais e, ainda, proporciona déficits de memória e aprendizado nesses animais (ZARROS et al., 2009). Neste contexto, estudos prévios do nosso laboratório mostraram um aumento significativo de TBARS, um parâmetro de medida de peroxidação lipídica, e uma redução significativa da reatividade antioxidante total (TAR) em plasma de ratos diabéticos induzidos por

estrepozotocina submetidos ao teste de natação forçada, um modelo experimental de depressão, e o clonazepam, um modulador positivo do receptor GABA<sub>A</sub> reverteu essas alterações (HAESER et al., 2007).

Considerando que a insulina tem um efeito sobre as funções cognitivas (LARON, 2009) modulando o transporte sináptico de GABA e/ou de glutamato, com um papel neuroprotetor em condições oxidativas e/ou no diabetes (DUARTE et al. 2004) e que CNZ exerce efeito protetor sobre o estresse oxidativo, diminuindo o tempo de imobilidade no FST de ratos diabéticos (HAESER et al. 2007), nosso objetivo neste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento agudo da insulina e/ou do CNZ sobre o dano oxidativo em proteínas, lipídeos e no DNA de ratos diabéticos induzidos por estreptoizotocina submetidos ao teste de natação forçada. Cabe salientar que este é o primeiro trabalho em que foi avaliado o efeito dessas drogas sob estes parâmetros de estresse oxidativo neste modelo experimental.

Quando os animais são submetidos ao teste de natação forçada (FST), modelo proposto por Porsolt e colaboradores (1977), apresentam um comportamento do tipo depressivo, que pode ser revertido pelo emprego de antidepressivos. Em um primeiro momento os animais permanecem num aquário durante 15 minutos, etapa chamada de “treino” ou “pré-teste”, com o objetivo de ambientar o animal a este evento. Após 24 horas os animais são recolocados no aquário, em seguida recebem três doses consecutivas do fármaco a ser avaliado (insulina e/ou clonazepam, no nosso caso), 24 horas, 5 horas e 1 hora antes da etapa “teste”, que tem duração de 5 minutos. Quando são submetidos a esta etapa na ausência de qualquer tipo de tratamento se observa um predomínio da imobilidade dos animais frente a uma situação aversiva, o que estaria relacionado com um comportamento do tipo depressivo. Este comportamento de imobilidade, onde o animal realiza apenas movimentos suficientes para permanecer com o focinho para fora da água e, então respirar, representaria um estado de desesperança frente a esta situação, que se segue de um período de hipolocomoção e hipotermia.

Além da observação do tempo total de imobilidade no “teste”, pode-se aferir a latência para imobilidade (CONTRERAS *et al.*, 1998). Neste caso, considera-se o tempo que o animal leva, desde sua introdução na água, até ficar completamente imóvel. Fármacos com atividade antidepressiva prolongam o tempo para que o animal apresente pela primeira vez o comportamento de imobilidade.

Evidências de que CNZ reverte o tempo de imobilidade e não altera a glicemia em ratos diabéticos submetidos a FST vem sendo demonstradas (GOMEZ e BARROS, 2000; HAESER et al. 2007). Nossos resultados mostraram que ratos diabéticos induzidos por STZ realmente apresentaram maior tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle. A associação do tratamento agudo com insulina e CNZ foi capaz de reverter parcialmente esse efeito. Além disso, a latência para imobilidade corrobora para o resultado acima citado, mostrando que o grupo STZ apresentou menor tempo de latência para imobilidade quando comparado ao grupo controle. Esse comportamento, bem como a duração total do tempo da imobilidade reflete um comportamento do tipo depressivo nos animais, o que pode ser revertido através do uso de antidepressivos. Neste contexto, o grupo STZ-INS-CNZ apresentou maior tempo de latência para imobilidade, quando comparado ao grupo STZ. Estes resultados permitem sugerir que a associação de insulina e CNZ tem um possível efeito antidepressivo importante sob o comportamento do tipo depressivo neste modelo experimental.

O dano oxidativo às proteínas pode afetar a função de receptores, enzimas, proteínas de transporte, e pode gerar novos antígenos que podem provocar respostas imunológicas. Ainda, pode contribuir para danos secundários a outras biomoléculas, como por exemplo, a inativação de enzimas de reparo do DNA e perda de fidelidade do DNA, danificando a replicação de DNA polimerases (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A oxidação de proteínas está envolvida na patogênese de um grande número de doenças, incluindo diabetes (WITKO-SARSAT et al., 1998; KALOUSOVA et al., 2002; CAKATAY, 2005). Em nosso estudo foi determinado o nível de oxidação de proteínas através da medida do conteúdo de proteínas carboniladas no plasma. Verificou-se uma concentração significativamente maior de grupamentos carbonilas no grupo STZ quando comparado ao grupo controle e que o tratamento com insulina e/ou CNZ reduziu significativamente o conteúdo de grupamentos carbonilas.

Muitos tipos diferentes de oxidação de proteínas podem ser induzidos pelos radicais livres. A medida do conteúdo de grupamentos carbonilas é o parâmetro mais utilizado como biomarcador de dano oxidativo severo a proteínas, sendo considerado um marcador precoce e de oxidação estável de proteínas (CAKATAY, 2005; PAN et al. 2008). Os grupamentos carbonilas podem surgir como resultado de glicação de proteínas por açúcares, pela ligação de aldeídos (incluindo muitos



daqueles formados durante a peroxidação lipídica) às proteínas e pela oxidação direta de cadeias laterais de aminoácidos por espécies reativas para gerar produtos como o glutamato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Assim, nossos resultados permitem sugerir que ocorra dano a proteínas em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos ao teste de natação forçada e que a insulina e o clonazepam tem uma ação protetora sobre esses danos. Os resultados das dosagens dos grupamentos carbonilas foram correlacionados aos níveis de glicemia dos animais. Todavia, não houve correlação estatisticamente significativa entre esses dois parâmetros.

A peroxidação lipídica é um processo complexo a qual é iniciada pelo ataque de radicais livres a lipídeos de membrana, gerando grandes quantidades de produtos reativos, que tem sido relatado no diabetes e nas suas complicações. A oxidação de lipídeos pode ser avaliada através de diversas maneiras, dentre elas, pode-se citar a medida dos níveis de malondialdeído (MDA) por “*High Pressure Liquid Chromatographic*” (HPLC). Esta metodologia consiste num dos melhores parâmetros de análise de dano a lipídeos, pois tem uma alta especificidade e sensibilidade na dosagem do MDA no plasma, quando comparado a métodos espectrofotométricos, proporcionando uma análise muito mais fidedigna deste parâmetro de estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

MDA é um produto da decomposição da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados que pode reagir com bases de DNA, o que pode vir a induzir lesões mutagênicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O aumento dos níveis séricos de MDA foi encontrado em pacientes com diabetes mellitus (SUNDARAM et al., 1996; KEDZIORA-KORNATOWSKA et al., 1998; BHATIA et al., 2003; PAN et al. 2008). Em nosso estudo encontramos níveis plasmáticos de MDA significativamente mais elevados em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) e no grupo STZ-CNZ, quando comparados aos ratos do grupo controle. A insulina isoladamente ou em associação com CNZ diminuiu significativamente os níveis plasmáticos de MDA. O grupo STZ-INS-CNZ apresentou níveis plasmáticos de MDA significativamente menor do que o grupo STZ-INS, sugerindo que CNZ quando administrado em associação com a insulina tem um possível efeito importante contra a peroxidação lipídica. É importante ressaltar que uma correlação positiva significativa foi observada entre a glicemia e os níveis de MDA dos ratos diabéticos induzidos por

STZ ( $r = 0,4035$ ), demonstrando que o dano a lipídeos (lipoperoxidação) está relacionado com a hiperglicemia dos animais.

Para controlar o fluxo de ERO, as células aeróbicas desenvolveram um sistema de defesa antioxidante, que inclui componentes enzimáticos e não-enzimáticos (AHMED, 2005). CAT, SOD e GSH-Px são as principais enzimas que removem e protegem as células dos radicais livres (SADI et al., 2008). A enzima SOD catalisa a dismutação do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A enzima CAT é responsável pela decomposição direta do  $H_2O_2$ , formando água ( $H_2O$ ). A enzima GSH-Px catalisa a decomposição de peróxidos através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH) formando glutathiona oxidada (GSSG). Fisiologicamente a GSH-Px atua acoplada a enzima glutathiona redutase (GR) que, por sua vez, catalisa a redução da GSSG, usando NADPH como enzima (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A estabilidade e a capacidade dos antioxidantes durante o estado crônico do diabetes influencia significativamente o resultado das complicações a longo prazo causados pelo estresse oxidativo (SASVÁRI e NYAKAS, 2003). Nossos resultados das atividades das enzimas antioxidantes neste modelo agudo de diabetes induzido por estreptozotocina em ratos tratados ou não com insulina e/ou CNZ não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

O DNA é uma molécula que pode ser facilmente lesada, visto que é alvo de ataques de radicais livres. Esta situação pode vir a gerar mutações e morte celular. O ensaio cometa pode ser aplicado diretamente às células e avaliando as quebras na fita de DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Estudos através do ensaio cometa mostraram níveis aumentados de quebra de DNA em linfócitos do sangue periférico de pacientes diabéticos com perfil glicêmico descontrolado, mas não nos pacientes com glicemia normal (ANDERSON, 1998; SAYDAH, 2003). DANDONA e colaboradores (1996) relataram que em pacientes com DM do tipo 1 e tipo 2, os danos oxidativos do DNA foram mais elevados do que no grupo controle saudável. Pacientes do sexo masculino e feminino com DM tipo 1 foram investigados por DINÇER e colaboradores (2003) e foi verificado que o dano ao DNA em leucócitos mononucleares, analisados pelo teste do ensaio cometa, aumentou significativamente em comparação com o grupo controle saudável.

Foi verificado em nosso estudo níveis significativamente maiores de migração de DNA e, desse modo, dano ao DNA, em leucócitos do grupo diabético induzido

por estreptozotocina (STZ) quando comparado ao grupo controle. O aumento da migração de DNA pode ser associado com os locais de reparação incompletos, que são gerados como um passo intermediário durante a ação de diferentes sistemas de reparo do DNA (TICE et al., 2000). A literatura descreve o dano ao DNA em ratos diabéticos (WU et al., 2006; FIDAN et al., 2008; BALKIS et al., 2008). Além disso, os animais STZ tratados com insulina ou clonazepam apresentaram uma diminuição significativa no índice de dano, quando comparados com os não tratados. O tratamento de ratos diabéticos com insulina + clonazepam reverteu o índice de dano ao DNA para níveis estatisticamente iguais aos apresentados pelo grupo controle. Cabe salientar que este é o primeiro trabalho em que foi avaliado o dano no DNA de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos ao FST e o efeito da insulina e de um benzodiazepínico (CNZ) sobre este dano.

No ensaio cometa, as células são classificadas visualmente em quatro classes, de acordo com o tamanho da cauda: tamanho 0 - sem dano; tamanho 4 – máximo dano, e, a partir disso, calcula-se o índice de dano ao DNA (SINGH et al., 1988). Ao analisar a distribuição de classe de danos em cada um dos grupos estudados, pode-se observar um predomínio de células com dano do tipo classe 1, refletindo um aumento homogeneamente distribuído no número de células com pouco dano ao invés de um número reduzido de células com dano alto. Por outro lado, um número significativo de células apresentaram dano classe 2 e 3 em ratos diabéticos, quando comparados ao grupo controle e aos grupos diabéticos tratados com insulina ou clonazepam. Além disso, apenas um animal do grupo diabético apresentou células com dano classe 4. Neste contexto, cabe salientar que a associação dos dois tratamentos (insulina + CNZ) apresentou os melhores resultados, em termos de dano oxidativo ao DNA, quando comparado com o tratamento somente com insulina ou somente com CNZ, uma vez que a distribuição de danos de classes tipo 3 e 4 foram muito semelhantes ao grupo controle.

É importante ressaltar que uma correlação positiva significativa foi observada entre a glicemia e o índice de dano ao DNA em ratos diabéticos induzidos por STZ. Assim, nossos resultados reforçam estudos anteriores em diabéticos que mostram que o dano ao DNA pode ser provocado por um evento oxidativo, uma vez que a hiperglicemia leva à alta produção de radicais livres que atacam moléculas essenciais como DNA.

Nossos resultados mostram que o dano oxidativo a proteínas, a lipídios e ao DNA estão aumentados no plasma deste modelo animal experimental de diabetes e depressão e que o tratamento agudo da insulina e do clonazepam associados foi capaz de proteger contra esse processo. O tratamento com a insulina provavelmente está agindo por controlar a glicemia, sendo que o estado hiperglicêmico leva ao estresse oxidativo, aumentando a produção de radicais livres e reduzindo o potencial antioxidante (WIERNSPERGER, 2003). Além disso, o estado hiperglicêmico pode levar, mediante o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes, a glicação de proteínas, a peroxidação lipídica e a danos ao DNA (IMAEDA et al., 2002). Além disso, a insulina poderia estar atuando como um *scavenger* antioxidante, uma vez que foi demonstrado que a aplicação do regime de tratamento intensivo de insulina melhora significativamente a capacidade antioxidante total do plasma, em comparação com a aplicação da terapia convencional de insulina (KOCIC et al., 2007). Foi sugerido por MONNIER e colaboradores (2009) que do ponto de vista clínico, o tratamento com insulina pode ter um efeito benéfico pela inibição da ativação do estresse oxidativo (MONNIER et al., 2009).

HAESER e colaboradores (2007) sugeriram que o CNZ poderia ser clinicamente útil para pacientes diabéticos deprimidos. Além disso, foi demonstrado por estes autores que o CNZ exerce um efeito antioxidante em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos ao FST, protegendo contra a ação dos radicais livres. Isto poderia estar relacionado com a redução dos níveis de GABA, através da destruição dos neurônios GABAérgicos na encefalopatia diabética. Foi descrito, também, que o CNZ pode diminuir significativamente a tolerância à glicose, e a secreção de insulina em voluntários (CHEVASSUS et al., 2004). Além disso, animais diabéticos apresentam baixos níveis de GABA no SNC (PEARCE et al., 2004), bem como uma redução de dopamina e serotonina. Assim, é possível supor que o estresse oxidativo pode levar à destruição dos neurônios GABAérgicos, que poderiam estar envolvidos na fisiopatologia da depressão em diabéticos e que CNZ associado com insulina poderia ter uma ação protetora sobre este processo. Os resultados de nosso estudo permitem sugerir que a associação de insulina e CNZ poderia ser clinicamente útil para pacientes diabéticos deprimidos, protegendo contra a ação de ERO, que podem contribuir para o desenvolvimento e as complicações do diabetes.

Em conclusão, este trabalho fornece a primeira evidência experimental que o estresse oxidativo está aumentado em ratos diabéticos induzido por estreptozotocina submetidos ao teste de natação forçada e que o tratamento com insulina e clonazepam em associação é capaz de proteger contra o dano oxidativo a proteínas, lipídios e ao DNA nesse modelo experimental.



## **6. CONCLUSÕES**

---





## **6.1) CONCLUSÕES ESPECÍFICAS**

- a) Através da determinação do conteúdo de grupamentos carbonilas, pode-se concluir que ocorre dano a proteínas no plasma de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos ao teste de natação forçada e que o tratamento agudo com insulina e/ou clonazepam tem uma ação protetora sobre esse dano;
- b) Através da determinação dos níveis de malondialdeído, pode-se concluir que ocorre dano a lipídeos no plasma de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos ao teste de natação forçada e que o tratamento agudo com insulina, isoladamente, ou em associação com o clonazepam, tem uma ação protetora sobre a lipoperoxidação nesses animais;
- c) Através da determinação da atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase), pode-se concluir que não há diferenças significativas entre os grupos tratados ou não com insulina e/ou clonazepam neste modelo agudo de diabetes induzido por estreptozotocina em ratos;
- d) Através da determinação do índice de dano ao DNA pelo ensaio cometa, pode-se concluir que ocorre dano ao DNA de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos ao teste de natação forçada e que o tratamento agudo com insulina e/ou clonazepam tem uma ação protetora sobre esse dano nesses animais;
- e) Através da análise etológica dos animais pela avaliação do tempo de imobilidade e de latência para a imobilidade, pode-se concluir que em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos ao teste de natação forçada apresentam comportamento do tipo depressivo e que a associação do tratamento agudo com insulina e clonazepam foi capaz de reverter parcialmente esse efeito;

- f) Através de análises estatísticas de correlação entre os parâmetros de estresse oxidativo e a glicemia dos animais submetidos ao modelo experimental de diabetes e depressão tratados ou não com insulina e/ou clonazepam, pode-se concluir que não há correlação estatisticamente significativa entre o conteúdo de carbonilas (dano a proteínas) e os níveis de glicemia no referido modelo animal experimental; em contrapartida, há correlação positiva entre os níveis de glicemia e os níveis de MDA (dano a lipídeos), assim como com o índice de dano ao DNA nesse modelo animal experimental de diabetes e depressão.

## **6.2) CONCLUSÃO GERAL**

Este trabalho fornece de forma pioneira evidências experimentais de que o tratamento com insulina e clonazepam em associação é capaz de proteger contra o estresse oxidativo (dano oxidativo a proteínas, a lipídeos e ao DNA), que está aumentado em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina submetidos ao teste de natação forçada.

## **7. PERSPECTIVAS**

---



Pretendemos dar continuidade a este trabalho, através da investigação do efeito da insulina e do clonazepam sobre o dano oxidativo no cérebro de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e submetidos ao modelo animal experimental depressão, o teste de natação forçada. Desse modo, pretende-se avaliar o estresse oxidativo em tecidos cerebrais (córtex, hipocampo e estriado) dos animais através dos seguintes parâmetros:

A) Dano a lipídeos:

- a) Determinação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- b) Determinação de malondialdeído (MDA);
- c) Determinação da quimiluminescência;

B) Dano a proteínas:

- a) Medida dos grupamentos carbonilas;
- b) Medida dos grupamento sulfidrilas;

C) Status antioxidante:

- a) Determinação do potencial antioxidante total (TRAP);
- b) Determinação da medida da reatividade antioxidante total (TAR);
- c) Medidas de atividades enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase);
- d) Medida da glutathione (GSH);

D) Marcadores Bioquímicos:

- a) Medida de glicose;
- b) Medida de insulina;

E) Dano ao DNA:

- a) Ensaio Cometa.



## 8. REFERÊNCIAS

---







AHMED, R.G. The physiological and biochemical effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. **Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences**. V. 15, p. 31-42, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. V.33. S. 1, 2010.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Text Revision. 4<sup>th</sup> ed. Washington DC: **American Psychiatry Press**, 2000.

ANDERSON, D.; YU, T. W.; WRIGHT, J.; IOANNIDES, C. An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients. **Mutation Research**. V. 398, p. 151-161, 1998.

ARTOLA, A. Diabetes-, stress- and ageing-related changes in synaptic plasticity in hippocampus and neocortex - the same metaplastic process? **European Journal of Pharmacology**. V. 585, p.153–162, 2008.

BALKIS, S.B.; FADILAH, R.N.; EZLAN, A.; KHAIRUL, O.; MOKHTAR, A.B.; JAMALUDIN, M. Oxidative Stress and DNA Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effects of Alpha Lipoic Acid. **Journal of Biological Sciences**. V. 8, p. 622-627, 2008.

BARSCHAK, A. G.; SITTA, A.; DEON, M.; BARDEN, A. T.; DUTRA-FILHO, C. S.; WAJNER, M.; VARGAS, C. R. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. **Metabolic Brain Disease**. V. 23, p. 71-80, 2008.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, V. 78, p. 547-581, 1998.

BEN-MENACHEM, E.; KYLLERMAN, R.; MARKLEIND, S. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase function in progressive myoclonus epilepsies. **Epilepsy Research**. V. 40, p. 29-33, 2000.

BHATIA, S.; SHUKLA, R.; VENKATA, M. S.; KAUR, G. J.; MADHAVA, P. K. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. **Clinical Biochemistry**. V. 36, p. 557–562, 2003.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G.; CASH, T. P.; PAN, Y.; SIMON, M. C. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. V. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIESSELS, G.J.; VAN DER HEIDE, L.P.; KAMAL, A.; BLEYS, R.L.; GISPEN, W.H. Aging and diabetes: implications for brain function. **European Journal of Pharmacology**. V. 441, p. 1-14, 2002.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; BEAUDEUX, J.L.; THEROND, P. PEYNET, J.; LEGRAND, A.; DELATTRE, J. Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. V. 62, p. 147–157, 2004.

BRAMBILLA, P.; PEREZ, J.; BARALE, F.; SCHETTINI, G.; SOARES, J. C. GABAergic dysfunction in mood disorders. **Molecular Psychiatry**. V. 8, p. 721-737, 2003.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. V. 414, p.813-820, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**. V. 54, p. 1615-1625, 2005.

CAKATAY, U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. **Diabetes & Metabolism**. V. 31, p. 551–557, 2005.

CARNETHON, M. R.; KINDER, L. S.; FAIR, J. M.; STAFFORD, R. S.; FORTMANN, S. P. Symptoms of depression as a risk factor for incident diabetes: findings from the National Health and Nutrition Examination Epidemiologic Follow-up Study, 1971–1992. **American Journal of Epidemiology**. V. 158, p. 416–423, 2003.

CASH, T. P.; PAN, Y.; SIMON, M. C. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 43, p. 1219-1225, 2007.

CHEVASSUS, H.; MOURAND, I.; MOLINIER, N.; LACARELLE, B.; BRUN, J.F.; PETIT, P. Assessment of single-dose benzodiazepines on insulin secretion, insulin sensitivity and glucose effectiveness in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized cross-over trial. **BMC Clinical Pharmacology**. V. 4, p. 1-10, 2004.

CHIHUAILAF, R.; CONTRERAS, P.; WITWER, F. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación em salud animal. **Veterinaria México**. V. 33, p. 265-286, 2002.

COMMONER, B.; TOWNSE, J.; PAKE, G. E. Free Radicals in Biological Materials. **Nature**. V. 174, p. 689-691, 1954.

CONTRERAS, C.M.; MARTÍNEZ-MOTA, L.; SAAVEDRA, M. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. V. 22, n. 7, p. 1121-1128, 1998.

CRYAN, J. F.; KAUPMANN, K. Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression, **Trends in Pharmacology Science**, V. 26, n. 1, p. 36-43, 2005.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clinical Chemistry**. V. 52, p. 601-623, 2006.

DANDONA, P.; THURU, K.; COOK, S.; SNYDER, B.; MAKOWSKI, J.; ARMSTRONG, D.; NICOTERA, T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. **Lancet**. V. 347, p. 444–445, 1996.

DAVIS, S. N. Insulin, Oral Hypoglycemic agents, and the pharmacology of the Endocrine Pâncreas. In: **Goodman & Gilman's: The pharmacological basic of therapeutics**. 11<sup>th</sup> ed.; McGraw-Hill: New York, 2006.

DEON, M.; SITTA, A.; BARSCHAK, A. G.; COELHO, D.; PIGATTO, M.; SCHMITT, G. O.; JARDIM, L. B.; GIUGLIANI, R.; WAJNER, M.; VARGAS, C. R. [Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy](#). **International Journal of Developmental Neuroscience**. V. 7, p.441-444, 2007.

DINÇER, Y.; AKÇAY, T.; İLKOVA, H.; Alademir, Z.; Ozbay, G. DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus. **Mutation Research**. V. 527, p. 49–55, 2003.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, V. 82, p. 47-95, 2002.

DUARTE, A. I.; SANTOS, M. S.; SEICA, R.; OLIVEIRA, C. R. Oxidative stress affects synaptosomal gamma-aminobutyric acid and glutamate transport in diabetic rats: the role of insulin. **Diabetes**. V. 53, p. 2110–2116, 2004.

EVERSON-ROSE, S. A.; TORRENS, J. I.; MEYER, P. M.; KRAVITZ, H. M.; POWELL, L. H.; BROMBERGER, J. T.; PANDY, D.; MATTHEWS, K. A. Depressive symptoms, insulin resistance and risk of diabetes in women at midlife. **Diabetes Care** V. 27, p.2856–2862, 2004.

FIDAN, A.; DÜNDAR, Y. The effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* on DNA damage, protein oxidation, lipid peroxidation, and some biochemical

parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Diabetes Complications**. V. 22, p.: 348–356, 2008.

FONTELLA, F. U.; PULROLNIK, V.; GASSEN, E.; WANNMACHER, C. M. D.; KLEIN, A. B.; WAJNET, M.; DUTRA-FILHO, C. S. Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats. **Neurochemistry**. V. 11, p. 541-544, 2000.

GERBER, R.H.; HARE, T.A. CSF GABA in normal subjects and patients with depression, schizophrenia, mania, and anorexia nervosa. **American Journal of Psychiatry**, V. 138, p. 1098-1101, 1981.

GOLDEN, S. H.; LAZO, M.; CARNETHON, M.; BERTONI, A. G. B.; SCHREINER, P. J.; ROUX, A. V. D. R.; LEE, H. B.; LYKETSOS, C. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. **JAMA**. V. 299, p. 2751-2759, 2008.

GOMEZ, R. and BARROS, H. M. Clonazepam increases *in vivo* striatal extracellular glucose in diabetic rats after glucose overload. **Pharmacology Biochemical Behaviour**. V. 76, p. 443-450, 2003.

GOMEZ, R.; VARGAS, C. R.; WAJNER, M.; BARROS, H. M. Lower *in vivo* brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. **Brain Research**. V. 968, p. 281-284, 2003.

GUYOT, L. L.; DIAZ, F. G.; O'REGAN, M. H.; SONG, D.; PHILLIS, J. W. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the release of excitotoxic and other amino acids from the ischemic rat cerebral cortex. **Neurosurgery**. V. 48, p. 385-391, 2001.

HAESER, A. S.; SITTA, A.; BARSCHAK, A. G.; DEON, M.; BARDEN, A. T.; SCHMITT, G. O.; LANDGRAFF, S.; GOMEZ, R.; BARROS, H. M. T.; VARGAS, C. R. Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test: the clonazepam effect. **Brain Research**. V. 1154, p. 335-338, 2007.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant physiology**. V. 141, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in biology and medicine**. 4 ed. New York: Oxford University Press, 2007. 851p.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**. V. 142, p. 231-55, 2004.

HASNIS, E.; BAR-SHAY, M.; BURBEA, A.; REZNICK, A.Z. Mechanisms underlying cigarette smoke-induced NK-kB activation in human lymphocytes: the role of reactive nitrogen species. **Journal of Physiology and Pharmacology**. V. 58, p. 275-287, 2007.

HILAKIVI-CLARKE, L.A.; WOZNIAK, K.M.; DURCAN, M.J.; LINNOILA, M. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. **Physiological Behaviour**. V. 48, p. 429-433, 1990.

IMAEDA, A.; KANEKO, T.; AOKI, T.; KONDO, Y.; NAGASE, H. DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice. **Food and Chemical Toxicology**. V. 40, n.7, p. 979-987, 2002.

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

KALIA, M. Neurobiological basis of depression: an update. **Metabolism**. V.54, n. 5, S. 1, p. 24-27, 2005.

KALOUSOVA, M.; SKRHA, J.; ZIMA, T. Advanced glycation endproducts and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. **Physiological Research**. V. 51, p. 597–604, 2002.

KAMALAKKANNAN, N.; PRINCE, P.S. Hypoglycaemic effect of water extracts of *Aegle marmelos* fruits in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 87, p. 207-10, 2003.

KAWAKAMI, N.; TAKATSUKA, N.; SHIMIZU, H.; ISHIBASHI, H. Depressive symptoms and occurrence of type 2 diabetes among Japanese men. **Diabetes Care**. V. 22, p. 1071–1076, 1999.

KEDZIORA-KORNATOWSKA, K. Z.; LUCIAK, M.; BLASZCZYK, J.; PAWLAK, W. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**. V. 13, p.2829–2832, 1998.

KOCIC, R.; PAVLOVIC, D.; KOCIC, G. Impact of intensive insulin treatment on the development and consequences of oxidative stress in insulin-dependent diabetes mellitus. **Vojnosanit Pregled**. V. 64, p. 623-628, 2007.

KRYSTAL, J. H., SANACORA, G., BLUMBERG, H., ANAND, A., CHARNEY, D. S., MAREK, G., EPPERSON, C. N., GODDARD, A., MASON, G. F. Glutamate and

GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. **Molecular Psychiatry**, v. 7, p. 71-80, 2002.

KUHAD, A.; CHOPRA, K. Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: involvement of NFkB signaling pathway. **Life Science**. V. 27, p. 9-10, 2009.

LARON, Z. Insulin and the brains. **Archives of Physiology And Biochemistry**. V. 2, p. 112-116, 2009.

LLOYD, K.G.; ZIVKOVIC, B.; SCATTON, B.; MORSELLI, P.L.; BARTHOLINI, G. The gabaergic hypothesis of depression. **Prognostic in Neuropsychopharmacology Biology Psychiatry**, V. 13, p. 341-351, 1989.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants : a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. V. 17, p. 24-38, 2003.

MCCAFFERY, J. M.; NIAURA, R.; TODARO, J.F.; SWAN, G. E.; CARMELLI, D. Depressive symptoms and metabolic risk in adult male twins enrolled in the National Heart, Lung, and Blood Institute Twin Study. **Psychosomatic Medicine**. V. 65, p.490–497, 2003.

MILES, W. R.; ROOT, H. F. Psychologic tests applied to diabetic patients. **Archives of Internal Medicine**. V. 30, p. 767–777, 1922.

MONNIER, L.; COLETTE, C.; MAS, E.; MICHEL, F.; CRISTOL, J.P.; BOEGNER, C.; OWENS, D.R. Regulation of oxidative stress by glycaemic control: evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy. **Diabetologia** (in press), 2009.

PAN, H. Z.; ZHANG, H.; CHANG, D.; LI, H.; SUI, H. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. **British Journal of Ophthalmology**. V. 92, p.548–551, 2008.

PARENT, M. B.; MASTER, S.; KASHLUB, S.; BAKER, G. B. Effects of antidepressant/antipanic drugs phenelzine and its putative metabolite phenylethyldrazine on extracellular  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in the striatum. **Biochemical Pharmacology**, V. 63, p. 57-64, 2002.

PARKER, G.; BROTHIE, H. Major depression invites major concerns. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. V. 31, S. 1, p. 3-6, 2009.

PEARCE, D.A.; ATKINSON, M.; TAGLE, D.A. Glutamic acid decarboxylase autoimmunity in Batten disease and other disorders. **Neurology**. V. 63, n.11, p. 2001-2005, 2004.

PETROFF, O. A. GABA and glutamate in the human brain. **Neuroscientist**. V. 8, n. 6, p. 562–573, 2002.

PETTY, F.; KRAMER, G. L.; FULTON, M.; MOELLER, F. G.; RUSH, A. J. Low plasma GABA is a trait-like marker for bipolar illness. **Neuropsychopharmacology**, V. 9, p. 125-132, 1993.

PETTY, F.; KRAMER, G. L.; GULLION, C. M.; RUSH, A. J. Low plasma  $\gamma$ -aminobutyric acid levels in male patients with depression. **Biological Psychiatry**, V. 32, p. 354-363, 1992.

POON, H. F.; CALABRESE, V.; SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, D. A. Free radicals and brain aging. **Clinics in Geriatric Medicine**. V. 20, p.329-359, 2004.

PRZEDBORSKI, S.; DONALDSON, D.B.S.; JAKOWEC, M.; KISH, S.J.; GUTTMAN, M.; ROSOKLIJA, G.; HAYS, A.P. Brain Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Annals of Neurology**. V. 39, p. 158-165, 1996.

RAJTAR, G.; ZOLKOWSKA, D.; KEINROK, Z. Effect of diazepam and clonazepam on the function of isolated rat platelet and neutrophils. **International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**. V. 8, p. 37–44, 2002.

RAMAKRISHNA, V.; JAILKHANI, R. Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients. **Diagnostic Pathology**. V. 2:22, p. 1-6, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5<sup>th</sup> ed.; José Magalhães da Silva Moreira: Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Free Radicals and Antioxidants in Muscular and Neurological Diseases and Disorders. In: G. Pilo, E. Albano, M.U. Dianzani. **Free Radicals: From Basic Science to Medicine**. Birkhäuser: Basel, 1993.

SADI, G.; YIMAZ, O.; GÜRAY, T. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. **Molecular and Cellular Biochemistry**. V. 309, p. 109-116, 2008.

SASVÁRI, M.; NYAKAS, C. Time dependent changes in oxidative metabolism during chronic diabetes in rats. **Acta Biologica Szegediensis**. V. 47, p. 153-158, 2003.

SAYDAH, S.H.; PLATZ, E.A.; RIFAI, N.; POLLAK, M.N.; BRANCATI, F.L.; HELZSOURER, K.J.; Association of markers of insulin and glucose control with



subsequent colorectal cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 12: 412-418, 2003.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress responses--what have genome-scale studies taught us? **Genome Biology**. V. 3, p. 1-7, 2002.

SHEHATAH, A.; RABIE, M. A.; AL-SHAHRY, A. Prevalence and correlates of depressive disorders in elderly with type 2 diabetes in primary health care settings. **Journal of Affective Disorders** (in press), 2009.

SHIAH, L-S.; YATHAM, L.N. GABA function in mood disorders: an uptake and critical review. **Life Science**, V. 63, p. 1289-1303, 1998.

SIES, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. **New York, Academic press**, 1991.

SIMA, A. A.; KAMIYA, H.; LI, Z. G. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. **European Journal of Pharmacology**. V. 490, p. 187–197, 2004.

SITTA, A.; BARSCHAK, A. G.; DEON, M.; DE MARI, J. F.; BARDEN, A. T.; VANZIN, C. S.; BIANCINI, G. B.; SCHWARTZ, I. V.; WAJNER, M.; VARGAS, C. R. L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. **Cellular & Molecular Neurobiology**. V. 2, p.211-218, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Número de diabéticos. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/para-o-publico/calculadoras/numero-de-diabeticos>.

Acesso em: 7 de jan. 2010.

STETINA, R.; VARVAROVSKA, J.; RUSAVY, Z.; POMAHACOVA, R.; RACEK, J.; LACIGOVÁ, S.; TREFIL, L.; SIALA, K.; STOZICKY, F. Oxidative Stress, DNA damage and DNA repair capacity in children with type 1 diabetes mellitus. **Toxicology Letters**. V.164, S.1, p. 134, 2006.

STEWART, R., LIOLITSA, D. Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. **Diabetic Medicine**. V. 16, p. 93–112, 1999.

STRACHAN, M. W.; DEARY, I. J.; EWING, F. M.; FRIER, B. M. Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? A critical review of published studies. **Diabetes Care**. V. 20, p. 438–445, 1997.

SUAREZ, E. C. Sex differences in the relation of depressive symptoms, hostility, and anger expression indices of glucose metabolism in nondiabetics. **Health Psychology** V. 25. p. 484–492, 2006.

SUNDARAM, R. K.; BHASKAR, A.; VIJAYALINGAM, S.; VISWANATHAN, M.; MOHAN, R.; SHANMUGASUNDARAM, K. R. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. **Clinical Science**. V. 4, p. 255–260, 1996.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of rat pancreas. **Physiological Research**. V.50, p. 537-546, 2001.

TICE, R.R.; AGURELLE, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. V. 35, p. 206-221.

TUNNICLIFF, G.; MALATYNSKA, E. Central GABAergic systems and depressive illness. **Neurochemistry Research**, V. 28, p. 965-976, 2003.

VAN DYCK, S. M. O.; ADAMS, C. A. Dietary antioxidants: antiradical active nutrients. **Zootecnia**. V.11, p. 15-19, 2003.

VAN TILBURG, M. A. L., GEORGIADES, A., SURWIT, R. S. Depression in type 2 diabetes. In **Type 2 Diabetes Mellitus: Evidence-Based Approach to Practical Management**. Feinglos M, Bethel MA, Eds. Totowa, NJ, Humana Press, 2007.

WIERNSPERGER, N.F. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. **Diabetes & Metabolism**. V. 29, p. 579-585, 2003.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; KHOA, T.N.; CAPELLÈRE-BLANDIN, C.; NGUYEN, A.T.; CANTELOUP, S.; DAYER, J.M.; JUNGERS, P.; DRÜEKE, T.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **Journal of Immunology**. V. 161, p. 2524–2532, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programmes and projects. Diabetes Programme. Prevalence of diabetes worldwide. Disponível em: [http://www.who.int/diabetes/facts/world\\_figures/en/](http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/). Acesso em: 7 de jan. 2010b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programmes and projects. Mental Health. Disorders Management. Depression. Disponível em: [http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/). Acesso em: 7 de jan. 2010c.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO's Diabetes Programme. Quick Diabetes Facts. Disponível em: <http://www3.who.int/icd/currentversion/fr-icd.htm>. Acesso em: 7 de jan. 2010a.

WU, H.; GUO, H.; ZHAO, R. Effect of Lycium barbarum Polysaccharide on the improvement of antioxidant ability and DNA damage in NIDDM Rats. **Yakugaku Zasshi**. V. 126, n. 5, p. 365-371, 2006.

ZARROS, A.; LIAPI, C.; GALANOPOULOU, P.; MARINOU, K.; MELLIOS, Z.; SKANDALI, N.; AL-HUMADI, h.; ANIFANTAKI, F.; GKROUZMAN, E.; TSAKIRIS, S. Effects od adult-onset streptozotocin-induced diabetes on the rat brain antioxidant status and the activities of acetylcholinesterase, (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)- and Mg<sup>2+</sup> - ATPase: modulation by l-cysteine. **Metabolic Brain Disease**. V. 24, p.337-348, 2009.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**. V. 13, n.414, p.782-787, 2001.







## 9.1) ANEXO 1

### Parecer Consubstanciado de F e Pesquisa

Título do Projeto: Efeito central e periférico da insulina e do clonazepam sobre o estresse oxidativo em modelo animal de diabetes e depressão.

Pesquisador Responsável : Profa. Helena Maria Tannhauser Barros Parecer nº 775/09

Data da Versão 30/09/2008

Cadastro 404/08

Data do Parecer 15/01/2009

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

#### Objetivos do Projeto

Avaliar o efeito da insulina e do clonazepam sobre o estresse oxidativo em animais diabéticos deprimidos

#### Sumário do Projeto

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Outro (citar no comentário)
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Comentário

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Comentário
-----------	------------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Comentário
Tamanho de amostra	Total 126 Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Crítérios de inclusão e exclusão	Ausentes
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Não necessário
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Não

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

---

<b>Cronograma</b>	<b>Comentário</b>
Data de início prevista	04/2008
Data de término prevista	03/2010
<b>Orçamento</b>	Adequado
Fonte de financiamento externa	Agência de fomento

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

<b>Referências Bibliográficas</b>	Adequadas
-----------------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

**Aprovar**

Comentários Gerais sobre o Projeto



## 9.2) ANEXO 2

Comprovante de envio do artigo 1 “Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect” para a revista Metabolic Brains Disease.

Serviço de Genética Médica, HCPA,  
UFRGS  
Rua Ramiro Barcelos, 2350  
CEP 90.035-903, Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel: +55 51 33598011  
Fax: +55 51 33598010  
E-mail: crvargas@hcpa.ufrgs.br

February 18<sup>th</sup>, 2010.

Vilmary Friederichs  
Managing Editor  
Metabolic Brain Disease

Dear Prof. Friederichs,

I am sending you our manuscript entitled “*Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect*” which we would like to submit in Metabolic Brain Disease.

I hereby certify that all authors have approved this version of the manuscript.

I look forward to hearing from you soon.

Yours sincerely,

Carmen Regla Vargas, PhD, MD

### 9.3) ANEXO 3

Comprovante de envio do artigo 2 “DNA Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Submitted to Forced Swimming Test: The Insulin and Clonazepam Effect”.

18-Feb-2010

Dear Mr Yasin Wayhs

Re: Diab-10-0286

DNA Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Submitted to Forced Swimming Test: The Insulin and Clonazepam Effect

Thank you for submitting this manuscript to Diabetologia. We will now begin processing your paper, and will be in touch once a decision has been reached. Since all our correspondence with you will be via e-mail it is essential that you notify us of any changes to your e-mail address.

You can view the status of your manuscript at any time by logging into our online submission and peer-review system, ScholarOne Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/diabetologia> ). Once you have logged into the site, click on your 'Corresponding Author Centre' and follow the link to 'Submitted Manuscripts'. Alternatively, you can contact Charlotte, Shelagh, Michelle or myself in the Editorial Office (e-mail: [diabetologia-j@bristol.ac.uk](mailto:diabetologia-j@bristol.ac.uk); tel: +44 (0)117 9595338).

With best wishes,

Judy

\*\*\*\*\*

Dr Judy Naylor  
Managing Editor, Diabetologia