

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

**EFEITOS DE ANTIDEPRESSIVOS OU DO NADO FORÇADO SOBRE
PARÂMETROS GABAÉRGICOS E DE GLICOSE EM RATOS NÃO
DIABÉTICOS E DIABÉTICOS POR ESTREPTOZOTOCINA**

ROSANE GOMEZ

**Porto Alegre
2003**

**EFEITOS DE ANTIDEPRESSIVOS OU DO NADO FORÇADO SOBRE
PARÂMETROS GABAÉRGICOS E DE GLICOSE EM RATOS NÃO
DIABÉTICOS E DIABÉTICOS POR ESTREPTOZOTOCINA**

DOUTORANDA: ROSANE GOMEZ

ORIENTADORA: HELENA MARIA TANNHAUSER BARROS

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.**

**Porto Alegre
2003**

Aos meus pais, Emílio Henrique (*in memoriam*) e Rosalinda Luiza, pelo incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amigos funcionários da FFFCMPA e da UFRGS, aos meus amigos colegas de pós-graduação, aos meus amigos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, aos meus amigos colegas professores das Faculdades de Fisioterapia, Nutrição e Terapia Ocupacional da Rede Metodista de Educação – IPA e de Medicina da FFFCMPA, aos meus ex e atuais alunos, aos meus amigos parentes: tios, sobrinhos, irmãos e pais, à minha amiga orientadora, aos meus amigos ... simplesmente amigos, e a Deus, que me deu todos esses amigos.

Também agradeço o apoio financeiro da Associação de Amparo a Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia (AAPeFaTo), ao CNPq e a CAPES, sem o qual não poderia ter concluído meu doutorado.

SUMÁRIO

Lista de figuras e tabelas	7
Lista de abreviaturas	9
Resumo	10
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 O diabete e o sistema nervoso central	13
1.2 Alteração dos sistemas neurotransmissores no diabete	16
1.3 Diabete e depressão	17
1.4 Tratamento da depressão	19
1.5 Efeito dos antidepressivos sobre a glicemia e a secreção de insulina	20
1.6 GABA, diabete e depressão	22
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 Animais	28
3.2 Fármacos e soluções	28
3.3 Modelo animal de diabete	29
3.4 Modelo animal de depressão	30
3.5 Microdiálise	32
3.5.1 Cirurgia estereotáxica	33
3.5.2 Habituação às condições experimentais	33

3.5.3 Microdiálise e o teste do nado forçado	34
3.5.4 Localização da sonda de microdiálise	35
3.6 Determinações bioquímicas	36
3.6.1 Método de estimativa da glicose sanguínea	36
3.6.2 Método de determinação da glicose estriatal	37
3.6.3 Método de determinação da insulina plasmática	38
3.6.4 Método de determinação da concentração do GABA	38
3.6.5 Análise estatística	38
4 ARTIGOS	39
4.1 Publicados	
4.1.1: ARTIGO 1: Acute effect of different antidepressants on glycemia in diabetic and non-diabetic rats.	40
4.1.2: ARTIGO 2: Plasma insulin levels are increased by sertraline in rats under oral glucose overload.	49
4.2 Submetido	
4.2.1: ARTIGO 3: Clonazepam increases <i>in vivo</i> striatal extracellular glucose in diabetic rats after glucose overload.	54
4.3 Aceito para publicação	
4.3.1 ARTIGO 4: Lower <i>in vivo</i> brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming.	79
4.4 Em preparação	
4.4.1 ARTIGO 5: Depressive-like behavior correlated with lower striatal GABA levels in the forced swimming test.	84
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	102
6 REFERENCIAS	105

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Representação esquemática da distribuição dos principais transportadores de glicose expressos em diferentes locais do sistema nervoso central.	14
Figura 2 – Esquema da síntese, liberação, e término de ação do neurotransmissor GABA	23
Figura 3 – Descrição do procedimento de microdiálise	33
Figura 4 – Microdiálise de ratos durante o teste do nado forçado.	35
Figura 5 - Localização da região perfundida durante o processo de microdiálise	36
Figura 6 - Construção da curva glicêmica e estimativa da glicose sangüínea dos animais diabéticos e não diabéticos	37

Figuras que integram o ARTIGO 1

Figure 1 - Oral glucose tolerance test of non-diabetic rats treated with antidepressant agents	44
Figure 2 - Differences between glycemias measured during fasting and 60 min after the glucose overload. Diabetic and non-diabetic rats were treated with different antidepressants.	45

Figura que integra o ARTIGO 2

Figure 1. Individual insulinemia of rats determined after fasting and after 30 min of oral glucose overload, with or without 30 mg/kg sertraline treatment.	52
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figuras que integram o ARTIGO 3

Figure 1 - Time line of microdialysis striatal sampling during experiments with fasted diabetic or non-diabetic rats treated or not with clonazepam (CNZ) at time zero and submitted to glucose overload after one hour.	75
Figure 2 – Absolute concentrations of extracellular striatal glucose levels after 24 h fasting (time 0), after clonazepam 0.25 mg/kg (CNZ) and after oral glucose overload.	76
Figure 3- Striatal glucose levels changes are significantly elevated after oral glucose overload in diabetic and clonazepam treated rats. The much higher increase	

in percent changes of striatal glucose are due to an interaction between diabetes and treatment.	77
Figure 4 –Blood glucose levels of diabetic and non-diabetic rats in fasting, after treatment with clonazepam (CNZ) 0.25 mg/kg and after oral glucose overload.	78
Figura que integra o ARTIGO 4	
Fig. 1. Striatal GABA levels in diabetic and non-diabetic rats in the forced swimming test (FST)	84
Tabela que integra o ARTIGO 1	
Table 1 - Fasting glycemia and glycemia measured 60 min after a glucose overload in diabetic and non-diabetic rats treated with different antidepressants.	44
Tabelas que integram o ARTIGO 5	
Table 1: Frequency and duration of acts and postures performed by streptozotocin-induced diabetic rats (STZ) and non-diabetic control rats during the forced swimming test (FST).....	99
Table 2: Extracellular striatal GABA levels ($\mu\text{M/L}$) at baseline and after the forced swimming test (FST) of diabetic and non-diabetic rats.	100
Table 3: Correlation coefficients (r) of frequency and duration of acts and postures during the forced swimming test (FST) and extracellular GABA levels [GABA] obtained by microdialysis during the forced-swim (30 min) and after forced-swim (60 min).	101

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT: serotonina

ADT: antidepressivos tricíclicos

CNZ: clonazepam

DA: dopamina

EUA: Estados Unidos da América

FLU: fluoxetina

GABA: ácido γ -aminobutírico

GABA-T: GABA-transaminase (enzima de degradação do GABA)

GAD: ácido glutâmico descarboxilase (enzima de síntese do GABA)

GAT: transportador do neurotransmissor GABA

GLUT: transportadores de glicose (*Glucose Transporters*)

HPLC: cromatografia líquida de alta performance (*high performance liquid chromatography*)

IMAOs: inibidores da enzima monoaminoxidase

IMI: imipramina

ISRS: inibidores seletivos da recaptção da serotonina

LCR: líquido cefalorraquidiano

MOC: moclobemida

NA: noradrenalina = norepinefrina

SER: sertralina

SNC: sistema nervoso central

STZ: estreptozotocina

RESUMO

Pacientes diabéticos apresentam maior risco de depressão e o tratamento com antidepressivos melhora o controle glicêmico. O envolvimento do GABA na etiologia da depressão tem sido estudado e, coincidentemente, esse neurotransmissor está diminuído no pâncreas de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Assim sendo, o objetivo foi estudar o efeito de antidepressivos sobre a glicemia e a insulinemia de ratos diabéticos por estreptozotocina, bem como as alterações centrais de glicose, pelo emprego de um agente GABAérgico. Avaliou-se também a concentração do GABA no teste do nado forçado. Ratos Wistar, não diabéticos e diabéticos por estreptozotocina, foram tratados com imipramina, moclobemina, fluoxetina, sertralina e clonazepam. Após mensurada a glicemia de jejum se administrou sobrecarga de glicose, com coletas de sangue a cada 30 min. Dentre os antidepressivos testados, fluoxetina e moclobemida aumentaram a glicemia pós-prandial, enquanto sertralina reduziu tanto a glicemia de jejum quanto a pós-prandial. A coleta de sangue de animais não diabéticos aos 60 min revelou que a redução da glicemia pela sertralina foi acompanhada de aumento significativo dos níveis de insulina após a sobrecarga de glicose. As alterações de glicose central pelo emprego de clonazepam, um agente GABAérgico com propriedades antidepressivas, bem como as alterações na concentração do GABA no estriado de ratos submetidos ao teste da natação forçada eram avaliados *in vivo* por técnica de microdiálise. Previamente ao dia de experimentação era realizada cirurgia estereotáxica para implantação de cânula-guia no núcleo estriado dos ratos. As alterações *in vivo* da glicose eram observadas em

todos os animais na caixa de livre movimentação, ao passo que os níveis extracelulares de GABA eram determinados no estriado de ratos durante e após o teste do nado forçado. Clonazepam não alterou a glicemia de jejum ou pós-prandial de ratos diabéticos e não diabéticos, porém aumentou a concentração de glicose extracelular no estriado desses animais. Quando submetidos ao teste da natação forçada, os ratos diabéticos apresentaram maior tempo de imobilidade e retardo no incremento da concentração do GABA no estriado. Os resultados mostram que nesse modelo animal de diabetes há interferência de agentes GABAérgicos sobre a glicose estriatal, bem como deficiência do sistema GABAérgico, sugerindo o envolvimento desse sistema com as alterações de humor que acompanham o diabetes.

Palavras-chave: diabetes, depressão, estriado, clonazepam, estreptozotocina, microdiálise.

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mérito é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia resultante de uma deficiência da secreção de insulina, de resistência à insulina ou de ambas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2002). Os tipo 1 e 2, anteriormente denominados insulino-dependente e não insulino-dependente, respectivamente, são as formas mais comuns.

O tipo 1 resulta da destruição das células β -pancreáticas por mecanismos auto-imunes com produção de anticorpos para a enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD) (BAEKESKOV et al., 1990) e para as células das ilhotas (ATIKINSON & MACLAREN, 1993).

O tipo 2 é caracterizado por resistência à insulina, que pode progredir para sua deficiência. O tratamento dos seus portadores tem como objetivo reduzir a resistência e estimular a secreção desse hormônio (WILSON et al., 1998).

Como até o momento as formas disponíveis de tratamento não determinam um controle perfeito da glicose sangüínea, o desenvolvimento de complicações crônicas continua sendo um problema sério. Além do sistema nervoso, elas afetam também o sistema cardiovascular, renal e oftalmológico. Com respeito às repercussões neurológicas, grande parte da atenção tem sido voltada à neuropatia periférica. Porém, ultimamente, tem havido consenso de que existem efeitos danosos decorrentes da elevada concentração de glicose sobre o sistema nervoso central (SNC), sugerindo que o diabetes mérito determina complicações neurológicas não apenas periféricas mas também centrais (MACCALL, 1992).

1.1 O DIABETE E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

As alterações metabólicas agudas ou crônicas, bem como as alterações vasculares decorrentes do diabetes podem afetar o equilíbrio dinâmico do SNC (MACCALL, 1992; MANKOVSKY et al., 1997; GISPEN & BIESSELS, 2000).

Em pacientes diabéticos, situações extremas de hiperglicemia ou hipoglicemia são geralmente acompanhadas de perda da consciência, convulsão e coma (WILSON et al., 1998). O controle glicêmico inadequado bem como a administração de doses elevadas de insulina ou hipoglicemiantes orais podem produzir dano permanente à função cerebral, interferindo, inclusive, em mecanismos protetores de contra-regulação (BERGER & HAKIM; 1986; BELL, 1994; CRYER et al., 1994).

A hipoglicemia aguda, resultante da administração de doses elevadas de agentes hipoglicemiantes, está relacionada com o aumento da liberação de aminoácidos excitatórios, como o glutamato que, associado à pouca disponibilidade de ATP e conseqüente redução da recaptação desse neurotransmissor para as células gliais, pode produzir dano neuronal irreversível, uma vez que o esse aminoácido é citotóxico (COX & HENNEBERRY, 1989). O aumento do glutamato na fenda sináptica resulta na elevação da concentração de cálcio intracelular, à despolarização da membrana e à alteração do metabolismo de aminoácidos e da síntese de proteínas, todas com potencial deletério para o neurônio (WIELOCK et al., 1984; KIESSLING et al., 1986; MCCALL, 1992).

Por outro lado, o dano neuronal produzido pela elevada concentração de glicose circulante nos indivíduos diabéticos, resultado do controle glicêmico inadequado, ainda não está estabelecido. Em modelos animais, foi demonstrado que o dano neuronal resultante de isquemia é mais importante nos ratos diabéticos do que nos não diabéticos (HELGASON, 1988; GUYOT et al., 2001). Nessa situação particular do modelo de isquemia, esse dano seria justificado pela metabolização da glicose a ácido lático, em decorrência da ausência de oxigênio. A redução do

pH intra e extracelular pelo ácido lático bem como o próprio ácido lático apresentam potencial neurotóxico (SMITH et al., 1986). Afora o modelo de isquemia, não há outros estudos avaliando possível dano ou mecanismo de dano neuronal em indivíduos diabéticos.

Porém já foi demonstrado que as variações de glicose sanguínea podem afetar seu transporte entre os tecidos. Em animais diabéticos não tratados com insulina, a taxa de extração de glicose do sangue para o cérebro está reduzida em cerca de 75%. O tratamento com insulina aumenta a taxa de extração, mas ela permanece 20% menor do que a dos animais não diabéticos, demonstrando um comprometimento dos mecanismos de transporte de glicose (LUND-ANDERSON, 1979; MOORADIAN & MORIN, 1991; MCCALL, 1992). Em condições de hipoglicemia crônica, a taxa de transporte de glicose para o SNC, ao contrário, está aumentado (LUND-ANDERSON, 1979).

O transporte de glicose através da barreira hematoencefálica e sua distribuição às células gliais e neurônios são realizados por transportadores específicos denominados GLUTs (KELLER et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1996; VANNUCCI et al., 1998) (Figura 1).

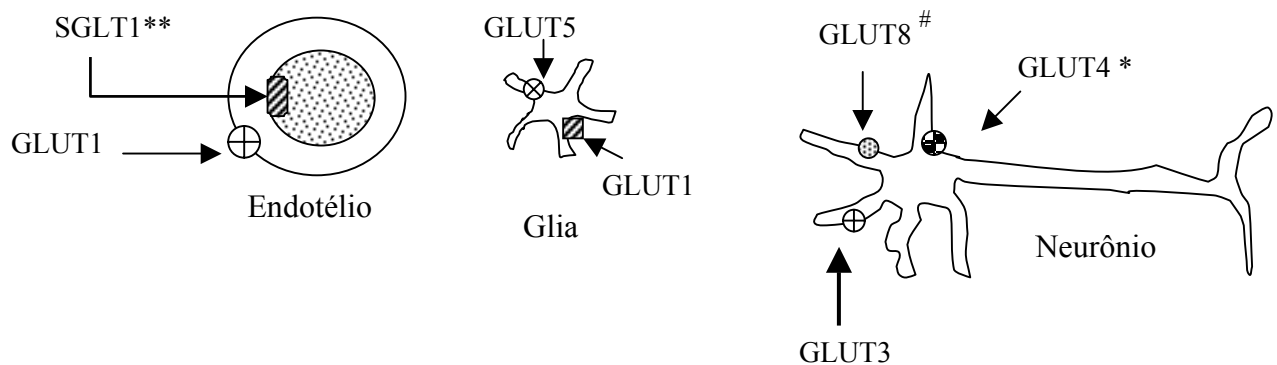


Figura 1 – Representação esquemática da distribuição dos principais transportadores de glicose expressos em diferentes locais do SNC. # transportador não dependente de insulina encontrado no hipocampo (REAGAN et al., 2002); * transportador dependente de insulina presente no cerebelo, córtex e hipocampo (ALQUIER et al., 2001); ** transportador de glicose sódio-dependente (2Na^+ : 1glicose) expresso nas artérias (NISHIZAKI & MATSUOKA, 1998). Os demais transportadores representados estão distribuídos em diferentes regiões cerebrais na figura e não são dependentes de sódio ou insulina.

Os GLUTs também sofrem os efeitos da hiperglicemia crônica, sendo observada uma redução na imunorreatividade dos GLUT1 (PARDRIDGE et al., 1990), GLUT3 (REGAN et al., 1999) e GLUT4 (VANUCCI et al., 1998) em algumas regiões do cérebro de animais diabéticos. Além dos transportadores de glicose, o transporte de sódio e potássio para o cérebro também está reduzido em animais diabéticos (JAKOBSEN et al., 1987), não estando, até o momento, elucidados seus efeitos sobre a função cerebral.

O fluxo sangüíneo, da mesma forma que na periferia, parece estar reduzido em algumas áreas específicas do cérebro de indivíduos diabéticos (DUCKROW et al., 1985; KASTRUP et al., 1990). Embora alterações na reatividade vascular do cérebro de animais ainda não tenham sido testadas, observou-se um aumento da produção de prostanóides, acompanhado de baixa reatividade vascular, na aorta de coelhos diabéticos (TESFAMARIAN et al., 1990). O processo inflamatório gerado pelas prostaglandinas está sabidamente envolvido com produção de espécies ativas de oxigênio e dano celular (WULF, 2002). No cérebro de ratos diabéticos por estreptozotocina, foi detectado aumento da produção de prostanóides, porém tal fato não foi correlacionado com a redução do fluxo sangüíneo e com a baixa reatividade vascular descrita no diabete (JEREMY et al., 1987).

Propõe-se que, em função das alterações do transporte de glicose, do fluxo sangüíneo e do metabolismo cerebral, os pacientes desenvolvem encefalopatia diabética crônica, denominação dada ao conjunto de sinais que compreendem o prejuízo cognitivo, de aprendizado, de memória e de processamento de informações complexas, demonstrado em humanos e em animais portadores de diabete há longo tempo (MCCALL, 1992; BIESSELS et al., 2002).

1.2 ALTERAÇÃO DE SISTEMAS NEUROTRANSMISSORES NO DIABETE

Estudos realizados em algumas áreas do cérebro de animais diabéticos têm demonstrado importantes alterações em alguns sistemas neurotransmissores.

Tanto a dopamina (DA) (LACKOVIC et al., 1990; BELLUSH et al., 1991; OTHANI et al., 1997) quanto a serotonina (5-HT) (CHU et al., 1986; LACKOVIC et al., 1990; BELLUSH et al., 1991; MCCALL, 1992; OTHANI et al., 1997) e seus metabólitos estão diminuídos em algumas regiões do cérebro de animais diabéticos. Essas alterações são acompanhadas do aumento da expressão de alguns receptores, por exemplo, D₁ e D₂ no estriado (LIM et al., 1994; SUMIYOSHI et al., 1997) e 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} no córtex (SUMIYOSHI et al., 1997).

Em contrapartida, a noradrenalina encontra-se aumentada no estriado de ratos diabéticos (RAMAKRISHNAN & NAMASINAVAM, 1995), sendo os resultados controversos nos valores do hipotálamo (RAMAKRISHNAN & NAMASINAVAM, 1995; OTHANI et al., 1997).

O neurotransmissor GABA mostrou-se aumentado no hipotálamo de ratos diabéticos após 2 a 5 semanas da indução do diabetes por estreptozotocina, voltando aos valores normais com o tratamento com insulina (OTHANI et al., 1997). No córtex, não foram encontradas diferenças nos níveis de GABA após 1 ou 5 semanas de diabetes (GUYOT et al., 2001), muito embora o número dos receptores GABA_B esteja reduzido nesses ratos com 2 a 4 semanas de diabetes (MARTIN et al., 1988). Ratos diabéticos Goto-Kakizeki também não apresentaram alteração na taxa de captação neuronal do GABA (DUARTE et al., 2000).

O aumento da concentração do neurotransmissor GABA no hipotálamo, em condições de hiperglicemia, tem sido confirmado por trabalhos que afirmam que o SNC tem neurônios especializados que utilizam a glicose como sinalizador (LEVIN, 2002). Tais neurônios, distribuídos em várias regiões cerebrais, são sensíveis às variações extracelulares de glicose, sendo que alguns respondem ao aumento dos níveis de glicose com elevação da taxa de disparos

neurônios (glicose-estimulados) enquanto outros reduzem sua taxa de disparos (glicose-inibidos) pela presença de glicose (LEVIN, 2002; PÉNICAUT et al., 2002). As mudanças na taxa de disparos neuronais induzidas pela glicose são moduladas por canais de potássio ATP-sensíveis (canais K_{ATP}) (ASHFORD et al., 1990). Esses canais expressos nos neurônios sensíveis à glicose são constituídos por uma subunidade formadora do poro para o potássio (Kir6), e por outra receptora das sulfonilurías (SUR), à semelhança daqueles encontrados nas células β -pancreáticas (ASHFORD et al., 1990). Tanto a glicose quanto hipoglicemiantes da classe das sulfonilurías, como a glipizida, aumentam a liberação do GABA, *in vivo*, na substância *nigra* (DURING et al., 1995). A dopamina, ao contrário, tem inibida sua liberação pelo aumento da glicose ou uso das sulfonilurías (LEVIN, 2002). Portanto, a hiperglicemia crônica no diabetes pode influenciar não só a ocorrência de danos micro e macrovasculares, mas também determinar alterações na resposta de alguns sistemas neurotransmissores, sendo possível que essas alterações centrais possam se refletir no aumento da prevalência de depressão em paciente diabéticos.

1.3 DIABETE E DEPRESSÃO

Nos EUA, a prevalência de depressão em pacientes diabéticos é cerca de 20% maior do que na população geral (GAVARD et al., 1997; LUSTMAN et al., 1992; GOODWIN et al., 1996) enquanto no México esse número chega a quase 40% (TÉLLEZ-ZENTENO & CARDIEL, 2002). No Brasil, a prevalência de diabetes na população geral é de 7%, mas não há dados epidemiológicos indicando a incidência de depressão em diabéticos (MALERBI & FRANCO, 1992).

Muito embora para o paciente diabético as alterações no modo de vida, tais como restrição de dieta, tratamento crônico, aumento de despesas e maior número de hospitalizações, além de prejuízo cognitivo, dificuldade de visão e impotência (LUSTMAN et al., 1992; WREDLING et al., 1992), possam contribuir para as oscilações de humor, não se descarta a possibilidade de que o estado hiperglicêmico crônico ou outras alterações decorrentes dele possam interferir na homeostasia do SNC, produzindo depressão.

Os sintomas de depressão mais comuns relacionados com o diabetes são perda de peso, retardo psicomotor, cansaço, hipersonia, baixa auto-estima e redução do interesse sexual (LUSTMAN et al., 1992). Reconhecer e tratar a depressão em pacientes diabéticos é muito importante, uma vez que a depressão não tratada está relacionada com baixo controle glicêmico e piora do quadro clínico, aumentando o risco de complicações (SACHS et al., 1991; GAVARD et al., 1993).

Apesar de sua etiologia não estar plenamente elucidada até o momento, a depressão tem sido associada, com frequência, a estados de estresse crônico (LUSTMAN et al., 1992). No paciente deprimido se observa aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com maior concentração de cortisol plasmático (MAES & MELTZER, 1995), da mesma forma que em pacientes e animais diabéticos (CAMERON et al., 1984; BELLUSH et al., 1991).

Nos modelos animais de depressão, o comportamento dos diabéticos é diferente dos não diabéticos. Tanto ratos quanto camundongos diabéticos apresentam maior tempo de imobilidade no teste do nado forçado (HILAKIVI-CLARK et al., 1990; GOMEZ & BARROS, 2000). Esse comportamento dos animais diabéticos é revertido pelo tratamento com antidepressivos (GOMEZ & BARROS, 2000) ou insulina (HILAKIVI-CLARK et al., 1990). Nesse modelo, o aumento da imobilidade poderia ser associado ao estado de saúde dos animais, uma vez que perdem peso rapidamente, porém esses mesmos animais não apresentam redução significativa da atividade locomotora quando testados no labirinto em cruz elevado, no campo aberto ou quando

expostos a ambiente novo (HILAKIVI-CLARK et al., 1990; BELLUSH et al., 1991; GOMEZ, 1997; POPOVIÇ et al., 2001).

Portanto, parece evidente que o estado de hiperglicemia crônica ou outras alterações decorrentes da deficiência de insulina periférica produzem alterações fisiológicas importantes que se refletem na mudança de comportamento dos indivíduos diabéticos. Evidente também é que, quanto maior o controle glicêmico pelo paciente diabético, menor o risco de dano periférico e central, e esse controle está diretamente relacionado com aumento da auto-estima e melhoria da qualidade de vida, alcançada, por vezes, apenas com tratamento com antidepressivos.

1.4 TRATAMENTO DA DEPRESSÃO

A depressão é tratada, classicamente, com fármacos pertencentes à classe dos antidepressivos tricíclicos (ADT), inibidores da monoaminoxidase (IMAOs), inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), antagonistas 5-HT₂, inibidores da recaptação de 5-HT/NA, inibidores da recaptação de NA/DA e inibidores seletivos da recaptação da noradrenalina (NA) (POTTER et al., 1991). Por vezes, dependendo do paciente, faz-se uso de antidepressivos não clássicos ou atípicos cuja resposta farmacológica foi observada na prática clínica (EMRICH et al., 1980; POST et al., 1992; MORISHITA et al., 1998). A diferença básica entre eles reside na duração de ação, nos efeitos adversos apresentados, nas possíveis interações com outros fármacos e na eficácia farmacológica dependente do indivíduo (POTTER et al., 1991).

Os fármacos clássicos têm em comum a propriedade de aumentar a disponibilidade dos neurotransmissores noradrenalina, dopamina e serotonina na fenda sináptica, em todas as regiões do cérebro (POTTER et al., 1991). Muito fácil seria pensar que a deficiência desses neurotransmissores seria responsável pelo aparecimento da depressão. Porém, o que se observa é que o efeito antidepressivo se manifesta apenas 15 ou 30 dias após o início do tratamento,

colocando em dúvida a teoria da simples reposição e melhoria dos sintomas (POTTER et al., 1991). Então, é lícito cogitar-se que a resposta antidepressiva resulta de mecanismos mais complexos, possivelmente envolvendo reequilíbrio da função de alguns sistemas neurotransmissores em diferentes regiões cerebrais (DREVETS, 2000). É possível também que diferentes indivíduos desenvolvam disfunção em sistemas neurotransmissores específicos, resultando em diferentes tipos de depressão (MARTIJENA et al., 1996).

Poucos estudos enfatizam o cuidado na escolha dos fármacos para o tratamento da depressão em pacientes diabéticos, bem como a necessidade de ajuste de dose dos hipoglicemiantes orais ou insulina, possivelmente porque a depressão nesses indivíduos é subestimada (LUSTMAN et al., 1992; GOODNICK et al., 1995; LUSTMAN et al., 1997).

1.5 EFEITO DOS ANTIDEPRESSIVOS SOBRE A GLICEMIA E A SECREÇÃO DE INSULINA

De um modo geral, os antidepressivos da classe dos ADTs e IMAOs estão associados a aumento da glicemia, enquanto os ISRS parecem reduzi-la (GOODNICK et al., 1995).

O uso crônico de imipramina e nortriptilina, ambas ADTs, produz hiperglicemia em pacientes não diabéticos (KAPLAN et al., 1960; LUSTMAN et al., 1997). Em diabéticos, a associação de hipoglicemiantes orais com nortriptilina ou doxepina normaliza os níveis glicêmicos (TRUE et al., 1987). Em coelhos não diabéticos, o tratamento com imipramina (GUPTA et al., 1992) e amitriptilina (GUPTA et al., 1995) produz aumento da glicose sanguínea e, da mesma forma, a amitriptilina aumenta a glicemia em camundongos diabéticos e não diabéticos (ERENMEMISOGLU et al., 1999). O efeito hiperglicemiante dos ADTs é atribuído à sua capacidade de inibir a recaptação da noradrenalina, o que resulta em aumento da

gliconeogênese e da glicogenólise, além de redução da secreção de insulina e conseqüente captação de glicose pelos tecidos periféricos (GOODNICK et al., 1995). Outro estudo bastante interessante demonstrou que a eficácia antidepressiva de imipramina, clomipramina e desipramina está reduzida em animais diabéticos, possivelmente pelo aumento da atividade da enzima flavina-monooxigenase hepática que acelera o metabolismo desses antidepressivos nesses animais (ROUER et al, 1987; MASSOL et al, 1989).

Os IMAOs como a tranilcipromina inibem a secreção de insulina pancreática, produzindo hiperglicemia (COOPER & ASHCROFT, 1966). Porém alguns IMAOs derivados da hidrazina, como a fenelzina, a isocarboxazida e a mebanazina, produzem hipoglicemia (POTTER et al., 1969). Quando utilizados para o tratamento de pacientes diabéticos, esses IMAOs derivados da hidrazina reduzem em 30% as necessidades de insulina, sendo necessário o ajuste de dose para evitar crise hipoglicêmica (COOPER & ASHCROFT, 1966).

Diferentemente dos ADTs e IMAOs, cujo tratamento está associado ao ganho de peso pelo aumento do apetite, os ISRSs apresentam efeito anoréxico intrínseco, sendo preferidos para o tratamento de pacientes diabéticos obesos, já que a perda de peso e a redução involuntária da ingestão de carboidratos melhoram o quadro clínico (O'KADE et al., 1994; DAUBRESSE et al., 1996). O tratamento com fluoxetina melhora o controle glicêmico, observado pelas medidas da glicemia de jejum, da hemoglobina glicosilada (HbA1c) ou dos níveis de peptídeo-C de jejum (O'KADE et al., 1994; BREUM et al., 1995). É possível que esse efeito hipoglicemiante seja resultado do aumento da sensibilidade de receptores periféricos e hepáticos à insulina (BREUM et al., 1995; MAHEUX et al., 1997). No entanto, o uso de ISRS tem sido associado a crises hipoglicêmicas graves, necessitando-se de ajuste de dose da insulina e hipoglicemiantes orais (BREUM et al., 1995; GOODNICK et al., 1997; POLLAK et al., 2001). Esse efeito hipoglicemiante também foi demonstrado em camundongos diabéticos tratados com fluoxetina e sertralina (ERENMEMISOGLU et al., 1999). As alterações glicêmicas não foram acompanhadas

de aumento da secreção de insulina, supondo o envolvimento de outro mecanismo hipoglicemiante.

Por outro lado, a utilização de um antidepressivo atípico, o alprazolam, um agonista GABA_A, para o tratamento da depressão de pacientes diabéticos tipo 2, melhorou o controle glicêmico, observado pela redução significativa da hemoglobina glicosilada (LUSTMAN et al., 1995). O clonazepam, um outro agonista GABA_A, não alterou a glicemia de ratos diabéticos e não diabéticos (GOMEZ & BARROS, 2000), apresentando efeito antidepressivo em ratos diabéticos (GOMEZ & BARROS, 2000) e em pacientes não diabéticos deprimidos (SMITH et al., 2002), não tendo sido ainda testado em pacientes diabéticos.

É evidente que o tratamento da depressão em pacientes diabéticos faz-se necessário para melhorar sua qualidade de vida, aumentar a adesão ao tratamento e, conseqüentemente, retardar o aparecimento de complicações macro e microvasculares (SACHS et al., 1991; LUSTMAN et al., 1998). Embora haja uma grande variedade de antidepressivos disponíveis, o tratamento da depressão em pacientes diabéticos necessita de cuidados especiais, uma vez que esses fármacos interferem sobre os níveis glicêmicos e podem interagir com os hipoglicemiantes. O que se observa nesses poucos estudos é que os ADTs e os IMAOs tendem a agravar a hiperglicemia, além de apresentar inúmeros efeitos adversos, ao passo que os ISRSs tendem a determinar hipoglicemia. Por outro lado, os antidepressivos atípicos parecem não afetar a glicemia.

1.6 GABA, DIABETE E DEPRESSÃO

Mas, qual a relação entre GABA, diabete e depressão?

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e está presente em 30-50% das sinapses cerebrais, modulando também o funcionamento de outros neurotransmissores (PAREDES & AGMO, 1992; SOGHOMONIAN & CHESSELET, 2000). Ele é sintetizado na

mitocôndria das células nervosas pela enzima GAD, tendo como precursor o glutamato (Figura 2). O GABA é armazenado dentro de vesículas de onde é liberado, após estímulo específico, para a fenda sináptica. Na fenda, pode interagir com receptores ionotrópicos, $GABA_A$, ou metabotrópicos, $GABA_B$. A interação com receptores $GABA_A$ resulta na abertura dos canais de cloro, no influxo desse íon para o interior da célula e na conseqüente despolarização neuronal, com inibição do estímulo nervoso (MACCDONALD & HASS, 2000). Por outro lado, sua interação com receptor $GABA_B$, expresso principalmente na membrana pré-sináptica, resulta na redução do influxo de cálcio, uma vez que este receptor está acoplado a uma proteína G reguladora de um canal de membrana potássio/cálcio (BOWERY, 2000). A diminuição do cálcio pré-sináptico está associada à redução da liberação do neurotransmissor, já que esse íon é responsável pela migração da vesícula e sua fusão junto à membrana plasmática. O término de ação do GABA é resultado de sua captação por transportadores pré-sinápticos, retornando às vesículas, ou por captação pelas célula gliais, onde é metabolizado pela enzima GABA-T (MARTIN & TOBIN, 2000) (Figura 2).

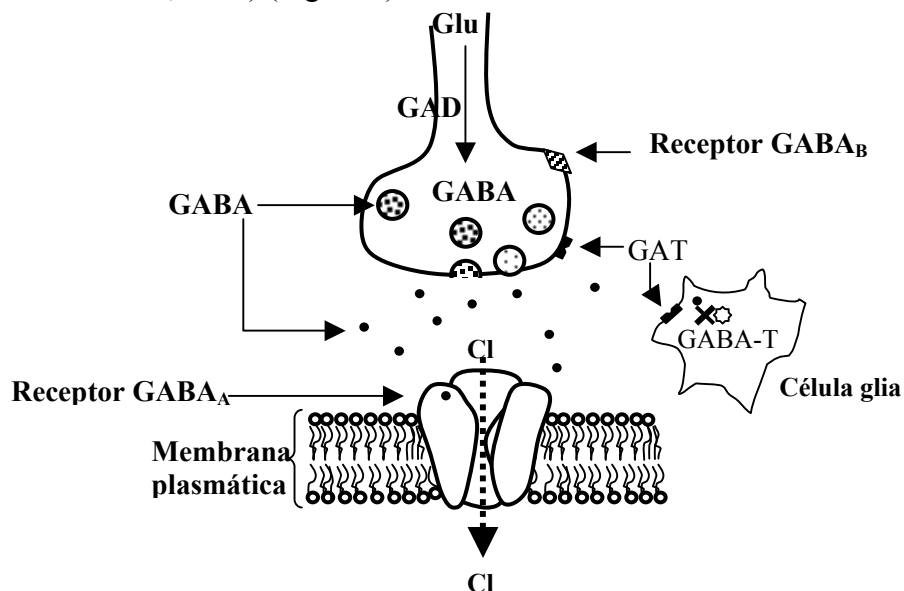


Figura 2 – Esquema da síntese, liberação, e término de ação do neurotransmissor GABA: ácido γ -aminobutírico. Glu: glutamato; GAD: glutamato descarboxilase a enzima de síntese do GABA; GABA-T: enzima GABA transaminase que metaboliza o GABA; GAT: transportador do GABA; Cl^- : íon cloro.

O sistema GABAérgico também está presente no pâncreas, encontrando-se ali o GABA em concentrações tão elevadas quanto no SNC (ADEGHATE & PONERY, 2001). No diabetes tipo 1, a enzima de síntese do GABA tem sido responsabilizada diretamente pela produção de anticorpos que destroem as células β -pancreáticas (BAEKESKOV et al., 1990). A destruição dessas células secretoras é acompanhada de redução significativa do GABA, proporcional à de insulina no pâncreas de animais diabéticos (OKADA, 1986; ADEGHATE & PONERY, 2001).

Ainda não se conhecem as implicações da deficiência de insulina periférica e as conseqüências da hiperglicemia crônica sobre a homeostasia do SNC. Sabe-se que o aumento de ATP intracelular inibe a ativação da enzima GAD, que está em maior proporção, no interior da célula, na sua forma inativa (apoGAD), sugerindo que o aumento de ATP intracelular inibe a produção de GABA (MARTIN & TOBIN, 2000). Também não se afasta a possibilidade de que as lesões macro e microvasculares decorrentes do diabetes afetem a barreira hematoencefálica com redução da transferência de piridoxal-fosfato (Vitamina B₆) ao SNC. Já foi demonstrado que há deficiência de vitamina B₆ em todos os tecidos periféricos, exceto fígado, de ratos diabéticos (OKADA et al., 1999). A vitamina B₆ é co-fator imprescindível para a ativação da enzima GAD, sendo utilizada, inclusive, na clínica para aumentar a produção do GABA e elevar o limiar convulsivante (MARTIN & TOBIN, 2000). Considerando-se estes dados, é possível que as alterações decorrentes do diabetes interfiram sobre o sistema GABAérgico.

Como já mencionado, os níveis de GABA no hipotálamo de animais diabéticos mostram-se aumentados (OTHANI et al., 1997), enquanto sua recaptação parece não ser afetada pela hiperglicemia crônica (DUARTE et al., 2000). Também já foi observado que o receptor GABA_B está diminuído no córtex desses animais (MARTIN et al., 1988). Por outro lado, os níveis de glicose sangüínea, durante sobrecarga de glicose, são reduzidos em animais diabéticos tratados com agonistas GABAérgicos como o diazepam, o baclofen ou o ácido aminooxacético, enquanto

o THIP (4,5,6,7-tetrahydroisoxazol[5,4-c]piridona) os elevam (GOMEZ et al., 1999), sugerindo uma relação entre o sistema GABA e as variações de glicemia.

O GABA, por sua vez, em função de sua importância na modulação da função central, tem sido cada vez mais implicado na etiologia da depressão, uma vez que agentes GABAérgicos têm demonstrado eficácia farmacológica no tratamento de distúrbios do humor (EMRICH et al., 1981; PETTY, 1995; SHIAH & YATHAM, 1998; MORISHITA et al., 1999; SMITH et al., 2002). Em modelos animais de depressão, como a bulbectomia olfatória, tem-se observado aumento do *turnover* do GABA na amígdala (JANCSAR & LEONARD, 1984) e da expressão dos receptores GABA_A no córtex frontal e no hipocampo de ratos (DENNIS et al., 1993). O GABA_B, ao contrário, está diminuído no córtex pré-frontal desses animais (LLOYD & PICHAT, 1985), da mesma forma que no modelo do desamparo aprendido (MARTIN et al., 1989). Neste último modelo, o GABA está reduzido no hipocampo, sendo isto relacionado com o baixo desempenho dos animais na esquiwa passiva (PETTY & SHERMAN, 1981). Contudo, a administração de GABA para esses animais previne e reverte seu baixo desempenho (SHERMAN & PETTY, 1980). Estudando o comportamento de animais diabéticos no modelo da natação forçada, observou-se que esses animais apresentavam maior tempo de imobilidade, comportamento esse revertido pelo clonazepam, um agente GABAérgico (GOMEZ & BARROS, 2000).

Da mesma forma, o GABA está reduzido no sangue (PETTY & SHERMAN, 1984; SHIAH & YATHAM, 1998) e no líquido cefalorraquidiano (PETTY, 1995) de pacientes deprimidos, sendo sua concentração inversamente proporcional à severidade da depressão. Nos pacientes deprimidos, o tratamento crônico com diferentes antidepressivos aumenta a atividade GABAérgica no SNC (SUZDAK & GIANUTSOS, 1985; SHIAH & YATHAM, 1998; SANACORA et al., 2002; SMITH et al., 2002).

Adicionalmente, estudos de neuroimagem (PET) em humanos revelam que o fluxo sanguíneo e a atividade metabólica estão aumentados em 50% a 70% em algumas regiões cerebrais de pacientes deprimidos (DREVETS, 2000). Esse aumento da atividade metabólica tem sido atribuído à falha de mecanismos inibitórios. DREVETS (2000) propõe, por exemplo, que o aumento da atividade da amígdala esquerda em pacientes deprimidos resulta de disfunções inibitórias que ocorrem no córtex pré-frontal e estriado, duas estruturas com projeções nervosas de entrada na amígdala. Em pacientes com depressão maior, também foi observado que o volume do estriado está anormalmente reduzido, estando diminuído também seu metabolismo, provavelmente em função do baixo fluxo sanguíneo (BAUMANN et al., 1999). Somando-se a isso, estudos com neuroimagem revelam que o uso crônico de antidepressivos clássicos resulta em diminuição ou aumento da atividade metabólica, dependendo da área cerebral observada (BUCHSBAUM et al., 1997).

Portanto, parece evidente que alterações no equilíbrio do metabolismo cerebral e no sistema GABAérgico estão envolvidas na fisiopatologia da depressão e que as alterações metabólicas que acompanham o diabetes poderiam, de alguma forma, estar relacionadas com o aparecimento da depressão. Por tais razões, o presente trabalho se propõe a investigar alguns aspectos envolvidos na trilogia GABA-diabete-depressão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos dos antidepressivos sobre a glicemia e a insulinemia pelo uso agudo de diferentes antidepressivos e as alterações centrais de glicose e do sistema GABAérgico em ratos não diabéticos e diabéticos por estreptozotocina.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito agudo de diferentes antidepressivos sobre os níveis glicêmicos de ratos não diabéticos e diabéticos por estreptozotocina.
- Avaliar os níveis de insulina plasmática durante o jejum e após sobrecarga de glicose em ratos tratados com sertralina.
- Determinar o efeito do clonazepam, um modulador positivo GABA_A, sobre os níveis de glicose no estriado de ratos não diabéticos e diabéticos por estreptozotocina, em jejum e após sobrecarga de glicose.
- Determinar alterações *in vivo* dos níveis extracelulares do neurotransmissor GABA no estriado de ratos diabéticos submetidos ao teste do nado forçado.
- Investigar se há correlação entre o GABA extracelular no estriado e os comportamentos no teste do nado forçado em ratos não diabéticos e diabéticos.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Todos os animais utilizados nos experimentos eram provenientes do biotério da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas (FFFCMPA). Ratos Wistar, machos, adultos, pesando cerca de 300 g, foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 ° C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (7:00 – 19:00h), com água e alimento à vontade, exceto quando, por necessidade do experimento, o jejum se fez necessário. Todos os experimentos seguiram as normas do *International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)* e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FFFCMPA. Enfatiza-se que todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais, utilizando-se o número mínimo de sujeitos necessários para a obtenção de dados científicos fidedignos.

3.2 FÁRMACOS E SOLUÇÕES

Todas as soluções de fármacos utilizados nos diferentes experimentos eram administradas por via intraperitoneal e preparadas imediatamente antes do uso. A estreptozotocina, 60 mg/mL, foi diluída em tampão citrato (pH 4,2), enquanto os demais fármacos eram dissolvidos em água destilada ou suspensos em água destilada com 0,05% de Tween 80. Os animais controle eram tratados com solução salina (0,9% NaCl) ou solução salina com 0,05% (v.v.) de Tween 80.

A solução glicosada, diferente das soluções contendo fármacos ou da solução salina, foi administrada por via oral (gavage) e preparada pela dissolução de 50% de glicose (D(+)-glicose, monoidrato, Merck, Brasil) em água destilada (p/v).

As doses dos diferentes antidepressivos foram selecionadas com base em experimentos prévios que comprovaram, após a construção de curvas dose-resposta, reduzir a imobilidade de ratos no teste do nado forçado (BARROS & FERIGOLO, 1998; FERIGOLO et al., 1998; GOMEZ & BARROS, 2000)

3.3 MODELO ANIMAL DE DIABETE

Modelos animais são muito utilizados em pesquisa por serem de fácil execução e baixo custo, possibilitando a obtenção de resultados de modo rápido, uma vez que permitem a criação de situações de difícil controle e apresentação na natureza (PARMIGIANI et al., 1999).

O diabetes pode ser reproduzido em animais pela administração de substâncias como o aloxano e a estreptozotocina (STZ), pela inoculação de alguns vírus, como o Cocksakie B4 (WONG & JANEWAY, 1999) e pela seleção de animais geneticamente predispostos (NAKHOODA et al., 1976). Os agentes utilizados lesam seletivamente as células β -pancreáticas, inibindo irreversivelmente a produção e secreção de insulina e reproduzindo o diabetes tipo 1 nos animais.

Esses modelos animais não reproduzem exatamente a doença que ocorre em humanos, mas têm contribuído muito para o conhecimento das causas, complicações, tratamento e prevenção do diabetes. Embora os modelos animais transgênico e espontâneo de diabetes se aproximem mais da etiologia autoimune do diabetes humano, o modelo da estreptozotocina é o mais freqüentemente utilizado em função do tempo e do custo envolvidos no experimento (LIKE & ROSSINI, 1976).

Além disto, a STZ é uma nitrosuréia que penetra nas células através do transportador de glicose GLUT2, altamente expresso nas células β -pancreática das ilhotas de Langerhans (SCHNEDL et al, 1994), porém não expresso na barreira hematoencefálica, evitando interferências sobre o SNC (KUMAGAI, 1999).

Os níveis de glicose sanguínea em ratos, após 72 horas da administração da STZ, variam de 200 a 600 mg/dL e, embora esses níveis sejam muitos elevados, os animais sobrevivem, por várias semanas, sem a administração de insulina. Por motivos ainda não bem elucidados, alguns animais mostram resistência ao efeito diabetogênico da STZ ou mesmo reverterem o diabetes após alguns dias da indução. Em função disto, eram descartados, em todos os experimentos, os animais que apresentavam glicemia inferior a 200 mg/dL após a avaliação semanal ou aquela prévia ao experimento.

Muito embora, após 15 dias do diabetes, os animais percam peso e essa diferença seja significativa em relação aos não diabéticos (GOMEZ, 1997), como já foi dito, eles não apresentam redução significativa da atividade locomotora quando testados no labirinto em cruz elevado, no campo aberto ou quando expostos a ambiente novo (HILAKIVI-CLARK et al., 1990; BELLUSH et al., 1991; GOMEZ, 1997; POPOVIÇ et al., 2001), comprovando que as alterações comportamentais no teste do nado forçado não representam debilidade física.

3.4 MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO

Os modelos animais utilizados para estudar a depressão e o efeito antidepressivo de fármacos podem ser produzidos através de lesão em regiões específicas do cérebro, como a bulbectomia olfatória, ou ainda por exposição dos animais a situações de estresse, como é o caso dos modelos de desamparo aprendido, estresse crônico moderado ou teste do nado forçado

(WILLNER, 1991). Algumas cepas de animais, como o *Flinder Sensitive Line* (FSL) e o *Swimming Low* (SwLo), foram selecionadas pelo seu maior tempo de imobilidade no teste do nado forçado (OVERSTREET et al., 1993; WEISS et al., 1998). Esses modelos apresentam diferenças comportamentais e neuroquímicas e podem representar os diferentes subtipos de distúrbios depressivos diagnosticados na clínica (WILLNER, 1991).

Um dos modelos mais utilizados, por ser prático, de fácil e relativamente rápida execução, além de ter excelente validade preditiva para novos agentes antidepressivos, é o teste da natação forçada, idealizado por Porsolt et al. (1977). Nesse teste o animal é colocado em um tanque com água, no qual não há possibilidade de fuga (ver figura 4 pg 36). Após um período inicial de nado vigoroso, o animal passa a executar apenas movimentos para manter a cabeça fora da água. No primeiro dia (pré-teste), os animais são colocados no tanque por 15 minutos, retirados e secos, seguindo-se a administração de 3 doses consecutivas do possível agente antidepressivo, 24, 5 e 1 hora antes do teste, que se realiza no segundo dia, com duração de 5 minutos. Os fármacos que reduzem o tempo de imobilidade no nado forçado são considerados antidepressivos (PORSOLT et al., 1977).

Atualmente, com o recurso da gravação dos comportamentos em fita de videocassete, outros parâmetros, além do tempo de imobilidade, têm sido explorados na tentativa de melhor descrever os atos e posturas dos animais. Esse detalhamento tem como objetivo quantificar a seqüência e a freqüência dos comportamentos, construindo etogramas que descrevem os comportamentos do animal frente a essa situação específica do teste do nado forçado, bem como as alterações produzidas por doenças ou pelo emprego de fármacos (RASNOW et al., 1997; PARMIGIANI et al., 1999). Neste experimento foram detalhados o tempo e a freqüência de mergulhar, agitar a cabeça (*head-shake*), flutuar, congelar, nadar e escalar (*climbing*), sendo a imobilidade total resultado da soma do flutuar e do congelar, e a mobilidade total, a soma do nadar e escalar. O escalar é caracterizado pelo nado vigoroso e tentativa de fuga pelas paredes do

tanque, enquanto o nadar se refere à tentativa de fuga no centro do tanque. Já o flutuar se caracteriza pela execução de movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água, enquanto o congelar é considerado quando o animal está completamente imóvel, boiando (GOMEZ & BARROS, 2000). As alterações de neurotransmissores que acompanham esses modelos animais podem auxiliar na elucidação da etiologia da depressão, bem como contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos.

3.5 MICRODIÁLISE

A microdiálise é uma técnica que monitora, em tempo quase real, as alterações neuroquímicas no espaço extracelular de tecidos vivos. Muitos estudos tem mostrado que ela é sensível para obter amostras do espaço extracelular em localizações específicas do sistema nervoso central, como o estriado, monitorando a ação de substâncias exógenas (BOURNE, 2003). Uma sonda (*probe*) de microdiálise inserida no tecido nervoso atua como um capilar sanguíneo, monitorando o ambiente extracelular por um processo de difusão. Quando uma solução, com constituintes muito semelhantes aos do líquido cefalorraquidiano (LCR), é lentamente bombeada através da sonda de microdiálise (Figura 3-G), se estabelece um equilíbrio entre o LCR e os fluidos extracelulares que circundam a sonda, sendo que o dialisado contém material representativo do ambiente (KHAN & SHUAIB, 2001).

Para determinação dos níveis de GABA e glicose estriatal é necessário a prévia implantação de cânulas-guia no estriado dos ratos mediante cirurgia estereotáxica, a habituação dos animais às condições experimentais, incluindo a pré-exposição ao tanque de natação forçada, o procedimento de microdiálise, bem como a verificação posterior da exata localização de implantação das cânulas para validação dos resultados.

3.5.1 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os ratos utilizados nos experimentos de microdiálise eram anestesiados com uma mistura de 10 mg/kg de ketamina e 50 mg/kg de xylazina e acoplados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA). Uma cânula-guia (CMA12, Acton, MA; Figura 3-F) era implantada unilateralmente, no estriado esquerdo do animal, seguindo-se as coordenadas do mapa de Paxinos & Watson (1982): bregma: ântero-posterior + 0,2 mm, lateral: + 3 mm e vertical: -5 mm, e fixada com o auxílio de 3 parafusos e cimento dental. Durante os dias que se seguiam os animais eram mantidos isolados, em gaiolas de acrílico (35x25x40 cm) e cuidadosamente observados, sendo submetidos aos experimentos cerca de 10 dias após o procedimento cirúrgico.

3.5.2 HABITUAÇÃO ÀS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os animais submetidos à microdiálise eram previamente habituados, no dia anterior aos experimentos, por cerca de 3 horas, ao sistema de livre movimentação, permanecendo com o colar de fixação ao aparelho até o final dos procedimentos (Figura 3-C).

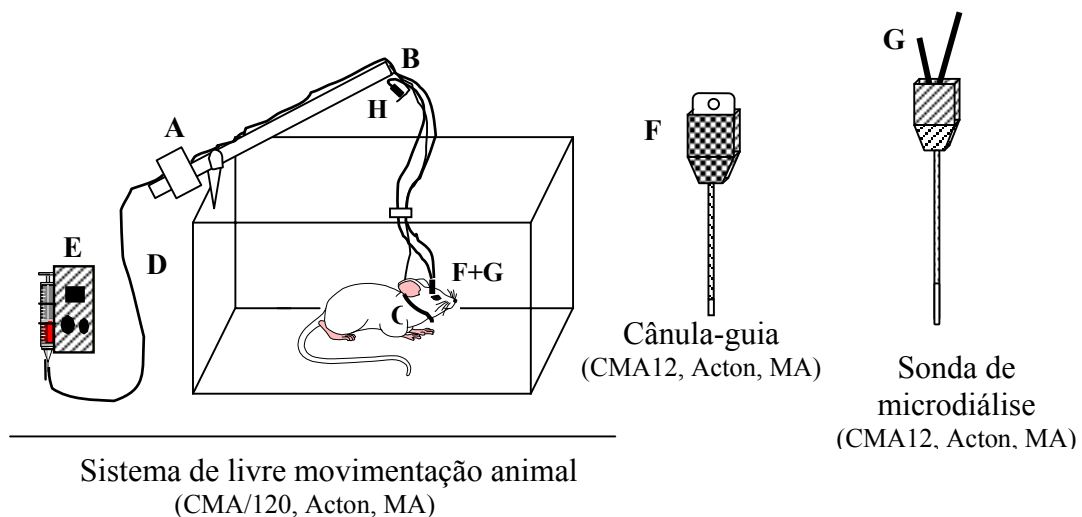


Figura 3 - Descrição do procedimento de microdiálise. O aparato de microdiálise é constituído por um sistema para livre movimentação, onde o animal é conectado a um braço em contrabalanço (A) e a um sistema de livre rotação (B) com o auxílio de um colar de fixação plástico (C). Microtubos (D) transportam o líquido cefalorraquidiano

artificial a uma velocidade constante, impulsionado por uma bomba de microinfusão (E) até uma sonda de microdiálise (G), introduzido em uma cânula-guia (F) previamente implantada por microcirurgia. O perfusado é recolhido em um microtubo (H) e, posteriormente, armazenado a -80° C.

No dia do experimento, após introduzir a sonda (Figura 3-G) na cânula guia (Figura 3-F) e ambientá-la com o líquido cefalorraquidiano, eram coletadas inicialmente 5 amostras, sendo as 2 primeiras descartadas e as 3 subseqüentes utilizadas para o estabelecimento da linha de base. A partir desse momento, administrava-se clonazepam, no caso da determinação da glicose estriatal, ou colocava-se o rato para nadar, no caso da determinação do GABA estriatal pelo teste do nado forçado.

A malha da membrana de diálise da sonda foi selecionada de modo a permitir a passagem do GABA ou de glicose.

As caixas de habituação eram higienizadas apenas quando se substituíam os animais, de modo que cada um reconhecia seus próprios odores quando reexposto à caixa de habituação.

3.5.3 MICRODIÁLISE E O TESTE DO NADO FORÇADO

Para a determinação dos níveis de GABA no estriado dos ratos submetidos ao modelo do nado forçado, os mesmos eram habituados, conforme o exposto acima, ao aparato de microdiálise por 3 horas, sendo, na metade desse período, postos a nadar por 15 minutos. Resgatados do tanque e secos, retornavam ao sistema de livre movimentação animal. No dia seguinte, procedia-se à coleta de amostras por microdiálise, a cada 30 minutos, durante 5 horas. Imediatamente após o término da coleta da 5^a amostra, os animais eram colocados para nadar por 5 minutos, e seus movimentos eram filmados para posterior análise etológica. A seguir, eram resgatados, secados e recolocados no sistema de livre movimentação animal, continuando-se a coleta dessa amostra até

se completarem os 30 minutos (Figura 4). Em nenhum momento houve interrupção da coleta de amostras ou desconexão do aparelho de microdiálise.

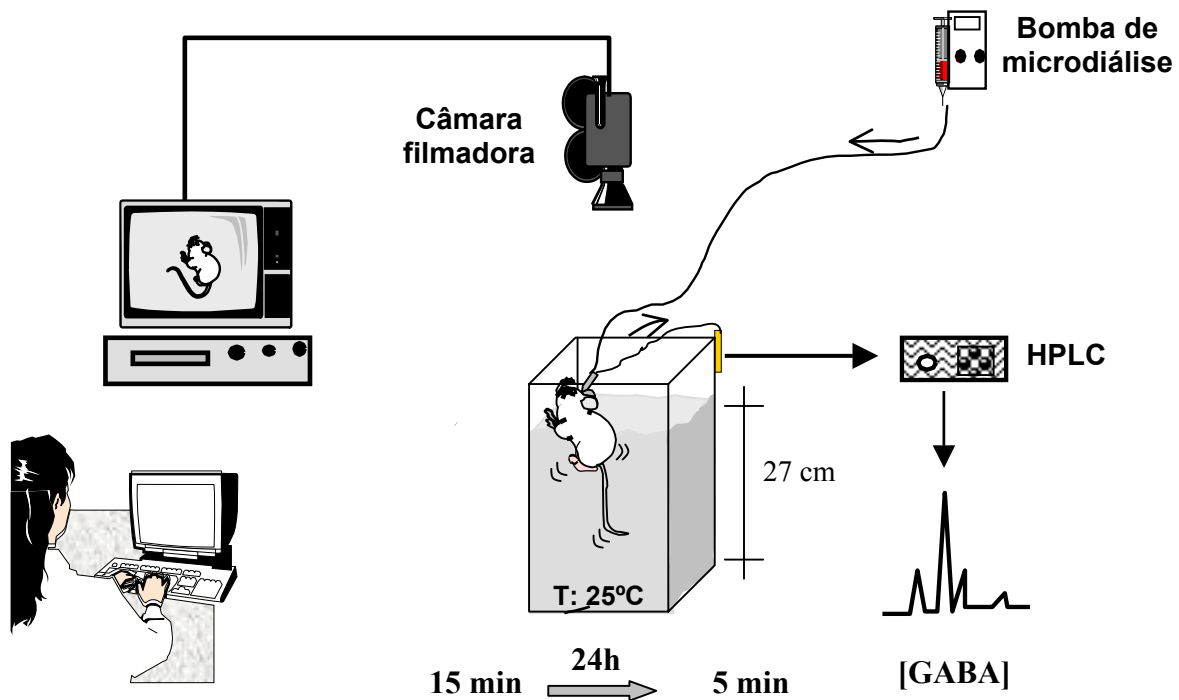


Figura 4 – Microdiálise de ratos durante o teste do nado forçado. Os animais são introduzidos no aquário (22 x 22 x 35 cm) por 15 min (pré-teste) e reexpostos, 24 horas após por mais 5 min (teste). A coleta das amostras inicia imediatamente antes da introdução do rato no tanque do nado forçado e continua após a retirada do animal até se completarem 30 minutos. Durante o nado, os comportamentos são filmados para posterior análise etológica. O GABA é determinado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detector fluorométrico.

3.5.4 LOCALIZAÇÃO DA SONDA DE MICRODIÁLISE

Para confirmação da localização exata da cânula-guia no processo de cirurgia estereotáxica e conseqüente determinação da área de perfusão pela sonda de microdiálise, os animais eram

sacrificados após os experimentos com uma sobredose de pentobarbital (50 mg/kg). Após abertura do peritônio e obstrução da artéria aorta descendente, iniciava-se a perfusão intracardíaca com cerca de 20 mL de solução salina, seguida de mais 20 mL de solução de formalina a 10%. Os cérebros eram então cuidadosamente retirados e armazenados em solução de formalina a 10% até serem posteriormente seccionados em fatias coronais de cerca de 40 μ m ao longo da extensão da implantação da cânula guia. Os animais cuja localização da cânula não se enquadrava muito próximo ao padrão abaixo eram desprezados (Figura 5).

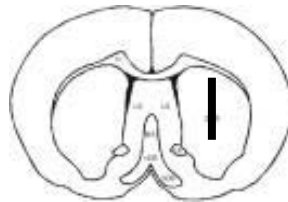


Figura 5 - Região perfundida durante o processo de microdiálise.

3.6 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

3.6.1 MÉTODO DE ESTIMATIVA DA GLICOSE SANGÜÍNEA

A curva glicêmica é uma técnica empregada na clínica para diagnóstico do diabetes em humanos. Ela consiste na medição consecutiva da glicose sangüínea de indivíduos inicialmente em jejum e após a ingestão de uma sobrecarga de 75 g de glicose, administrada via oral, com coletas a cada 30 minutos. Indivíduos com glicemia de jejum \geq 110 mg/dL e glicemia após duas horas da sobrecarga \geq 200 mg/dL são considerados diabéticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2002).

Nos experimentos, a estimativa das variações da glicemia de jejum e após sobrecarga de glicose ao longo do tempo era realizada com um aparelho portátil (Glucotrend, Boehringer Institute, Mannheim, Germany) (Figura 6-B). O sangue era coletado após uma pequena incisão na porção distal da cauda do rato. A gota de sangue coletada era colocada rapidamente sobre a zona de teste da tira para imediata medida da glicemia. Esse método foi escolhido pelo fato de dispensar o emprego de anestésicos que poderiam interferir sobre a curva glicêmica, bem como pelo menor grau de estresse, uma vez que os animais eram anteriormente manipulados para habituação pelo mesmo pesquisador que procedia à coleta de sangue.



Figura 6 – Construção da curva glicêmica e estimativa da glicose sangüínea dos animais diabéticos e não diabéticos. **A:** coleta de sangue por punção na porção distal do cauda do rato; **B:** aparelho para determinação da glicemia.

3.6.2 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA GLICOSE ESTRIATAL

A glicose estriatal foi determinada pelo método enzimático (Glicose oxidase GOD/PAP, Labtest Diagnóstica, Brasil), utilizando-se um espectrofômetro (Ultrospec 2000, England) em comprimento de onda de 505 nm.

3.6.3 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA INSULINA PLASMÁTICA

A insulina plasmática foi determinada pela técnica de radioimunoensaio, utilizando-se um anticorpo policlonal (Coat-A-Cout, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA).

3.6.4 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GABA

A análise do GABA foi feita em equipamento de HPLC de fase reversa, usando colunas ODS e detector de fluorescência com ortoftaldeído e mercaptoetanol. A taxa de fluxo foi de 1,5 mL/min em um gradiente de fase móvel constituída por metanol e tampão fosfato (tampão A), metanol a 80% (tampão B) e metanol a 20% (JOSEPH, 1986). O tempo para cada análise foi de 45 minutos. O GABA foi determinado quantitativamente por correlação com suas áreas de pico cromatográficas, obtidas de uma mistura padrão conhecida e um padrão interno de ácido homocisteínico.

3.6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos diferentes experimentos foram reunidos em banco de dados construído no programa Microsoft Excel (Microsoft Co,) para posterior análise no programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Chicago), utilizando-se o teste de Student Newman-Keuls para determinação da diferença entre os grupos.

4 ARTIGOS

4.1 ARTIGOS PUBLICADOS

4.1.1 ARTIGO 1

Título: Acute effect of different antidepressants on glycemia in diabetic and non-diabetic rats

Autores: R. GOMEZ, J. Huber G., Tombini and H.M.T. Barros

Periódico: BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH

Volume: 1

Numero: 34

Paginas: 57-64

Data: Janeiro de 2001

Local de publicação: São Paulo - BR

ISSN: 0100-879X

TEXTO DISPONÍVEL NO FORMATO PDF EM ARQUIVO ANEXO

4.1.2 ARTIGO 2

Título: Plasma insulin levels are increased by sertraline in rats under oral glucose overload.

Autores: R. GOMEZ, J. Huber, G. Tombini, H. M.T. Barros

Periódico: BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH

Volume: 12

Numero: 34

Paginas: 1569-1572

Data: Dezembro 2001

Local de publicação: São Paulo - BR

ISSN: 0100-879X

TEXTO DISPONÍVEL NO FORMATO PDF EM ARQUIVO ANEXO

4.2 ARTIGO SUBMETIDO

4.2.1 ARTIGO 3

Título: **Clonazepam increases *in vivo* striatal extracellular glucose in diabetic rats after glucose overload**

Autores: **ROSANE GOMEZ** and Helena MT Barros

Periódico: PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR

Data: enviado em 15/12/2002

ISSN: 0091-3057

**Clonazepam increases *in vivo* striatal extracellular glucose in diabetic rats
after glucose overload**

Rosane Gomez and Helena M.T. Barros

Pharmacology Division, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre -
Porto Alegre – Brasil

Address

Helena MT Barros

R. Sarmiento Leite, 245

90050-170 - Porto Alegre, Brazil.

Phone: 55-51-3224 8822 ext 151

Fax: 55- 51-3224 8822 ext 121

E-mail: helenbar@ffcmpa.tche.br

rgomez@terra.com.br

Running title: Clonazepam and striatal glucose in diabetic rats

ABSTRACT

Hyperglycemia modulates brain function, including neuronal excitability, neurotransmitter release and behavioral changes. There may be connections between the GABAergic system, glucose sensing neurons and glucose in the neuronal environment that leads to the required clarification of the mechanism of anti-immobility effect of GABA_A agonists in diabetic rats. We aimed to investigate if clonazepam, a GABA_A receptor positive modulator, modifies *in vivo* striatal extracellular glucose levels in diabetic rats under fasting condition or after oral glucose overload. Streptozotocin-diabetic and non-diabetic rats were submitted to *in vivo* striatal microdialysis. Perfusate samples were collected at baseline, fasting, 0.25 mg/kg clonazepam and oral glucose overload. Blood glucose and striatal extracellular glucose were measured simultaneously at different time-points. Fasting striatal glucose levels were higher in diabetic than in non-diabetic rats and the differences between these animals were maintained after glucose overload. The increases in extracellular striatal glucose after glucose overload were around 40% and blood to brain transference was decreased in diabetics. Clonazepam treatment significantly increased striatal glucose after glucose overload only in diabetic rats. Clonazepam-induced extracellular glucose increment glucose may be due to a change in brain glucose homeostasis system due to the chronic hyperglycemic state and may be correlated with the antidepressant effects in diabetic rats.

Keywords: microdialysis, depression, glucose ratio, benzodiazepines, metabolism

INTRODUCTION

Diabetes is a hyperglycemic and a hypoinsulinemic chronic state that may modify central nervous system functions (Bellush et al., 1991; Lustman et al., 1992). The impact of diabetes on the central nervous system has been more closely studied during the last decade (McCall, 1992) and a condition that may be referred to as diabetic encephalopathy is now accepted (Biessels et al., 2002). Besides the known consequences of the increased risk of strokes, diabetes mellitus is associated with moderate cognitive deficits and neurophysiological and structural changes in the brain (Biessels et al., 2002). Psychiatric manifestations seem to accompany this encephalopathy, since the prevalence of depression is as high as 39% in diabetic patients, much higher than in the general population (Gavard et al., 1997; Lustman et al., 1992; Téllez-Zenteno and Cardiel, 2002).

The diabetic encephalopathy may be replicated in the experimental animal setting. The relationship between hyperglycemia and neuronal damage in cerebral cortex has already been demonstrated in streptozotocin diabetic rats and insulin treatment prevents this neuronal damage (Guyot et al., 2001). It has been shown that diabetic rats and mice also present depressive-like behavior in the forced swimming test (Gomez and Barros, 2000; Hilakivi-Clarck et al., 1990). Insulin treatment prevents the behavioral variation of diabetic mice (Hilakivi-Clarck et al., 1990). Clonazepam, a GABA_A receptor positive modulator, also counteracts the depressive behaviors in diabetic rats (Gomez and Barros, 2000). The relationship between the GABAergic system and diabetes is still matter of very few studies and a full description of the functioning of the GABA system, in diabetic individuals brains is lacking. It seems that diabetic rats present brain GABA concentrations similar to the non-diabetic rats when the animals are kept under basal laboratory conditions (Duarte et al., 2000; Gomez accepted). Cerebral GABA uptake of diabetic Goto-Kakizeki rats also does not show differences from Wistar rats (Duarte et al., 2000). Therefore, the differences in brain GABA concentrations seems to occur when the individuals are submitted to behavioral challenges, since diabetic rats present a delayed and slightly decreased extracellular

striatal GABA response when submitted to the forced swimming test (Gomez et al, accepted).

The interaction between glucose homeostasis and GABA might also be important and needs further studies, since insulin reduces astrocytic uptake of GABA, increasing extracellular GABA, and enhances the number of functional GABA_A receptors in post-synaptic neurons (as reviewed in Figlewicz 1999; Guyot et al., 2001). On the other hand, the effects of GABA_A receptor agonists on physiologic processes controlling glucose uptake and utilization in the brain glucose mechanisms is also important to be described. Brain extracellular glucose concentration represents a balance between supply from the blood and the rate of glucose utilization by brain cells (Levin, 2000). It is clear that extracellular glucose is affected by changes in local neuronal metabolism demands, according to their local neuronal activity (Fellows et al., 1992). Glucose is transported across the blood–brain barrier by facilitated transport (Vannucci et al., 1998). It is then taken up by both neurons and astrocytes, each of which have their own specific glucose transporters (GLUT): GLUT1 in the blood brain barrier (Vannucci et al., 1998), GLUT3 in neurons (Keller et al., 1995) and GLUT4 in astrocytes (Kobayashi et al., 1996). On the other hand, when blood glucose concentrations vary, extraction decreases as blood glucose increases, since blood to brain glucose transfer is a saturable mechanism (Lund-Anderson, 1979). GABA agonists are not known to interact with any of GLUTs.

Brain glucose homeostasis is finely regulated. During both hypo- and hyperglycemia, changes in brain glucose levels are smaller than the ones in basal and occur very quickly after blood levels are altered (Silver and Erecinska, 1994). Marked chronic hyperglycemia due to non-treated diabetes decreases blood-brain glucose transporters (Mooradian and Morin, 1991). Different parts of the brain are important centers involved in monitoring glucose status and regulation of feeding (Levin, 2002). Glucose sensitive neurons in different brain areas use glucose as a signaling molecule and local glucose levels leads to alterations in neuronal firing rate characterizing glucose-excited neurons and glucose-inhibited neurons (Levin, 2000; Levin 2002).

The increase of firing rate in the glucose-excited neurons is due to glucose inactivation of the K_{ATP} channel, leading to GABA release (During et al., 1995; Levin 2000). Local infusion of glucose or of sulfonylureas increase GABA release in the substantia nigra while hypoglycemia induces decreased GABA efflux (During et al., 1995; Levin, 2000). However, during chronic hyperglycemic states this fine-tuning may be altered by decreased blood-brain glucose transport (Reagan et al., 1999; Reagan et al., 2001; Vanucci et al., 1998). However, no change in blood-brain glucose transport has also been reported in poorly controlled diabetic patients (Segel et al., 2001).

The possible interactions between cerebral glucose and brain GABAergic function reviewed above are very interesting to be studied to start to better characterize the diabetic encephalopathy. In this study, it was our objective to investigate if a GABAergic agent modifies *in vivo* striatal extracellular glucose levels in non-diabetic and diabetic rats under fasting condition or after oral glucose overload.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (250-350 g) were obtained from the Animal House of Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). The animals were housed in groups of three per polypropylene cage, with wood shavings as bedding before the surgery. Food and water was available *ad libitum*, except when otherwise stated and the animals were maintained in a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) under a light-dark cycle (7:00 a.m. – 7:00 p.m.). 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 FFFCMPA. All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

Drugs

Clonazepam 0.25 mg/ mL (Rivotril, Roche, Brasil,) was prepared in distilled water with Tween 0.05 % (v.v.) immediately before intraperitoneal administration. This dose was chosen because it has antidepressant effects in diabetic rats (Gomez and Barros, 2000). The correspondent vehicle was prepared with saline and Tween 0.05 %.

Glucose (D(+)-glucose, monohydrate, Merck, Rio de Janeiro, Brasil) was dissolved in distilled water (50g/100 mL) and administered via gavage.

Streptozotocin (Sigma Co, St Louis, MO, USA) 60 mg/mL was prepared in phosphate buffer (pH 4,5).

Diabetes induction

Diabetes was induced by a single intraperitoneal dose of streptozotocin (STZ) 60 mg/kg. Increased blood glucose levels (200 mg/dL or higher) of the STZ group rats were confirmed with a glucometer (Glucotrend, Boehringer Institute, Mannheim, Germany) after 24 hours. Non-diabetic control rats received saline 1 mL/kg intraperitoneally and were also submitted to blood glucose measurement.

In vivo microdialysis and glucose analysis

One week after diabetes induction, the rats were anesthetized intraperitoneally with a mixture of 10 mg/kg ketamine and 50 mg/kg xylazine, and were placed into the stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA). Unilateral guide-cannulae for CMA 12 probes were implanted in the left dorsal striatum (bregma: antero-posterior + 0.2 mm, lateral + 3 mm and vertical: -5.0 mm), according to Paxinos and Watson, 1982. The guide-cannulae assembly was then fixed to the skull with three anchorage screws and dental cement. After recovering from anesthesia the animals were maintained isolated in acrylic cages (35x25x40 cm) with wood shaving beds and were observed closely for one week.

After 14 days of diabetes induction and one day before the microdialysis, rats from both groups (diabetes (STZ) and non-diabetic (CTR)) were individually habituated for 5 hours to a containment system for freely moving animals, in which the animal is connected to the counterbalance arm and swivel through a plastic collar (CMA/120, Acton, MA). During this habituation period only water was offered to the animals and they remained fasted until the end of the experiment. Glucose recovery from the probes (0.5 mm diameter with 4 mm dialyzing membrane, CMA/12, Acton, MA) was evaluated in a 2.4 mM glucose solution at 1 μ L/minute. The in vitro recovery was $28 \pm 3\%$.

On the microdialysis experiment day, the probes were inserted into the guide-cannulae and the fasting animals were introduced into the same animal containment apparatus described above. Probes were perfused with artificial cerebrospinal fluid (NaCl 147 mM; CaCl₂ 2.3 mM; KCl, 4.0 mM; MgCl₂ 0.9 mM with unadjusted pH 7.1-7.3) at a constant flux rate of 1.0 μ L/min with a microperfusion pump (CMA/102, Acton, MA). The microdialysis membrane was stabilized for one hour and three samples were then collected at 20-min intervals in order to determine striatal baseline glucose levels.

At 120 minutes after the introduction of the probes, subgroups of STZ or CTR rats received 0.25 mg/kg of clonazepam or vehicle. Three subsequent perfusate samples were collected at 20-min intervals for one hour. At 180 minutes after the introduction of the probe all rats received 1mL of glucose solution by gavage and the perfusate samples were collected at 20-min intervals for two hours more (see Figure 1). All samples were frozen at -80 °C for glucose determination by an enzymatic method (Glucose oxidase GOD/PAP, Labtest Diagnóstica, Brazil), using a spectrophotometer at 505nm (Ultrospec 2000, England).

Glucose was measured in blood taken from a superficial puncture in the distal end of the rat' tails. The blood drop was applied to the test zone of the strip for measurement of fasting-food glycemia in a Glucotrend device (Boehringer Mannheim, Germany). These measures were

repeated every 40 minutes (20 and 60 min after clonazepam and 40, 80 and 120 min after glucose overload) to reduce stressful interference during the experiments (Figure 1).

All experiments were undertaken between 9:00 a.m. and 3:00 p.m.

INSERT FIGURE 1 ABOUT HERE

Histology

After the completion of the microdialysis experiments, the rats were euthanized with an overdose of pentobarbital (50 mg/kg) and perfused intracardially with around 20 mL 0,9% saline, followed by perfusion with 10% formalin. The brains were carefully removed and stored in a 10% formalin solution until they were sectioned into coronal 40 μm slices, collected consecutively through the extension of the area of implantation of guide cannulae. The place where the cannulae was inserted was confirmed by examination of the slices.

Statistical analysis

Striatal baseline glucose levels were calculated by averaging the three samples collected at immediately before clonazepam administration. Striatal glucose concentration changes after clonazepam and after glucose overload were expressed as percent from baseline level for each individual. These absolute and percent values were analyzed using a Three Way-ANOVA test, considering as factors diabetic/non-diabetic condition, clonazepam/saline treatment and time. Blood glucose levels were also analyzed through a Three Way-ANOVA test. Pearson's Correlation was used to measure the strength of the association between blood glucose and striatum glucose levels. Striatal glucose was divided by blood glucose to obtain an extracellular striatal /blood glucose ratio and these values were compared through a Two Way-ANOVA test. The Student-Newman-Keuls test was used for post-hoc comparisons when appropriate. All data

are expressed as mean \pm standard error of the mean. A p value of less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

In Figure 2 there is a representation of absolute values of glucose concentration in the striatum of non diabetic (A) and diabetic (B) rats treated or not with CNZ. These values are estimates from data and reflect our probe recovery rate of 28 % for glucose. Diabetic rats showed higher fasting extracellular striatal glucose baseline levels than non-diabetic rats ($F(1,135)=58.721$, $p < 0.001$). Clonazepam administration did not change absolute values of striatal glucose concentration during the fasting condition. Oral glucose overload induced a significant increase in extracellular glucose levels in all groups ($F(9,135)=3.156$, $p=0.002$). The non-diabetic rats treated or not with clonazepam and the diabetic rats that did not receive benzodiazepine treatment had a significantly higher extracellular glucose levels 40 and 60 minutes after oral glucose overload. Diabetic rats treated with clonazepam showed a significant interaction between treatment and glucose overload ($F(9,135)=2.069$, $p=0.036$). These animals showed a significantly higher increment in extracellular glucose levels in comparison to the animals of the other three groups from 40 to 100 minutes after glucose overload.

INSERT FIGURE 2 ABOUT HERE

As represented in Figure 3 diabetic rats present higher extracellular glucose percent changes from baseline when submitted to glucose overload ($F(1,84)=15.268$, $p < 0.001$). Higher extracellular glucose levels were achieved at between 60 minutes and 100 minutes after glucose overload ($F(6,84)=2.85$, $p=0.014$). Clonazepam, as main effect, significantly increased the striatal glucose concentration ($F(1,84)=12.935$, $p < 0.001$). Additionally, benzodiazepine treatment and diabetic condition interacted significantly ($F(1,84)=4.843$, $p=0.031$) because clonazepam increased striatal glucose concentrations to levels even higher in diabetic rats.

INSERT FIGURE 3 ABOUT HERE

Streptozotocin-diabetic rats presented higher blood glucose than non diabetic rats ($F(1,78)= 280.777$, $p<0.001$) as expected (Figure 4). In diabetic rats blood glucose peaked 80 minutes after glucose overload and in non-diabetic rats the peak was reached in 40 minutes after glucose overload ($F(5,78)=5.370$, $p<0.001$) and an interaction between diabetic condition and time is seen ($F(5,78)=3.068$, $p=0.014$).

INSERT FIGURE 4 ABOUT HERE

Higher blood glucose in diabetic rats was correlated with higher striatal glucose ($r=0.525$, $p< 0.05$). As an exercise we decided to estimate glucose transference from blood to brain dividing the estimated striatal glucose levels by blood glucose levels. Diabetic rats showed a lower ratio than non-diabetic rats ($F(1,72) =12.902$, $p<0.001$). Clonazepam treatment or glucose overload did not significantly change the estimated blood:brain ratio.

DISCUSSION

In this experiment we showed that the ‘in vivo’ basal striatal glucose level is higher in freely moving diabetic rats than in non-diabetic animals. The in vivo basal extracellular striatal glucose levels of non-diabetic animals estimated in this experiment was an intermediary value in respect to the ones presented by other laboratories. In vivo brain extracellular glucose levels in rats are presented to be from 2.4 mM (McNay et al., 2001; Silver and Erecinska, 1994) to values six times lower than this (around 0.4 mM) (Fellow et al., 1992; Fray et al., 1996; Fray et al., 1997). In previous studies, extracellular glucose concentrations were estimated from calculations considering glucose plasma levels, glucose utilization by brain cells and blood-brain barrier transport kinetics as 2 to 4 mM (Lund-Anderson, 1979). Similar results of brain extracellular glucose values were estimated in vivo in anesthetized rats using glucose microelectrodes (Silver and Erecinska, 1994). Direct measures of extracellular fluid glucose levels by microdialysis is a

much better method for studies with freely moving animals (Fellows et al., 1992), because it overcomes overestimation due to contamination from plasma or due to brain metabolism compartmentalization (Gruetter, 2002; McNay et al., 2001). It also surpasses the need of keeping animals under anesthetics, that are known to interfere with brain metabolism and to increase glucose efflux (Fellows et al., 1992). The difficulty connected to glucose measurements by microdialysis is due to the lower recovery of glucose through the membranes. On the other hand, there are also differences in results between experiments using microdialysis. These differences depend on both the recovery of the substance relative to the membrane used and to the flow of perfusion (Khan and Shuaib, 2001). In our case, the non-corrected glucose concentration was 0.35 mM which represents only around one third of the actual estimate (1.17 ± 0.13 mM), since the recovery of the probes used was around 30%. We cannot fully explain the differences between our results and those from other studies, but it is possible that our higher glucose levels are due to the slower artificial cerebrospinal fluid flow through the probe, $1\mu\text{L}/\text{min}$, instead of flow of $2\mu\text{L}/\text{min}$ used in other studies (Fellow et al., 1992; Fray et al., 1996). Anyway, it has been proposed that microdialysis is a better method to determine glucose concentration in the extracellular fluid in unanesthetized, freely moving rats (Fellow et al., 1992; Fray et al., 1996) and it is special when the objective is to monitor concomitant changes in behavior.

It has been described that the estimates of extracellular glucose concentrations represent the equilibrium between blood delivery of glucose to the brain and the metabolic needs of neurons and glial cells (Fray et al., 1996). This explains our finding of positive correlation between brain and blood glucose levels. Therefore, the higher blood levels of glucose of diabetic animals may explain the higher extracellular glucose levels in their striatum during fasting. However, these prior results show that brain glucose levels of diabetic animals is 45% higher than non-diabetic that is not proportional to the ones seen in blood glucose levels animals (250%). As foreseen, the estimated brain extracellular/blood glucose ratio is significantly lower in diabetic than in non-

diabetic rats. The decreased ratio in chronic hyperglycemic diabetics may be justified by decreased glucose extraction by the brain when plasma glucose is too high, saturating the blood-brain glucose transport mechanism (Lund-Andersen, 1979, Mooradian and Morin, 1991) or by changes in neural glucose transporters GLUT3 (Reagan et al., 1999) GLUT4 (Vanucci et al., 1998) and GLUT8 (Reagan et al., 2001). Any one of these mechanisms may explain the changes in glucose transference rate from blood to the extracellular fluid and from fluid to neurons. We also tried to estimate the correlation between blood and striatal glucose levels after glucose overload of diabetic and non-diabetic freely moving rats. Normal non-diabetic rats have a transitory 30% increase in striatal extracellular glucose levels 40 to 60 min after an oral glucose overload. Glucose overload increases the blood glucose levels in around 40 to 60% at the same time. In diabetic rats the extracellular glucose levels increase almost 100% after glucose overload, while in blood the increase is around 50%. The increment of blood glucose is not accompanied by an increment in striatal glucose levels at the same proportion in non-diabetic animals, reproducing the fine brain glucose homeostasis regulation, as stated in the glucostatic hypothesis (Levin, 2002; Silver and Erecinska, 1994). It also shows that this homeostasis regulation is deficient in diabetic rats.

The mechanisms for glucose homeostasis may involve glucosensing neurons that monitor the metabolic status of the body (Levin, 2002, Pénicaud et al., 2002). In glucose-excited neurons, glucose levels reproducing the ones seen in hyperglycemia inactivate the K_{ATP} channel, increasing neuronal firing rate and inducing GABA and other transmitters release (During et al., 1995; Levin, 2000). Streptozotocin-induced diabetes upregulates high-affinity sulfonylurea binding sites at GABA neurons (Levin and Dunn-Meynell, 1998). In this case it may be inferred that glucose will have more difficulty to inhibit the K_{ATP} channels to increase GABA release in diabetes. In a recent observation we have demonstrated that diabetic rats present lower and delayed increase of extracellular GABA in the striatum (Gomez, submitted). The $GABA_A$ receptors participate in a

very complex way in glucose homeostasis depending on the brain area being studied (Levin, 2000). Acutely, clonazepam is known to reduce brain glucose utilization by 20 % without changes in blood glucose. This effect occurs with doses as low as 0.01 mg/kg and there is a non-linear relationship between benzodiazepine receptor occupancy and the brain metabolic response (Ishizuka et al., 1989). In this study, the benzodiazepine clonazepam induced an even higher increment from baseline of glucose striatal levels only in the diabetic animals during glucose overload. According to the glucostatic theory, the lower glucose utilization rate induced by benzodiazepines should not produce any significant change in extracellular glucose in the brain, as seen with our non-diabetic rats. This does not seem to be the case in the diabetic animals and, therefore, strongly points to the theory of dysfunctional metabolic homeostasis in diabetic rats. In fact, more studies should still be conducted to prove this hypothesis and discard other changes that might also occur, such as modification of GABA A receptor number or binding by diabetes, since diabetic animals show supersensitive behavioral motor effects to clonazepam (Bellush et al., 1991; Gomez et al., 1997).

Considerable evidences, including preclinical and clinical data, have accumulated suggesting that GABA may play a role in the pathophysiology of mood disorders, particularly depression (Gomez and Barros, 2000; Parent, et al., 2002; Petty, 1995; Smith et al., 2002). How to reconcile these observations of increased striatal glucose with the ones of decreased GABA in diabetes and the increased 'depressive mood' in diabetic rats as part of the diabetic encephalopathy? In depressed patients, neuroimaging studies show that cerebral metabolism and blood flow are abnormally decreased in the frontal cortex and caudate and increased in the amygdala (Drevets et al., 2002). Depression is attributed to a failure of negative feedback from frontal cortex and caudate on the amygdala (Drevets, 2000, Drevets et al., 2002). Decreased striatal GABA system function in diabetic patients might be the cause of the increased amygdala activity, generating depression, as demonstrated in an animal model of depression in diabetic rats

(Gomez, submitted). In diabetes, the higher striatal glucose concentration could increase intracellular ATP that inhibits activity of GAD, the synthesis enzyme for GABA (Martin and Tobin, 2000). Under fasting conditions of diabetic animals, a benzodiazepine will overcome this deficiency by acting directly upon GABA_A receptors, reversing the depressive-like behavioral changes. It is possible that if the diabetic individual uses a high load of glucose all this equilibrium is lost. It remains to be tested if diabetic animals display different amounts of immobility in the forced swimming test after oral glucose overload and if clonazepam still holds the same intensity of antidepressant effects in the glucose overload state. Therefore, determination of brain extracellular glucose levels during fasting and after glucose overload is important to investigate the mechanism by which glucose acts to modulate brain function, including modulation of neuronal excitability, neurotransmitter release and behavior in diabetic individuals. Both clinical and basic research needs to focus on the mechanisms involved in abnormal physiology of the brain in diabetes and the best ways to prevent chronic brain damage in patients.

Acknowledgement: Research supported by a CNPq research grant (522800/95-5). Rosane Gomez receives a doctoral scholarship from CAPES (Physiology Program- UFRGS) and Helena MT Barros receives a CNPq 1C Researcher Productivity Grant.

REFERENCES

1. Bellush LL, Reid SG, North D. The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. *Physiol Behav* 1991;50:973-981.
2. Biessels GJ, Van der Heide LP, Kamal A, Bleys RL, Gispen WH. Aging and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* 2002;441:1-14.
3. Drevets WC. Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry* 2000;48:813-829.

4. Drevets WC, Price JL, Bardgett ME, Reich T, Todd RD, Raichle ME. Glucose metabolism in the amygdala in depression: relationship to diagnostic subtype and plasma cortisol levels. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71:431-447.
5. During MJ, Paola L, Davis KE, Kerr D, Sherwin RS. Glucose modulates rat substantia nigra GABA release in vivo via ATP-sensitive potassium channels. *J Clin Invest* 1995;95(5):2403-2408.
6. Duarte A, Santos M, Seica R, Resende de Oliveira C. Effect of oxidative stress on the uptake of GABA and glutamate in synaptosomes isolated from diabetic rat brain. *Neuroendocrinology* 2000;72:179-86.
7. Fellows LK, Boutelle MG, Fillenz M. Extracellular brain glucose levels reflect local neuronal activity: a microdialysis study in awake, freely moving rats. *J Neurochem* 1992;59:2141-2147.
8. Figlewicz DP. Endocrine regulation of neurotransmitter transport. *Epilepsy Res* 1999;37:203-210.
9. Fray AE, Boutelle M, Fillenz M. Extracellular glucose turnover in the striatum of unanaesthetized rats measured by quantitative microdialysis. *J Physiol* 1997;503(3):721-726.
10. Fray AE, Forsyth RJ, Boutelle M, Fillenz M. The mechanisms controlling physiological stimulated changes in rat brain glucose lactate: a microdialysis study. *J Physiol* 1996;496(1):49-57.
11. Gavard JA, Lustman PJ, Clouse RE. Prevalence of depression in adults with diabetes. *Diabetes Care* 1993;16:1167-1178.
12. Gomez R, Barros HMT. Efeito do clonazepam sobre a depressão e ansiedade em diabéticos: um estudo com modelos animais. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Farmacologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 120p, 1997.

13. Gomez R, Barros HMT. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;66:329-335.
14. Gomez R, Asnis N, Tannhauser LS, Barros HMT. GABA agonists differentially modify blood glucose levels of diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 1999;80:327-331.
15. Gruetter R. In vivo ¹³C NMR studies of compartmentalized cerebral carbohydrate metabolism. *Neurochem Intern* 2002;41:143-154.
16. Guyot LL, Diaz FG, O'Regan MH, Song D, Phillis JW. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the release of excitotoxic and other amino acids from the ischemic rat cerebral cortex. *Neurosurgery* 2001;48:385-391.
17. Hilakivi-Clarke LA, Wozniak KM, Durcan MJ, Linnoila M. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiol Behav* 1990;48:429-433.
18. Ishizuka H, Sawada Y, Ito K, Sugiyama Y, Iga T, Hanano M. Nonlinear relationship between benzodiazepine receptor occupancy and glucose metabolic response in the conscious mouse brain in vivo. *J Pharmacol Exper Therap* 1989;251(1):362-367.
19. Keller K, Duelli R, Vogel J, Schrock H, Kuschinsky W. Autoradiographic analysis of the regional distribution of Glut4 glucose transporters in the rat brain. *Brain Res* 1995;698:175-179.
20. Khan SH, Shuaib A. The technique of intracerebral microdialysis. *Methods* 2001;23(1):3-9.
21. Kobayashi M, Nikami H, Morimatsu M, Saito M. Expression and localization of insulin-regulable glucose transporter (GLUT4) in rat brain. *Neurosc Letters* 1996;213:103-106.
22. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Effect of streptozotocin-induced diabetes on rat brain sulfonylurea binding sites. *Brain Res Bull* 1998;46:513-518.
23. Levin BE. Metabolic sensors: viewing glucosensing neurons from a broader perspective. *Physiol Behav* 2002;76:397-401.

24. Levin BE. Glucose-regulated dopamine release from substantia nigra neurons. *Brain Res* 2000;874:158-164.
25. Lund-Anderson H. Transport of glucose from blood to brain. *Physiol Rev* 1979;59:305-352.
26. Lustman PJ, Griffith LS, Gavard JA, Clouse RE. Depression in adults with diabetes. *Diabetes Care* 1992;15:1631-1639.
27. Martin DL, Tobin AJ. Mechanisms controlling GABA synthesis and degradation in the brain. In: Martin DL, Olsen RW editors. *GABA in the nervous system: the view at fifty years*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p 25-41.
28. Mccall AL, The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes*, 1992;41:557-570.
29. McNay EC, McCarty RC, Gold PE. Fluctuations in brain glucose concentration during behavioral testing: dissociation between brain areas and between brains and blood. *Neurobiol Learn Mem* 2001;75:325-337.
30. Mooradian AD, Morin AM. Brain uptake of glucose in diabetes mellitus: role of glucose transporters. *Am J Med Sci* 1991; 301:173-177.
31. Parent MB, Master S, Kashlub S, Baker GB. Effects of antidepressant/antipanic drug phenelzine and its putative metabolite phenylethyldrazine on extracellular γ -aminobutyric acid levels in the striatum, *Biochem Pharmacol* 2002;63:57-64.
32. Pénicaud L, Leloup C, Lorsignol A, Alquier T, Guillaod E. Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:1-5.
33. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Sydney, Australia: Academic, 1986.
34. Petty F., GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. *J. Affect. Disord.* 1995;34:275-281.

35. Reagan LP, Magarinos AM, Lucas LR, Bueren AV, McCall AL, McEwen BS, Charron MJ. Regulation of GLUT3 glucose transporter in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Am J Physiol* 1999; 76:E879-E886.
36. Reagan LP, Gorovitz N, Hoskin EK, Alves SE, Katz EB, Grillo CA, Piroli GG, McEwen BS, Charron MJ. Localization and regulation of GLUT1x glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats. *PNAS* 2001;98(5):2820-2825.
37. Segel AS, Fanelli CG, Dence CS, Markham J, Videen TO, Paramore DS, Powers WJ, Cryer PE. Blood-to-brain glucose transport, cerebral glucose metabolism, and cerebral blood flow are not increased after hypoglycemia. *Diabetes* 2001;50:1911-1917.
38. Silver IA, Erecinska M. Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo- and hyperglycemic animal. *J Neurosci* 1994;14(8):5068-5076.
39. Smith WT, Londborg PD, Glaudin V, Painter JR. Is extended clonazepam cotherapy of fluoxetine effective for outpatients with major depression? *J Affect Disord* 2002;70:251-259.
40. Téllez-Zentero JF, Cardiel MH. Risk factors associated with depression in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 2002;33:53-60.
41. Vannucci SJ, Koehler-Stec ME, Li K, Reynolds HR, Clark R, Simpson IA. GLUT-4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res* 1998;797:1-11.

Legends

Figure 1 - Time line of microdialysis striatal sampling during experiments with fasted diabetic or non-diabetic rats treated or not with clonazepam (CNZ) at time zero and submitted to glucose overload after one hour. The three 20 min samples before time zero were used to calculate extracellular striatal baseline glucose levels. Blood glucose was determined every 40 minutes.

Figure 2 – Absolute concentrations of extracellular striatal glucose levels after 24 h fasting (time 0), after clonazepam 0.25 mg/kg (CNZ) and after oral glucose overload. Striatal glucose concentrations of diabetic rats is significantly higher in comparison to non-diabetic rats **A: Non-diabetic rats**: Open squares represent the rats treated with saline and full squares represent the rats treated with CNZ. **B: Diabetic rats**: Open circles represent the diabetic rats treated with saline and full circles represent the rats treated with CNZ. Values are mean \pm S.E.M. of 4-5 animal per group. * different from baseline; # different from diabetics non treated with clonazepam.

Figure 3- Striatal glucose levels changes are significantly elevated after oral glucose overload in diabetic and clonazepam treated rats. The much higher increase in percent changes of striatal glucose are due to an interaction between diabetes and treatment. Squares represent non-diabetic rats and circles represent diabetic rats. Open figures and lines represent saline treatment and full figures and lines represent clonazepam (CNZ) 0.25 mg/kg treatment. Values are means \pm SEM of 4-5 animal per group; * represents differences from baseline for all groups; # represents differences from clonazepam of both groups of non-diabetic rats and non-treated diabetic rats.

Figure 4 –Blood glucose levels of diabetic and non-diabetic rats in fasting, after treatment with clonazepam (CNZ) 0.25 mg/kg and after oral glucose overload. Open squares represent the non-

diabetic rats treated with saline and bold squares, the non non-diabetic rats treated whit CNZ.

Open circles represent the diabetic rats treated with saline and bold circles the animals treated

with CNZ. * $p < 0.05$, differs from other times; ** $p < 0.05$, differs from non-diabetic rats. Values

are mean \pm S.E.M. of 4-5 animal per group

Figure 1

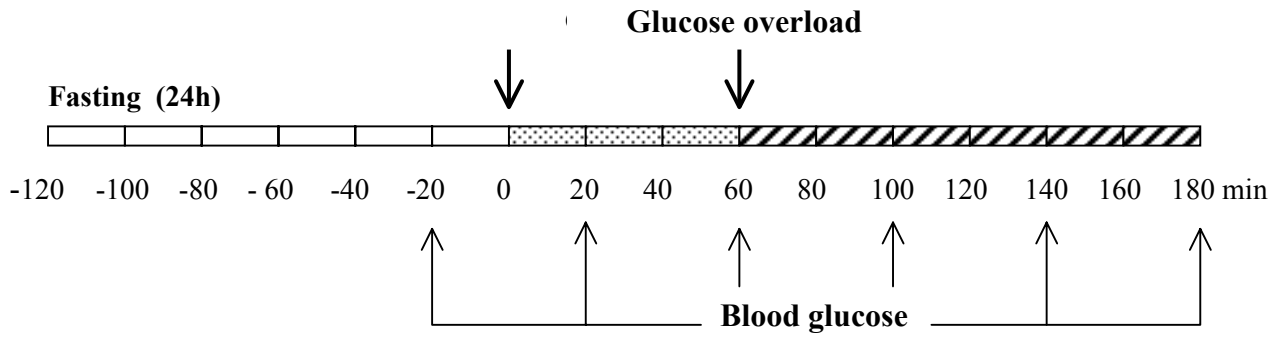


Figure 2

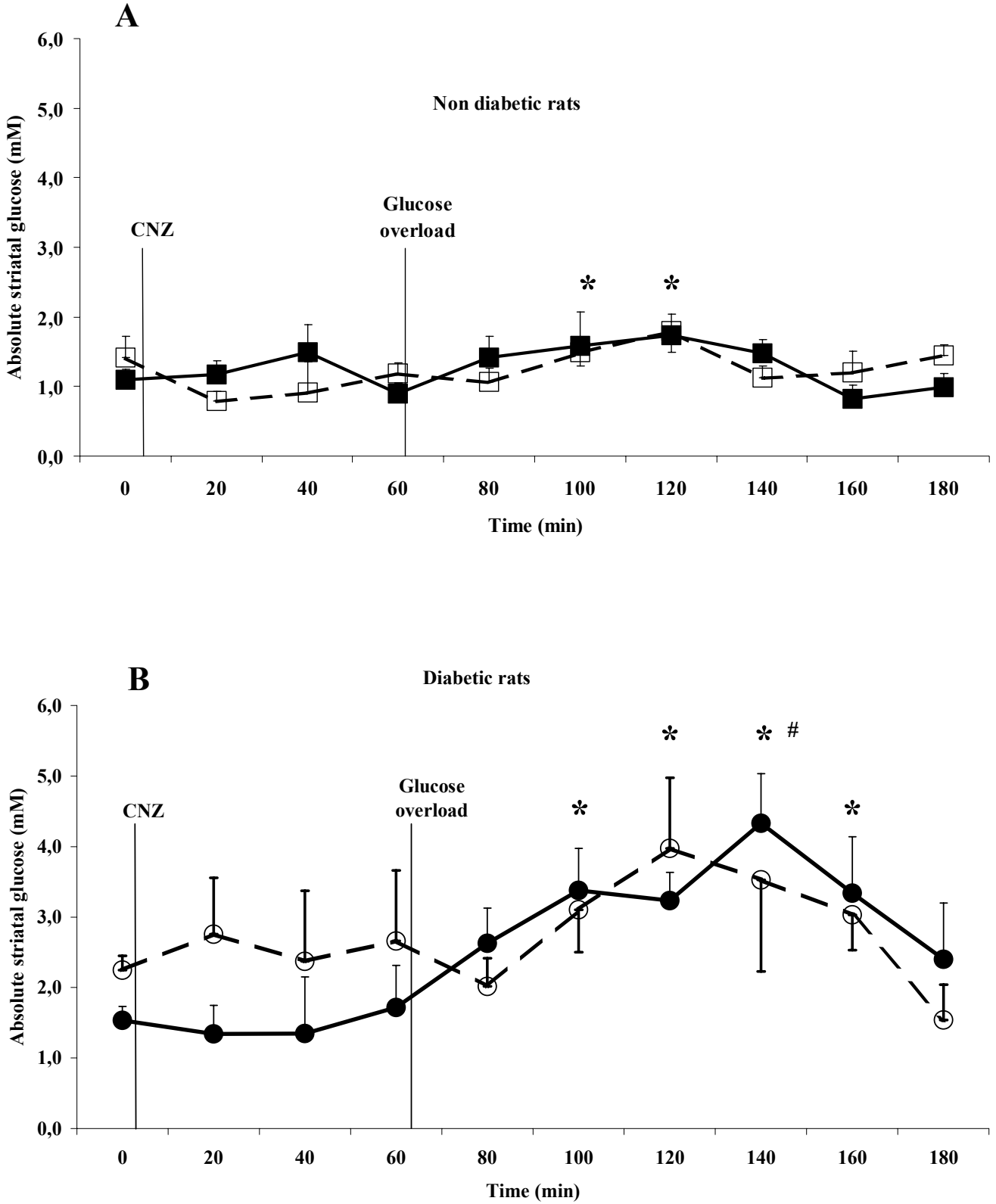


Figure 3

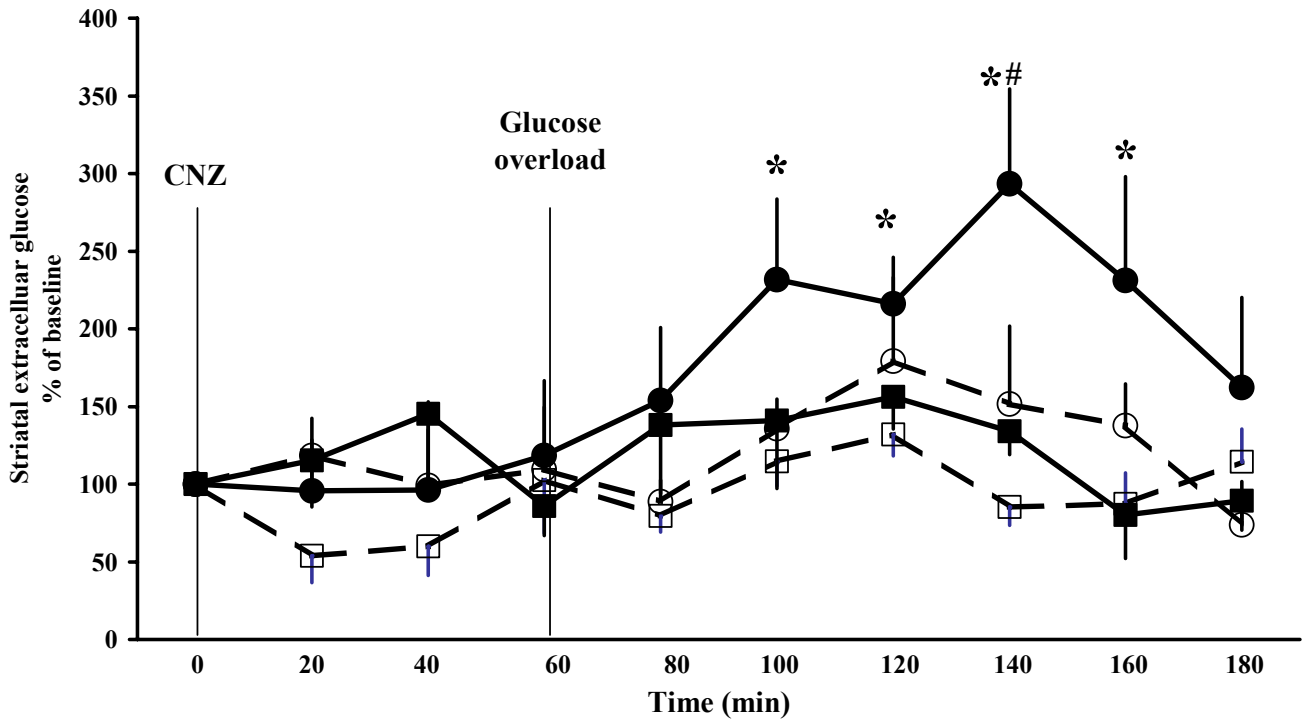
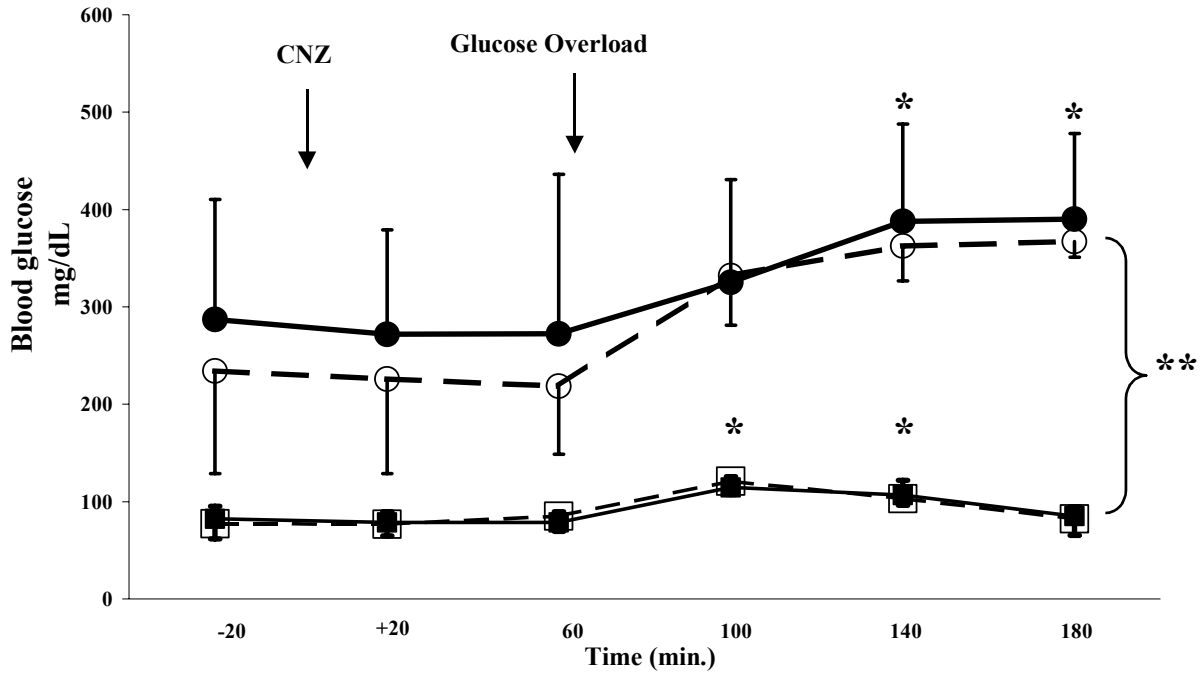


Figure 4



4.3 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

4.3.1 ARTIGO 4

Título: **Lower *in vivo* brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming**

Autores: **ROSANE GOMEZ**, Carmem R. Vargas, Moacir Wajner, Helena MT Barros

Periódico: BRAIN RESEARCH

Data: ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM 02.01.2003

Local de publicação: AMSTERDAN, HOLANDA

ISSN: 0006-8993

TEXTO DISPONÍVEL NO FORMATO PDF EM ARQUIVO ANEXO

4.4 ARTIGO EM PREPARAÇÃO

4.4.1 ARTIGO 4

Título: Depressive-like behavior correlated with lower striatal GABA levels in the forced swimming test.

Autores: ROSANE GOMEZ, Carmem R. Vargas, Moacir Wajner, Helena MT Barros

Periódico: BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH

ISSN: 0166-4328

**Depressive-like behavior correlated with lower striatal GABA levels in the
forced swimming test**

Rosane Gomez^a, Carmem R. Vargas^b, Moacir Wajner^b, Helena M. T. Barros^a.

^a Pharmacology Division, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

^b Genetics Division – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Complete address

Helena M.T. Barros

Pharmacology Division, FFFCMPA

R. Sarmiento Leite, 245

90050-170 - Porto Alegre, Brazil.

Phone: +55 -51-32248822 ext. 151

Fax: +55-51-32248822 ext 129

E-mail address: helenbar@ffcmpa.tche.br

rgomez@terra.com.br

Abstract

GABA is thought to participate in depression-type behaviors of diabetic rats since *in vivo* brain extracellular GABA level is lower during forced swim (FST) and because clonazepam, a GABA_A receptor positive modulator, reverses the diabetic rats immobile behavior. It was our objective to investigate if there is a correlation between *in vivo* striatal GABA levels and FST behaviors of diabetic rats. *In vivo* microdialysis was used to determine extracellular striatal GABA levels during the FST and videotapes of the tests were used to determine frequency and duration of immobile posture, swimming, climbing and head-shakes. Diabetic and non-diabetic rats were evaluated. Striatal *in vivo* GABA basal levels of diabetic rats were similar from those of non-diabetic rats. GABA concentration of non-diabetic rats increased more during the FST than in diabetic rats. There was a strong and significant negative correlation between immobile behaviors and striatal GABA levels during the FST. Concomitantly, there was a positive correlation of striatal GABA with climbing. It remains to be established if high glucose levels of any other metabolic derangement, such as insulin, glucagon, corticosterone concentration changes are responsible for the alteration of GABA homeostasis that amplifies depressive symptoms in diabetic individuals.

Keywords: microdialysis, streptozotocin, depression, forced-swim, diabetes

1. Introduction

Pancreas GABA levels are as high as in the central nervous system [22, 32] and GABA modulates insulin secretion [28]. In diabetic patients, the autoimmune destruction of the pancreatic beta cells involves the antigen glutamic acid decarboxylase (GAD). Diabetes, induced in humans by autoimmune processes or in animals by streptozotocin, decreases GABA and insulin in the pancreatic beta cells [1, 2, 22], but little information is available on the neurochemistry of GABA in the brain of diabetic individuals.

Diabetic patients may present anxiety and depression [9, 19] and GABA has been implicated in affect, social withdrawal, anxiety, and depression [25]. Considerable evidence from preclinical and clinical data suggest that GABA plays a role both in the pathophysiology of depression, and in the mechanisms of action of antidepressant agents and mood stabilizers [25, 30]. Plasma GABA levels are 15% lower in depressed patients when compared to non-depressed individuals [25], and its concentration in the cerebrospinal fluid is inversely correlated with the severity of depression [10]. In preclinical research it was established that striatum extracellular GABA level is higher in rats treated with antidepressants [23] and chronic administration of antidepressant decreases the density of cortical GABA_A receptors [29, 31].

The forced swimming test (FST) is used for experimental studies of depression and screening for new antidepressants. Several neurotransmitters are proposed to be involved in the neuronal circuitry activated in this model and ex-vivo GABA levels were shown to be decreased on specific occasions during the FST procedures [4]. More recent studies show that diabetic rats present longer immobility in the FST and clonazepam, a GABA_A receptor positive modulator, reverses this depressive-like behavior [11] and that diabetes is associated to decreased extracellular GABA levels when these individuals are submitted to the forced swimming test [12].

Since the *in vivo* microdialysis procedures allow the simultaneous determination of the levels of neurotransmitters and the behaviors taking place it was our objective to study if there is a correlation between striatal GABA concentrations and acts and postures in the forced swim.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (250-350 g) were obtained from the Animal House of Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). The animals were housed in the Pharmacology Division wards in a temperature-controlled room ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) under an artificial illumination cycle (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.), with rodent food pellets and water *ad libitum*. 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 FFFCMPA. All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2. Procedure

Diabetes was experimentally induced by a single intraperitoneal dose of streptozotocin (STZ) 60 mg/kg (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Increased blood glucose levels (200 mg/dL or higher) of the STZ group rats were confirmed 24 hours and 7 and 14 days after with a glucometer (Glucotrend, Boehringer Institute, Mannheim, Germany). Controls, non-diabetic rats (CTR), received intraperitoneal saline 1 ml/kg and were also submitted to blood glucose level measurements.

2.3. *In vivo microdialysis*

Seven days after diabetes induction, the STZ (n= 5) and CTR (n= 7) rats were anesthetized intraperitoneally with a mixture of 10 mg/kg ketamine and 50 mg/kg xylazine, and were placed into the stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA). Unilateral guide-cannulae for CMA 12 probes were implanted in the left striatum (bregma: antero-posterior + 0.2 mm, lateral + 3 mm and vertical: -5.0 mm), according to Paxinos and Watson, 1982. The guide-cannulae assembly was then fixed to the skull by means of three anchorage screws and dental cement. After recovering from anesthesia the animals were returned to their home cages and closely observed for one week.

After 14 days of diabetes induction and one day before microdialysis, rats from both groups were habituated for 5 hours, individually, to a containment system for freely moving animals, in which the animal is connected to the counterbalance arm and swivel through a plastic collar (CMA/120, Acton, MA). In the middle of this habituation session the animals were submitted to the forced swimming test [11, 26]. Briefly, in the first forced-swimming day, rats were individually placed, with no chance to escape, into an aquarium (25 x 25 x 38 cm) filled with 27 cm of cold water (25° C) for 15 minutes.

On the microdialysis experimental day, the probes (0.5 mm diameter with 4 mm dialyzing membrane, CMA/12, Acton, MA) were inserted into the guide-cannulae and the animals were put into the same animal containment apparatus described above. Artificial cerebrospinal fluid (NaCl 147 mM; CaCl₂ 2.3 mM; KCl, 4.0 mM; MgCl₂ 0.9 mM with unadjusted pH 7.1-7.3 was perfused through the probes (CMA/102, Acton, MA), at a constant flux rate of 0.8 µl/min. The microdialysis membrane was stabilized for one hour. Three samples were then collected at 30-min intervals to determine the baseline release of GABA. Experiments were performed between 9:00 a.m. and 3:00 p.m.

At 150 minutes after the introduction of the probes, both groups of animals were submitted to the retest sessions of the forced-swimming test, when the animals were introduced into the aquariums with cold water for 5 minutes, while connected to the microdialysis swivel and counterbalance arm. After rescue, the animals were carefully and gently dried and returned to the containment apparatus and microdialysis sampling continued to complete the 30-minute sample collection. An additional sample was collected in the next 30 minutes.

The forced swimming retest session was recorded on a videocassette tape. The recording was analyzed by a trained observer with the aid of a BASIC written software (Kevin Willioma, KD Ware Computer, Boston, MA). The frequency and duration of acts and postures of climbing, swimming, mobility, diving, head-shakes, and total immobility were detailed for each animal [Gomez and Barros, 2000]. Immobility was composed by the sum of freezing and floating. The animals were judged to be frozen, when performing no movement other than breathing or floating, when only slight paw movements to keep afloat was seen, without dislocation across the water. The mobile acts could be characterized as swimming or climbing. Swimming was measured when the rats were making vigorous lateral movements with their forepaws, displacing their bodies parallel to the aquarium walls, and climbing was counted when the rats were performing active up and down movements with both forepaws, close to the aquarium walls, as if trying to escape. Headshakes are counted when the animal makes abrupt horizontal head movements.

2.4. GABA analysis

The analysis of GABA was performed by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) using ODS column and fluorescent detection using orthophthaldialdehyde plus mercaptoethanol. The flow rate was 1.5 mL/min. in a gradient of the mobile phase (methanol and phosphate buffer: buffer A, 80% methanol; buffer B, 20% methanol), and the duration of each analysis was 45 minutes [15]. GABA was quantitatively determined by correlating the

chromatographic peak areas to that obtained from a known standard mixture and to that of the internal standard homocysteic acid.

2.5. Histology

After the completion of the microdialysis experiments, the rats were euthanized with an overdose of pentobarbital (50 mg/kg) and perfused intracardially with around 20 ml 0.9% saline, followed by perfusion with 10% formalin. The brains were carefully removed and stored in a 10% formalin solution until they were sectioned into coronal 40 μm slices collected consecutively through the extent of the guide cannula tract. An experienced histologist who was unaware of the behavioral results viewed the slide mounts.

2.6. Statistical analysis

Baseline GABA levels in diabetic and non-diabetic individuals were calculated by averaging the three samples collected at 90, 120, and 150 min after probe insertion and before swimming. Striatum GABA levels were analyzed using a two way-ANOVA test, considering the diabetic/non-diabetic factor and time. The baseline value was considered as a value before the behavioral procedure and the other two time values were the ones collected 30 min and 60 min after the behavioral procedure. Student "t" test for non-paired samples was used to compare the baseline striatum GABA concentrations of diabetic and non-diabetic rats and to compare each behavioral parameter of diabetic and non-diabetic rats in the FST. Pearson's Correlation was used to measure the strength of the association between GABA levels and the behaviors during the FST.

All data are expressed as mean \pm standard error of the mean. Significant differences were accepted for $p < 0.05$.

3. Results

FST sessions were analyzed by the ethological paradigm to better describe the behavioral changes induced by diabetes in rats during the concomitant evaluation of forced-swimming and microdialysis. The behavioral detailing disclosed that diabetic rats presented longer immobility in comparison to non-diabetic rats ($t_{df=11}=2.81$, $p= 0.017$) as specified in Table 1. The longer immobility was due to longer duration of freezing ($t_{df=11}=2.845$, $p= 0.016$) since floating did not show difference between diabetic and non-diabetic rats. Consequently, the diabetic rats spent significantly less time executing mobile acts. Climbing, that denotes tentative escapes, was significantly shorter in the diabetic group ($t_{df=11}=2.822$, $p= 0.017$).

Because the animals alternate the acts that are evaluated during the forced-swimming it is also possible to count each one of the events during the test. It may be seen that the diabetic rats never attempted to swim, accounting for the significant difference from non-diabetic animals ($t_{df=11}=2.258$, $p= 0.045$).

Baseline GABA levels were initially analysed to compare diabetic and non-diabetic rats previously to the swim procedure. The mean baseline striatal GABA concentration of non-diabetic rats was similar to that of diabetic rats ($t_{df=11}=0.891$, $p= 0.399$). When all samples, including the ones after the forced- swimming where compared there was a significant difference of GABA in striatum microdialysates of diabetic rats, who showed lower levels than the controls, as may be seen in Table 2 ($F_{(1,30)}= 6.890$ $p=0.014$).

There is a strong and significant correlation between several behavioral parameters during the FST and striatal extracellular GABA concentrations during the forced swim (30 minutes) and shortly after the forced swim (60 minutes) as presented in Table 3. At both times total immobility and freezing show negative correlation with GABA concentrations, higher immobility scores are related to lower GABA levels. On the contrary, animals with higher GABA levels presented more climbing and higher total mobile behavior scores.

4. Discussion

Because diabetes has been associated with depression and GABAergic neurochemical changes have been implicated in depressive symptoms, we undertook *in vivo* GABA determination of non-diabetic and diabetic rats submitted to the forced swimming. This study shows that diabetes *per se* does not modify basal striatal GABA levels. Another recent studies also found that there was no difference in basal extracellular cortical GABA levels in streptozotocin-induced diabetic rats [12, 13]. These experimental observations seem discrepant, since these diabetic animals are the ones that show more intense depressive-like behaviors and decreased GABA function has been implicated in mood disorders [21, 25]. In depressed patients, cerebrospinal fluid GABA levels are decreased and inversely correlated with the severity of symptoms [10, 25] and mood improves with treatment with GABA_A receptor agonists [8, 20]. Therefore the forced swim procedure seems to replicate these clinical observations in rodents showing an inverse correlation between extracellular GABA level and immobility. It seems relevant to us that in the clinical studies, the association between GABA levels and depression was made when depressive symptoms were present. Image studies show the variations at prefrontal cortex and striatum during depression are not seen when patients enter remission phases [7]. These areas are proposed to exert inhibitory functions upon the hippocampus in normal individuals. If depressive patients are not expected to show alteration in GABA levels during remission phases of the mood disorder, one should not expect to see GABA changes in rats while they are not showing the characteristic depressive-like immobile behavior during forced-swimming.

Most information on neurotransmitter changes after depression animal models are from ex-vivo studies and deal with monoamines [6]. GABA turnover is increased in brain areas of animals submitted to olfactory bulbectomy [16] and learned helplessness [18]. Cortex and accumbens GABA levels are decreased immediately and transiently after forced swimming [4].

With the microdialysis studies, temporal analyses of neurotransmitter changes are obtained during the behavioral experimental procedures. Higher increments in striatal GABA concentrations are seen in non-diabetic animals, the ones that show less immobility [12]. In general depression has been associated with serotonin and norepinephrine hypofunction. Lower extracellular 5-HT release in forebrain areas innervated by projections from dorsal raphe nucleus neurons is seen in animals submitted to the FST [17]. The interplay of the monoaminergic and GABAergic systems during the FST is beginning to be elucidated. In the dorsal raphe, forced swimming increases *c-fos* expression in neurons containing both corticotrophin releasing hormone receptors and GABA in dorsolateral raphe proposed to inhibit 5-HT neurons [27]. The authors of the former study propose that GABA levels are responsible for depressive type behaviors of rats in the forced swimming test, which are diverse from our demonstration of inverse correlation between GABA and immobility. The immediate and long-term consequences of the increase of extracellular or neuronal GABA upon behavioral functions remains to be explored. It would be interesting to see a correlation study between brain regions GABA immunostaining and immobile behaviors of animals submitted to the FST.

The different degrees of increase of extracellular striatal GABA during the forced swimming, seen between non-diabetic and diabetic rats, may explain their behavioral differences. Diabetic rats are more immobile in the FST, a behavior that may be interpreted as a sign of depression, and show fewer and shorter bouts of escape efforts. It also calls one's attention that diabetic animals present more freezing (and almost drowning) which can be taken as a more intense type of immobility. Therefore, we replicate previous behavioral results [11] and determine that there is a strong correlation between low GABA extracellular levels and immobility and freezing. It has long been proposed that several hormonal and neurochemical brain changes accompanying diabetes may be associated with anxiety and depression [3, 11]. Because increased immobility of diabetic rats is reversed by insulin treatment [14] or by treatment with a GABA_A

positive modulator clonazepam [11], future studies should determine if these treatments change the low GABA levels of the diabetic animals.

Acknowledgement

Research supported by a CNPq research grant (522800/95-5). Rosane Gomez receives a doctoral scholarship from CAPES (Programa de Pós-Graduação em Fisiologia- UFRGS) and Helena MT Barros receives a CNPq 1C Researcher Productivity Grant.

References

- [1] Adeghate E, Ponery AS. GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell* 2002; 34:1-6.
- [2] Atkinson MA, Kaufman DL, Newman D, Tobin AJ, Maclaren NK. Islet cells cytoplasmic autoantibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin dependent diabetes. *J Clin Invest* 1993; 91:350-356.
- [3] Bellush LL, Reid SG, North D. The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. *Physiol Behav* 1991; 50:973-981.
- [4] Borsini F, Mancinelli A, D'Aranno V, Evangelista S, Meli A. On the role of endogenous GABA in the forced swimming test in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 29:275-279.
- [5] Bourne JA. Intracerebral microdialysis: 30 years as a toll for the neuroscientist. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30:16-24.
- [6] Connor TJ, Kelly JP, Leonard BE. Forced swim test-induced neurochemical, endocrine, and immune changes in the rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 58:961-967.
- [7] Drevets WC. Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 813-829.

- [8] Freeman MP, Freeman AS, McElroy SL. The comorbidity of bipolar anxiety disorders: prevalence, psychobiology, and treatment issues. *J Affect Disord* 2002; 68:1-23.
- [9] Gavard JA, Lustman PJ, Clouse RE. Prevalence of depression in adults with diabetes, *Diabetes Care* 1993; 16:1167-1178.
- [10] Gerber RH, Hare T.A. CSF GABA in normal subjects and patients with depression, schizophrenia, mania, and anorexia nervosa. *Am J Psychiatry* 1981; 138:1098-1101.
- [11] Gomez R, Barros HMT. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 66:329-335.
- [12] Gomez R, Barros HMT. Lower in vivo brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. *Brain Res* 2003; 1:000-000 (in press).
- [13] Guyot LL, Diaz FG, O'Regan MH, Song D, Phillis JW. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the release of excitotoxic and other amino acids from the ischemic rat cerebral cortex. *Neurosurgery* 2001;48:385-391.
- [14] Hilakivi-Clarke LA, Wozniak KM, Durcan MJ, Linnoila M. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiol Behav* 1990; 48:429-433.
- [15] Joseph MH, Marsden CA. Amino acids and small peptides. In: Lim, C.K., eds. *HPLC of Small Peptides*; Oxford: IRL Press; 1986:13-27.
- [16] Kelly JP, Wrynn AS, Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther* 1997; 74:299-316.
- [17] Kirby LG, Lucki I. Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282:967-76.
- [18] Kram ML, Kramer GL, Steciuk M, Ronam PJ, Petty F. Effect of learned helplessness on brain GABA receptors. *Neurosci Res* 2000; 38:193-198.

- [19] Lustman PJ, Griffith LS, Gavard JA, Clouse RE. Depression in adults with diabetes. *Diabetes Care* 1992; 15:1631-1639.
- [20] Morishita S, Aoki S, Watanbe S. Clonazepam as a therapeutic adjunct to improve the management of psychiatric disorders. *Psychiatr Clin Neurosci* 1998; 52:75-78.
- [21] Nagatani T, Sugihara T, Kodaiara R. The effect of diazepam and of agents which change GABAergic functions in immobility in mice. *Europ J Pharmacol* 1984; 97:271-275.
- [22] Okada Y. Localization and function of GABA in pancreas islet. In: Erdö SL, Bowery NG. eds. *GABAergic mechanisms in the mammalian periphery*. New York: Raven Press; 1986:223-240.
- [23] Parent MB, Master S, Kashlub S, Baker GB. Effects of antidepressant/antipanic drug phenelzine and its putative metabolite phenylethylamine on extracellular γ -aminobutyric acid levels in the striatum. *Biochem Pharmacol* 2002; 63:57-64.
- [24] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic; 1986.
- [25] Petty F. GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. *J Affect Disord* 1995; 34:275-281.
- [26] Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new model sensitive to antidepressant treatment. *Nature* 1977; 266:730-732.
- [27] Roche M, Commons KG, Peoples A, Valentino RJ. Circuitry underlying regulation of the serotonergic system by swim stress. *J Neurosci* 2003; 23(3):970-977.
- [28] Rorsman P, Berggren P, Bokvist K, Ericson H, Möhler H, Östenson C. Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABA_A-receptor chloride channels. *Nature* 1989; 341:233-236.
- [29] Scatton B, Lloyd KG, Zivcovic B, Dennis T, Claustre Y, Dedek J, Arbilla S, Langer SZ, Bartholini G. Fengabine, a novel antidepressant GABAergic agent. ii. Effect on cerebral

- noradrenergic, serotonergic and GABAergic transmission in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 241:241-257.
- [30] Shiah I.-S, Yatham LN. GABA function in mood disorders: an update and critical review. *Life Science* 1998; 63:1289-1303.
- [31] Surany-Cadotte BE, Dam TV, Quirion R. Antridepressant-anxiolytic interaction: decreased density of benzodiazepine receptors in rat brain following chronic administration of antidepressants. *Eur J Pharmacol* 1985; 106:673-675.
- [32] Tillakaratne NJK, Medina-Kauwe L, Gibson KM. Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian and non-neural tissues. *Comp Biochem Physiol* 1995; 112A:247-263.

Table 1: Frequency and duration of acts and postures performed by streptozotocin-induced diabetic rats (STZ) and non-diabetic control rats during the forced swimming test (FST). Immobility refers to the sum of freezing + floating. Mobility refers to the sum of climbing + swimming. Values represent mean \pm S.E.M. * represents difference from non-diabetic rats, $p < 0.05$.

	Non-diabetic (n= 7)	diabetic (n= 5)
Duration (sec)		
freezing	22.67 \pm 7.12	75.83 \pm 16.1*
floating	44.83 \pm 15.2	70.33 \pm 7.0
immobility	67.50 \pm 22.03	146.17 \pm 16.3*
climbing	225.50 \pm 23.20	149.00 \pm 16.9*
swimming	1.00 \pm 0.6	0.00 \pm 0.0
mobility	229.50 \pm 23.0	149.50 \pm 16.4*
Frequency		
freezing	5.67 \pm 1.5	12.00 \pm 4.5
floating	6.33 \pm 1.6	11.67 \pm 4.5
immobility	12.00 \pm 3.1	23.67 \pm 8.9
climbing	6.00 \pm 0.9	7.17 \pm 2.5
swimming	0.83 \pm 0.4	0.00 \pm 0.0*
mobility	6.83 \pm 1.14	7.17 \pm 2.5
head shakes	27.67 \pm 3.9	27.33 \pm 10.5

Table 2 - Extracellular striatal GABA levels ($\mu\text{M/L}$) at baseline and after the forced swimming test (FST) of diabetic and non-diabetic rats. Bold represents lower values in respect to non-diabetic rats.

	Non-diabetic (n=7)	Diabetic (n=5)
Baseline	6.2 \pm 1.3	4.0 \pm 1.1
After 30 min of FST	7.3 \pm 1.9	3.4 \pm 1.0
After 60 min of FST	8.3 \pm 1.8	4.3 \pm 1.0

Table 3: Correlation coefficients (r) of frequency and duration of acts and postures during the forced swimming test (FST) and extracellular GABA levels [GABA] obtained by microdialysis during the forced-swim (30 min) and after forced-swim (60 min). GABA levels in samples obtained after these two periods did not show any correlation. Immobility refers to the sum of freezing + floating. Mobility refers to the sum of climbing + swimming. **Bold** denotes significant correlation, $p < 0.05$.

Behavior	[GABA] 30 min	[GABA] 60min
Duration (sec)	r	r
freezing	- 0.720	-0.686
floating	- 0.583	-0.610
immobility	- 0.794	-0.783
climbing	0.871	0.803
swimming	0.017	-0.061
mobility	0.867	0.789
Frequency		
freezing	- 0.768	-0.720
floating	- 0.804	-0.766
immobility	- 0.787	-0.738
climbing	- 0.394	-0.208
swimming	- 0.073	-0.105
mobility	- 0.317	-0.194
head-shake	- 0.041	0.06

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os diferentes resultados obtidos nos trabalhos incluídos nesta tese mostram que as alterações metabólicas decorrentes do diabetes podem afetar a homeostasia do SNC. O controle dos níveis glicêmicos, por sua vez, está comprometido em pacientes diabéticos deprimidos. O tratamento da depressão de pacientes diabéticos também merece cuidado especial para evitarem-se as complicações decorrentes de variações glicêmicas bruscas e indesejáveis, resultantes do emprego de antidepressivos ou da interação destes com a insulina e os hipoglicemiantes orais.

Nos dois primeiros trabalhos, ficou claro que o emprego de diferentes antidepressivos pode interferir na glicemia ou na secreção de insulina. O uso agudo de imipramina ou de clonazepam não afetou a glicemia, independentemente da sobrecarga de glicose, ao passo que fluoxetina e moclobemida aumentaram-na em diferentes tempos. Sertralina, ao contrário, reduziu a glicose sanguínea após a sobrecarga de glicose, efeito associado a um aumento da secreção de insulina. Faz-se necessário continuar este estudo, avaliando-se as alterações glicêmicas e de insulina pelo emprego crônico dos diferentes antidepressivos em ratos diabéticos e não diabéticos, testando também sua eficácia farmacológica neste último grupo. Deriva também deste trabalho a necessidade de se identificar os mecanismos envolvidos na secreção de insulina estimulada pela glicose após o uso de fármacos como sertralina.

Afora isso, esses estudos pré-clínicos servem de estímulo para que se determine a incidência de depressão em pacientes diabéticos e com intolerância a glicose. Os resultados de tais estudos poderiam ser úteis para definir a necessidade de acompanhamento psiquiátrico destes pacientes.

Buscando esclarecimento sobre o papel do GABA na depressão, uma vez que estudos anteriores, levados a efeito no mesmo laboratório onde se realizou a presente pesquisa, revelaram que os ratos diabéticos apresentam um comportamento tipo depressivo no nado forçado e que esse comportamento é revertido pelo emprego de clonazepam, utilizou-se a técnica de microdiálise para determinar as variações de glicose *in vivo* no estriado de ratos tratados com clonazepam. Também foi empregada a mesma técnica para relacionar as alterações comportamentais com a concentração de GABA extracelular no estriado de ratos durante e após o teste de nado forçado. Os resultados revelaram que, embora a concentração de glicose sangüínea seja elevada no diabete, a taxa de transferência da glicose do sangue para o cérebro é menor em ratos diabéticos e que clonazepam, embora não altere essa taxa de transferência, aumenta a concentração de glicose estriatal nos animais diabéticos após sobrecarga de glicose. Portanto, mais investigações são necessárias para avaliar as conseqüências desse aumento de glicose local, adotando talvez a microdiálise reversa, pela infusão de glicose junto com o LCR na sonda, disponibilizando glicose para diferentes regiões cerebrais de ratos e avaliando alterações de comportamento no nado forçado.

Em consonância com dados da literatura, os resultados aqui obtidos mostram que as alterações nos sistemas neurotransmissores ocorrem de acordo com as oscilações de humor. Numa situação normal, em que o rato fica em ambiente conhecido, o diabete não interfere na concentração extracelular de GABA. Porém, na situação do estresse do nado que, segundo Porsolt et al (1977), reproduz alguns aspectos da depressão em humanos, observou-se uma diferença funcional no sistema GABAérgico dos animais diabéticos. Nesses animais o retardo de quase 30 minutos para atingir níveis semelhantes aos dos não diabéticos demonstra que os elevados níveis de glicose cerebral afetam, de algum modo, o sistema GABAérgico. E mais, essa alteração está diretamente relacionada com os comportamentos de nadar, observada pelas relações inversas entre a concentração de GABA no estriado e o tempo de imobilidade no nado forçado. Com o objetivo

de associar esses resultados aos da glicose, poder-se-ia propor a implantação de sondas bilaterais para avaliação dos comportamentos de nado forçado, relacionados com alterações de glicose e GABA em diferentes regiões cerebrais, o que permitiria relacionar GABA, glicose e comportamento. Sem contar que se poderia administrar diferentes antidepressivos para avaliar seus efeitos sobre o GABA e a glicose nessas regiões cerebrais, durante e após o nado forçado.

Em suma, reconhecer e tratar adequadamente a depressão em pacientes com predisposição para o diabetes ou diabéticos depende do conhecimento dos antidepressivos que menos interajam clinicamente com a utilização periférica de glicose e/ou sua produção endógena. O entendimento das alterações fisiológicas centrais determinadas pela hiperglicemia crônica, e possivelmente relacionadas com o aparecimento da depressão, também auxilia no desenvolvimento de novos fármacos com maior eficácia antidepressiva e menos efeitos colaterais. Poderia se pressupor que o tratamento da depressão em pacientes diabéticos venha a envolver a reposição do neurotransmissor GABA ou a utilização de agentes que atuem diretamente sobre seus receptores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(As referências abaixo foram citadas no texto e não incluem, necessariamente, as referências citadas nos artigos.)

ADEGHATE E & PONERY AS. GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. **Tissue Cell** 34:1-6, 2002.

ALQUIER T, LELOUP C, ARNAUD E, MAGNAN C, PÉNICAUD L. Altered Glut4 mRNA levels in specific brain areas of hyperglycemic-hyperinsulinemic rats. **Neurosc Lett** 308: 75-78, 2001

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. ADA-Diagnosis & Lab Tests. Disponível em <<http://www.diabetes.org/main/typ1/medical/diagnosis/jsp>>. Acesso em 20 Jan 2003.

ASHFORD MLJ, BODEN PR, TREHERME JM. Glucose-induced excitation of hypothalamic neurons is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. **Pflugers Arch** 415:479-483, 1990.

BAEKESKOV S, AANSTOOT HJ, CHRISTAUG S, REETZ A, SOLIMENA M, CASCALHO M, FOLLI F, RICHTER-OLESEN H, CAMILLI P. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Nature** 347: 13-17, 1990.

BARROS HM & FERIGOLO M. Ethopharmacology of imipramine in the forced swimming test: gender differences. **Neurosc Biobehv Rev** 23(2):279-286, 1998.

BAUMANN B, DANOS P, KRELL D, DIECKMANN S, LESCHINGER A, STAUCH R. Reduced volume of limbic system-affiliated basal ganglia in mood disorders: preliminary data from postmortem study. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci** 11: 71-78, 1999.

BELL DS. Stroke in the diabetic patients. **Diabetes Care** 17: 213-219, 1994.

- BELLUSH LL, REID SG, NORTH D. The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. **Physiol Behav** 50: 973-981, 1991.
- BERGER L & HAKIM AM. The association of hyperglycemia with cerebral edema in stroke. **Stroke** 17: 865-871, 1986.
- BIESSELS GJ, VAN DER HEIDE LP, KAMAL A, BLEYS RL, GISPEN WH. Ageing and diabetes: implications for brain function. **Eur J Pharmacol** 441: 1-14, 2002.
- BOURNE JA. Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 30:16-24, 2003.
- BOWERY NG. GABA_B receptors: structure and function. In: MARTIN DL & OLSEN RW editors. **GABA in the nervous system: the view at fifty years**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000, p. 233-244.
- BREUM L, BJERRE B, BAK JF, JACOBSEN S, ASTRUP A. Long-term effects of fluoxetine on glycemic control in obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus or glucose intolerance: influence on muscle glycogen synthase and insulin receptor kinase activity. **Metabolism** 44: 1750-76, 1995.
- BUCHSBAUM MS, WU J, SIEGEL BV, HACKETT E, TRENARY M, ABEL L, REYNOLDS C. Effect of sertraline on regional metabolic rate in patients with affective disorders. **Biol Psychiatry** 41: 15-22, 1997.
- CAMERON OG, KRONFOL Z, GREDEN JF & CAROLL BJ. Hypothalamic pituitary adrenocortical activity in patients with diabetes mellitus. **Arch Gen Psych** 41: 1090-1095, 1984.
- CHU PC, LIN MT, SHIAN LR, LEU SY. Alterations in physiologic functions and in brain monoamine content in streptozocin-diabetic rats. **Diabetes** 35(4): 481-5, 1986.
- COOPER AJ & ASHCROFT G. Potentiation of insulin hypoglycaemia by MAOI antidepressant drugs. **Lancet** 1: 407-409, 1966.

- COX JA & HENNEBERRY RC. Excitatory amino acid neurotoxicity and the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured neurons: role of the voltage-dependent magnesium block. **Brain Res.** 499: 267-272, 1989.
- CRYER PE, FISHER JN SHAMOON H. Hypoglycemia. **Diabetes Care** 17: 734-755, 1994.
- DAUBRESSE JC, KOLANOWSKI J, KRZENTOWSKI G, KUTNOWSKI M, SCHEEN, A. VAN GAAL, L. Usefulness of fluoxetine in obese non-insulin-dependent diabetics: a multicenter study. **Obes Res** 4(4): 391-96, 1996.
- DENNIS T, BEAUCHEMIN V, LAVOIE N. Differential effects of olfactory bulbectomy on GABAA and GABAB receptors in the rat brain. **Pharmacol Biochem Behav** 46(1): 77-82, 1993.
- DREVETS WC. Neuroimaging studies of mood disorders. **Biol Psychiatry** 48: 813-829, 2000.
- DUARTE A, SANTOS M, SEICA R, RESENDE DE OLIVEIRA C. Effect of oxidative stress on the uptake of GABA and glutamate in synaptosomes isolated from diabetic rat brain. **Neuroendocrinology** 72: 179-86, 2000.
- DUCKROW RB, BEARD DC, BRENNAN RW. Regional cerebral blood flow decreases during hyperglycemia. **Ann Neurol** 17: 267-272, 1985.
- DURING MJ, PAOLA L, DAVIS KE, KERR D, SHERWIN RS. Glucose modulates rat substantia nigra GABA release in vivo via ATP-sensitive potassium channels. **J Clin Invest** 95(5): 2403-2408, 1995.
- EMRICH HM, VON ZERSSSEN DV, KISSLING W, MOLLER HJ. On a possible role of GABA in mania. Therapeutic efficacy of sodium valproate. **Adv Biochem Psychopharmacol** 26: 287-96, 1981.
- ERENMEMISOGLU A, OZDOGAN UK, SARAYMEN R, TUTUS A. Effect of some antidepressants on glycaemia and insulin levels of normoglycaemic and alloxan-induced hyperglycaemic mice. **J Pharm Pharmacol** 51(6): 741-743, 1999.

- FERIGOLO M, BARROS HMT, MARQUARDT AR, TANNHAUSER M. Comparison of behavioral effects of moclobemide and deprenyl during forced swimming. **Pharmacol Biochem Behav** 60(2):431-437, 1998.
- GAVARD JA, LUSTMAN PJ, CLOUSE RE. Prevalence of depression in adults with diabetes. **Diabetes Care** 16: 1167-1178, 1993.
- GISPEN WH & BIESELS GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. **Trend Neurosci** 23: 542-549, 2000.
- GOMEZ R. Efeito do clonazepam sobre a depressão e ansiedade em diabéticos: um estudo com modelos animais. [Dissertação] – Porto Alegre: Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, 1997.
- GOMEZ R & BARROS HMT. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. **Pharmacol Biochem Behav** 66: 329-335, 2000.
- GOMEZ R, ASNIS N, TANNHAUSER SL, BARROS HMT. GABA agonists differentially modify blood glucose levels of diabetic rats. **Jpn J Pharmacol** 80: 327-31, 1999.
- GOODNICK PJ, HENRY JH, BUKI VM. Treatment of depression in patients with diabetes mellitus. **J Clin Psychiatry** 56(4): 128-136, 1995.
- GOODNICK PJ, KUMAR A, HENRY JH, BUKI VM, GOLDBERG RB. Sertraline in coexisting major depression and diabetes mellitus. **Psychopharmacol Bull** 33(2): 261-264, 1997.
- GUPTA B, AWASTHI A, JAJU BP. Effect of acute & chronic imipramine treatment on glucose homeostasis. **Indian J Medic Res** 96: 65-71, 1992.
- GUPTA B, SHAKARWAL MK, KUMAR A, JAJU BP. Effect of amitriptyline on blood glucose level in rabbits. **Indian J Physiol Pharmacol** 39(3): 279-82, 1995.
- GUYOT LL, DIAZ FG, O'REGAN MH, SONG D, PHILLIS JW. 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, 2001.

- HELGASON CM. Blood glucose and stroke. **Stroke** 19: 1049-1053, 1988.
- HILAKIVI-CLARKE LA, WOZNIAK KM, DURCAN MJ, LINNOILA M. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. **Physiol Behav** 48: 429-433, 1990.
- JAKOBSEN J, KNUDSEN GM, JUHLER M. Cation permeability of the blood-brain barrier in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia** 30: 409-413, 1987.
- JANCSAR SM & LEONARD BE. Changes in neurotransmitter metabolism following olfactory bulbectomy in the rat. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 8(2): 263-269, 1984.
- JEREMY JY, MIKHAILIDIS DP, THOMPSON CS, DANDONA P. Changes in eicosanoid synthesis in the cerebrum, cerebellum and brain stem of the diabetic rat. **Diabetes Res** 6: 95-98, 1987.
- KAPLAN SM, MASS JW, PIXLEY JM & ROSS D. Use of imipramine in diabetes. Effects on glycosuria and blood sugar levels. **J Am Med Assoc** 174: 511-517, 1960.
- KASTRUP J, PETERSEN P, DEJGARD A. Intravenous lidocaine and cerebral flow: impairment microvascular reactivity in diabetic patients. **J Clin Pharmacol** 30: 318-323, 1990.
- KELLER K, DUELLI R, VOGEL J, SCHROCK H, KUSCHINSKY W. Autoradiographic analysis of the regional distribution of Glut4 glucose transporters in the rat brain. **Brain Res** 698: 175-179, 1995.
- KHAN SH & SHUAIB A. The technique of intracerebral microdialysis. **Methods** 23:3-9, 2001.
- KIESSLING M, AUER RN, KLEIHUES P, SIESJÖ BK. Verebral protein synthesis during long-term recovery from severe hypoglycemia. **J Cereb Blood Flow Metab** 6: 42-51, 1986.
- KOBAYASHI M, NIKAMI H, MORIMATSU M, SAITO M. Expression and localization of insulin-regulable glucose transporter (GLUT4) in rat brain. **Neurosc Letters** 213: 103-106, 1996.

- KUMAGAI AK. Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. **Diabetes Metab Res Rev** 15: 261-273, 1999.
- LACKOVICK Z, SALKOVIC M, KUCI Z, RELJA M. Effect of long-lasting diabetes mellitus on rat and human brain monoamines. **J Neurochem** 54(1): 143-147, 1990.
- LEVIN BE. Metabolic sensors: viewing glucosensing neurons from a broader perspective. **Physiol Behav** 76: 397-401, 2002.
- LIKE, AA, & ROSSINI, AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. **Science** 193: 415-417, 1976.
- LIM DK, LEE KM, HO IK. Changes in the central dopaminergic systems in the streptozotocin-induced diabetic rats. **Arch Pharm Res** 17(6): 398-404, 1994.
- LLOYD KG & PICHAT P. GABA synapses, depression, and antidepressant drugs. **Psychopharmacol** 3: 113-326, 1987.
- LUND-ANDERSON H. Transport of glucose from blood to brain. **Physiol Rev** 59: 305-352, 1979.
- LUSTMAN PJ, CLOUSE RE, FREEDLAND KE. Management of major depression in adults with diabetes: implications of recent clinical trials. **Semin Clin Neuropsychiatry** 3(2): 102-14, 1998.
- LUSTMAN PJ, GRIFFITH LS, FREEDLAND KE & CLOUSE RE. The course of major depression in diabetes. **Gen Hosp Psych** 19: 138-143, 1997.
- LUSTMAN PJ, GRIFFITH LS, GAVARD JA, CLOUSE RE. Depression in adults with diabetes, **Diabetes Care** 15: 1631-1639, 1992.
- MACCDONALD RL & HASS KF. Kinetic properties of GABA_A receptors channel. In: MARTIN DL & OLSEN RW editors. **GABA in the nervous system: the view at fifty years**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000, p. 141-166.

- MAES M & MELTZER HY. The serotonin hypotheses of major depression. In: BLOOM FE, KUPFER DJ (Eds), **Psychopharmacology. The Forth Generation of Progress**. New York, Raven Press, pp. 933-944. 1995.
- MAHEUX P, DUCROS F, BOURQUE J, GARON J, CHIASSON JL. Fluoxetine improves insulin sensitivity in obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus independently of weight loss. **Int J Obes Relat Metab Disord** 21(2): 97-102, 1997.
- MALERBI D & FRANCO LJ. Brazilian cooperative group on the study of diabetes prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care** 15: 509-16, 1992.
- MANKOVSKY BN, METZGER BE, MOLITCH ME, BILLER J. Cerebro-vascular disorders in patients with diabetes mellitus. **J Diabetes Its Complicat** 10: 228-242, 1997.
- MARTIJENA ID, TAPIA M, MOLINA VA. Altered behavioral and neurochemical response to stress in benzodiazepine-withdrawn rats. **Brain Res** 712: 239-244, 1996.
- MARTIN DL & TOBIN AJ. Mechanisms controlling GABA synthesis and degradation in the brain. In: MARTIN DL & OLSEN RW editors. **GABA in the nervous system: the view at fifty years**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000, p. 25-42.
- MARTIN P, MASSOL J, PICHAT P, PUECH AJ. Decreased central GABA B receptor binding sites in diabetic rats. **Neuropsychobiology** 19(3): 146-148, 1988.
- MARTIN P, PICHAT P, MASSOL J, SOUBRIE P, LLOYD KG, PUECH AJ. Decreased GABA B receptors in helpless rats: reversal by tricyclic antidepressants. **Neuropsychobiology** 22(4): 220-224, 1989.
- MASSOL J, MARTINS P, BELON JP, PUECH AJ, SOUBRIE P. Helpless behavior (escape deficit) in streptozotocin-diabetic rats: resistance to antidepressant drugs. **Psychoneuroendocrinology**, 14: 145-153, 1989.
- MCCALL AL. The impact of diabetes on the CNS. **Diabetes** 41: 557-70, 1992.

- MOORADIAN AD & MORIN AM. Brain uptake of glucose in diabetes mellitus: role of glucose transporters. **Am J Med Sci** 301: 173-177, 1991.
- MORISHITA S, AOKI S, WATANBE S. Clonazepam as a therapeutic adjunct to improve the management of psychiatric disorders, **Psychiatr Cil Neurosci** 52: 75-78, 1998.
- NAKHOODA AF, LIKE AA, CHAPPEL, DVM, MURRAY, FT, MARLISS, EB. The spontaneously diabetic Wistar rat. **Diabetes** 26: 100-111, 1976.
- NISHIZAKI T & MOTSUOKA T. Low Glucose enhances Na⁺/glucose transporter in bovine brain artery endothelial cells. **Stroke** 29: 844-849, 1998.
- O'KADE M, WILES PG, WALES JK. Fluoxetine in the treatment of obese type 2 diabetic patients. **Diabet Med** 11(1): 105-10, 1994.
- OKADA M, SHIBUYA M, YAMAMOTO E, MURAKAMI Y. Effect of diabetes on vitamin B6 requirement in experimental animals. **Diabetes Obes Metab** 1(4): 221-225, 1999.
- OKADA Y. Localization and function of GABA in pancreas islets. In: ERDÖ SL & BOWERY NG eds. **GABAergic mechanisms in the mammalian periphery**. New York: Raven Press, 1986. p. 223-240.
- OTHANI N, OHTA M, SUGANO T. Microdialysis study of modification of hypothalamic neurotransmitters in streptozotocin-diabetic rats. **J Neurochem** 69: 1622-1628, 1997.
- OVERSTREET DH. The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev** 17(1):51-68, 1993.
- PARDRIDGE WM, TRIGUERO D, FARREL CR. Downregulation of blood-brain barrier glucose transporter mRNA in experimental diabetes. **Diabetes** 39: 1040-1044, 1990.
- PAREDES RG & AGMO A. GABA and behavior: the role of receptor subtypes. **Neurosci Biobehav Rev** 16(2): 145-170, 1992.

- PARENT MB, MASTER S, KASHLUB S, BAKER GB. Effects of antidepressant/antipanic drug phenelzine and its putative metabolite phenylethyldrazine on extracellular γ -aminobutyric acid levels in the striatum. **Biochem Pharmacol** 63: 57-64, 2002.
- PARMIGIANI S, PALANZA P, RODGERS J, FERRARI PF. Selection, evolution of behaviour and animal models in behavioral neuroscience. **Neurosci Biobehav Rev** 23: 957-970, 1999.
- PAXINOS G, WATSON C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, Sydney, Academic, 1986.
- PÉNICAUD L, LELOUP C, LORSIGNOL A, ALQUIER T, GUILLAOD E. Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care** 5: 1-5, 2002.
- PETTY F & SHERMAN AD. GABAergic modulation of learned helplessness. **Pharmacol Biochem Behav** 15(4): 567-570, 1981.
- PETTY F & SHERMAN AD. Plasma GABA levels in psychiatric illness. **J Affect Disord** 6(2): 131-138, 1984.
- PETTY F. GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. **J Affect Disord** 34: 275-281, 1995.
- POLLAK PT, SOM D MUKHERJEE, FRASER AD. Sertraline-Induced Hypoglycemia. **Annals Pharmacoth** 35 (11): 1371–1374, 2001.
- POPOVIĆ M, BIESSELS G, ISAACSON RL, GISPEN WH. Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task. **Behav Brain Res** 122: 201-207, 2001.
- PORSOLT RD, LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new model sensitive to antidepressant treatment. **Nature** 266: 730-732, 1977.
- POST RM, WEISS SR, CHUANG DM. Mechanisms of action of anticonvulsant in affective disorders: comparisons with lithium. **J Clin Psychopharmacol** 12(1): 23S-35S, 1992.
- POTTER WZ, RUDORFER MV, MANJI H. The pharmacologic treatment of depression. **N Engl J Med** 325: 633-642, 1991.

- POTTER WZ, ZAHARKO DS, BECK LV. Possible role of hydrazine group in hypoglycemia associated with the use of certain monoamine-oxidase inhibitors (MAOIs). **Diabetes** 18: 538-41, 1969.
- RAMAKRISHNAN R & NAMASINAVAM A. Norepinephrine and epinephrine levels in the brain of alloxan diabetic rats. **Neurosci Lett** 17; 186(2-3): 200-202, 1995.
- RASNOW B, ASSAD C, HARTMANN MJ, BOWER JM. Applications of multimedia computers and video mixing to neuroethology. **J Neurosci Met** 76: 83–91, 1997.
- REAGAN LP, MAGARINOS AM, LUCAS LR, BUEREN AV, MCCALL AL, MCEWEN BS, CHARRON MJ. Regulation of GLUT3 glucose transporter in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. **Am J Physiol** 76: E879-E886, 1999.
- ROUER E, LEMOINE A, CRESTEIL T, ROUET P, LEROUX JP. Effects of genetic or chemically induced diabetes on imipramine metabolism. Respective involvement of flavin monooxygenase and cytochrome P-450-dependent monooxygenases. **Drug Metab Dispos** 15(4): 524-528, 1987.
- SACHS G, SPIESS K, MOSER G. Glycosylated hemoglobin and diabetes self-monitoring (compliance) in depressed and non-depressed type I diabetes patients. **Psychot Psychos Med Psychol** 41: 306-312, 1991.
- SANACORA G, MASON GF, ROTHMAN DL, KRYSTAL JH. Increased occipital cortex GABA concentration in depressed patients after therapy with selective serotonin reuptake inhibitors. **Am J Psychiatry** 159: 663-665, 2002.
- SHERMAN AD & PETTY F. Neurochemical basis of the action of antidepressants on learned helplessness. **Behav Neural Biol** 30(2): 119-134, 1980.
- SHIAH I-S & YATHAM LN. GABA function in mood disorders: an update and critical review. **Life Sci** 63(15): 1289-1303, 1998.

SHNEEDL WJ, FERBER S, HOHNSON JH, NEWGARD CB. STZ transport and cytotoxicity.

Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes** 43: 1326-1333, 1994.

SMITH ML, VON HANWEHR R, SIESJÖ BK. Changes in extra- and intracellular pH in the

brain during and following ischemia in hyperglycemic and in moderately hypoglycemic rats. **J**

Cereb Blood Flow Metab 6: 574-583, 1986.

SMITH WT, LONDBORG PD, GLAUDIN V, PAINTER JR. Is extended clonazepam cotherapy

of fluoxetine effective for outpatients with major depression? **J Affect Disord** 70: 251-259,

2002.

SOGHOMONIAN JJ & CHESSELET MF. GABA in the basal ganglia. In: MARTIN DL &

OLSEN RW. **GABA in the nervous system: the view at fifty years**. Philadelphia: Lippincott

Williams & Wilkins; 2000, p. 265-292.

SUMIYOSHI T, ICHIKAWA J, MELTZER HY. The effect of streptozotocin-induced diabetes on

dopamine₂, serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in the rat brain.

Neuropsychopharmacology. 16(3): 183-90, 1997.

SUZDAK PD & GIANUTSOS G. GABAergic effects of reserpine following chronic treatment.

Psychopharmacology 87(2): 157-60, 1985.

TÉLLEZ-ZENTERO JF & CARDIEL MH. Risk factors associated with depression in patients

with type 2 diabetes mellitus. **Arch Med Res** 33: 53-60, 2002.

TESFAMARIAM B, BROWN ML, DEYKIN D, COHEN RA. Elevated glucose promotes

generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. **J Clin Invest**

85: 929-932, 1990.

TRUE BL, PERRY PJ, BURNS EA. Profound hypoglycemia with the addition of a tricyclic

antidepressant to maintenance sulfonylurea therapy. **Am J Psychiatry** 144: 1220-1221, 1987.

VANNUCCI SJ, KOEHLER-STEC ME, LI K, REYNOLDS HR, CLARCK R, SIMPSON IA.

GLUT-4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. **Brain Res** 797: 1-11, 1998

WEISS JM, CIERPIAL MA, WEST CH. Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression. **Pharmacol Biochem Behav** 61(1): 49-66, 1998.

WEST AP. Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. **Prog Neuro-Psichopharmacol Biol Psychiat** 14: 863-877, 1990.

WIELOCH T, HARRIS RJ, SYMON L, SIESJÖ BK. Influence of severe hypoglycemia on brain extracellular calcium and potassium activities, energy, and phospholipid metabolism. **J Neurochem** 43: 160-168, 1984.

WILLNER P. Animal models as simulations of depression. **TIPS** 12: 131-136, 1991.

WILSON JD, FOSTER DW, KRONENBER HM, LARSEN PR. **Williams Textbook of endocrinology**. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1998, p. 1018-1080.

WONG FS, JANEWAY CA. Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models. **Curr Opin Immunobiol** 11: 643-647, 1999.

WREDLING RAM, THEORELL PGT, ROLL HM, LINS PES & ADAMSON UKC. Psychosocial state of patients with IDDM prone to recurrent episodes of severe hypoglycemia. **Diabetes Care** 15: 518-521, 1992.

WULF DRÖGE. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol Rev** 82: 47-95, 2002.