

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

**O estresse oxidativo e a depressão no Diabetes em modelo animal:  
o efeito do clonazepam**

**ALEXSANDRO DA SILVA HAESER**

**PORTO ALEGRE, 2006**

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

**O estresse oxidativo e a depressão no Diabetes em modelo animal:  
o efeito do clonazepam**

Dissertação apresentada por **Alexsandro da Silva Haeser** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr. Carmen Regla Vargas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de mestrado acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17.08.2006 pela banca examinadora constituída por:

Profa . Dr. Amélia T. Henriques  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Cláudia Rhoden  
Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Profa. Dr. Vera Maria Steffen  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

H136e Haeser, Alexsandro da Silva

O estresse oxidativo e a depressão no diabetes em modelo animal : o efeito do clonazepam / Alexsandro da Silva Haeser - Porto Alegre : UFRGS, 2006. - xviii , 77p.: il., fig., tab.

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

1. Estresse oxidativo. 2. Clonazepam. 3. Depressão. 4. Diabete. 5. Modelos comportamentais I. Vargas, Carmen Regla. II. Título.

CDU: 616-074.12:615.214

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

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, no Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Análises Bioquímicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aos quais expresse meus agradecimentos imensuráveis.



**“A dificuldade induz ao desafio,  
a dedicação leva ao caminho da vitória.”**

**Aos meus pais,**

**dedico...**

## **AGRADECIMENTOS**

A Professora Dr<sup>a</sup> Carmen Regla Vargas, pela orientação, incentivo, respeito e confiança, que resultaram em um crescimento profissional, mas acima de tudo, pessoal.

A Professora Dra. Helena T. Barros, do Departamento de Farmacologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, pelo incentivo e orientação principalmente na parte comportamental dos experimentos realizados neste trabalho.

A Dra. Rosane Gomez do Departamento de Farmacologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação a pesquisa.

A todos os bolsistas e funcionários, colegas e amigos envolvidos direta ou indiretamente na realização dos experimentos, prestando apoio necessário para o bom andamento deste.

A minha esposa, Jaqueline, pelo apoio, dedicação e compreensão nos momentos mais difíceis desta jornada.





## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	XI
ABREVIATURAS .....	XIII
RESUMO .....	XVI
ABSTRACT .....	XVIII
<b>1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....</b>	<b>2</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
3.1 ESTRESSE OXIDATIVO .....	11
3.2 O DIABETES .....	13
3.3 DEPRESSÃO .....	16
3.3.1 CONCEITO.....	16
3.3.2 NEUROQUÍMICA .....	17
3.3.2.1 HIPÓTESE DOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS .....	18
3.3.2.2 HIPÓTESE DA DESSENSIBILIZAÇÃO DOS RECEPTORES .....	19
3.3.3 DEPRESSÃO E DIABETES.....	20
3.4 CLONAZEPAM .....	22
3.4.1 FARMACOCINÉTICA .....	22
3.4.2 FARMACODINÂMICA .....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 ANIMAIS E REAGENTES.....	27
4.2 ESTREPTOZOTOCINA.....	27
4.3 CLONAZEPAM .....	28

4.4 INDUÇÃO DO DIABETE.....	28
4.5 ENSAIO DE NATAÇÃO FORÇADA.....	28
4.6 OBTENÇÃO DE TECIDOS.....	29
4.7 DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	30
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE (CAT).....	30
4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	30
4.10 DETERMINAÇÃO DA REATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TAR).....	31
4.11 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE.....	31
4.12 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	31
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
5.1 AVALIAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	35
5.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	35
5.2.1 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PLASMA E ERITRÓCITOS.....	35
5.2.2 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL..	39
5.2.2.1 HIPOCAMPO.....	39
5.2.2.2 CÓRTEX PRÉ-FRONTAL.....	40
5.2.2.3 ESTRIADO.....	42
5.3 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	43
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
6.1 ESTRESSE OXIDATIVO EM PLASMA E ERITRÓCITOS.....	47
6.2 ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	49
6.3 DEPRESSÃO.....	54
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação tridimensional da molécula do clonazepam.....	22
<b>Figura 2.</b> Medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em plasma de ratos Wistar.....	36
<b>Figura 3.</b> Medida da reatividade antioxidante total em plasma de ratos Wistar...	37
<b>Figura 4.</b> Atividade da catalase em eritrócitos de ratos Wistar.....	38
<b>Figura 5.</b> Atividade da superóxido dismutase em eritrócitos de ratos Wistar.....	38
<b>Figura 6.</b> Medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em hipocampo de ratos Wistar.....	39
<b>Figura 7.</b> Medida da reatividade antioxidante total em hipocampo de ratos Wistar.....	40
<b>Figura 8.</b> Medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em córtex de ratos Wistar.....	41
<b>Figura 9.</b> Medida da reatividade antioxidante total em córtex de ratos Wistar.....	41
<b>Figura 10.</b> Medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em estriado de ratos Wistar.....	42
<b>Figura 11.</b> Medida da reatividade antioxidante total em estriado de ratos Wistar.....	43
<b>Figura 12.</b> Reação da Superóxido Dismutase.....	49
<b>Figura 13.</b> Reação da Catalase.....	49



## ABREVIATURAS

ABAP – 2,2 azo-bis-(2-amidinopropano)

ACh – acetilcolina

CAT – catalase

DA – dopamina

DAC – doença arterial coronariana

DM – diabetes *mellitus*

FDA – “Food and Drug Administration”

GAD – ácido glutâmico descarboxilase.

GMPc – guanidina monofosfato cíclico.

GPx – glutationa peroxidase

LCR – líquido céfalo raquidiano

MAO – monoamina oxidase

NE – norepinefrina

SOD – superóxido dismutase

SPSS – “Statistical Package for the Social Sciences”

STZ - estreptozotocina

TAR – reatividade antioxidante total

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

5 – HT - serotonina





## RESUMO

**Objetivo:** o presente estudo teve como objetivo avaliar o estresse oxidativo em animais diabéticos e não diabéticos submetidos ao modelo experimental de depressão, o nado forçado, e os efeitos do clonazepam, um modulador positivo GABA<sub>A</sub>, correlacionado os efeitos comportamentais com as alterações bioquímicas. **Metodologia:** ratos Wistar machos com 30 dias de idade, foram induzidos ao Diabetes por estreptozotocina e submetidos ao teste de natação forçada 21 dias após a indução. Após uma ambientação, o clonazepam foi administrado na dose 0,5 mg/Kg, bem como solução salina nos controles, 24, 5 e 1 hora antes do teste. A frequência e a duração dos comportamentos neste teste foi registrada em vídeo cassete para avaliação etológica dos comportamentos por pesquisador treinado. Trinta minutos após o teste, os animais foram sacrificados por decapitação e foram separados o plasma e os eritrócitos, bem como os tecidos cerebrais córtex pré-frontal, estriado e hipocampo. Foram avaliadas as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a reatividade antioxidante total (TAR), bem como a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). **Resultados e discussão:** os resultados mostraram um aumento significativo do TBARS e uma diminuição significativa do TAR no plasma de animais diabéticos, efeitos estes revertidos pelo clonazepam. Não houve alteração na atividade da SOD e da CAT em eritrócitos. No hipocampo observou-se um aumento significativo no TBARS nos diabéticos, também revertido pelo clonazepam, sendo que nenhuma alteração foi verificada na medida do TAR. O aumento significativo do TBARS no córtex de ratos diabéticos, um indicador de lipoperoxidação, e a diminuição significativa do TAR no córtex dos animais diabéticos, um indicador da capacidade de modulação da ação dos radicais livres produzidos, não foram revertidos pela administração do clonazepam neste tecido cerebral. Ainda, não houve alteração do TBARS e do TAR no estriado dos grupos testados. O clonazepam foi capaz de reverter a

imobilidade dos animais diabéticos submetidos ao teste de natação forçada. Não foi verificada correlação significativa entre a imobilidade e as medidas de TBARS e TAR. **Conclusão:** considerando a conhecida ação ansiolítica e antidepressiva do clonazepam, sugere-se que ele possa ser uma alternativa terapêutica na depressão em pacientes diabéticos, uma vez que ele não altera a glicemia e, pelos resultados aqui apresentados, teria uma ação protetora contra os radicais livres, os quais sabidamente contribuem para o desenvolvimento das complicações secundárias de *Diabete Mellitus*.

**Palavras-chave:** Diabete, Clonazepam, Depressão, Estresse Oxidativo, Modelos Comportamentais.

## ABSTRACT

### **Title: Oxidative stress and depression in animal model of diabetes: the clonazepan effect**

**Objective:** the present study had as objective to evaluate the oxidative stress from diabetic animals submitted to an experimental model of depression (forced swimming) and the effects of clonazepan, a GABA agonist, correlating behavioral with biochemical effects. **Methodology:** male Wistar rats, 30 days years old, were induced to diabetes with streptozotocin and submitted to forced swimming test 21 days after induction. After to be accustomed with the environment, clonazepan was administered to rats in a dose of 0,5 mg/kg, as well as saline solution to control rats, 24, 5 and 1 hours before test. The frequency and duration of behaviour in the test were filmed for ethologic evaluation by a trained pearson. Thirty minutes after test, the animals were sacrificed by decapitation, and plasma and erythrocytes were separated, as well as hippocamp, cortex and striatum. Reactive species of tiobarbituric acid (TBARS) and total antioxidant reactivity (TAR), as well as antioxidant enzyme activities catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were evaluated. **Results and discussion:** results showed a significant increase of TBARS and a significant decrease of TAR in plasma from diabetic animals, which was altered by clonazepan. There were no effect of CAT and SOD activities in erythrocytes from tested animals. The results observed in hippocamp showed a significative increase of TBARS from diabetics rats, inverted by clonazepan, and no one alteration was verified in TAR. The significant increase of TBARS in cortex from diabetic rats, an indicator of lipoperoxidation, and the significant decrease of TAR in cortex from diabetic rats, an indicator of modulation

capability against free radicals, were not altered by clonazepan administration. Besides, there were no alteration of TBARS and TAR in striatum from tested animals. Clonazepan was capable to alter the immobility from diabetic animals submitted to forced swimming. There was no significative correlation between immobility and TBARS neither TAR measurements. **Conclusion:** considering the ansiolitic and antidepressive action of clonazepan, it's suggested that it could be an alternative therapeutic for depression to diabetic patients, once clonazepan do not alter glycemia and, by the results here presented, could give a protection against free radicals, which are known to contribute to the development of complications in *Mellitus* Diabetes.

**Key-words:** Diabetes, Clonazepan, Depression, Oxidative Stress, Behavioral Models.



## **INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA**

---

---



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

O estresse oxidativo provoca alterações, por diversos mecanismos, na fisiologia da célula, podendo acarretar morte celular. Este fenômeno parece desempenhar papel importante no avanço de sintomas de diversas doenças crônicas tais como: Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer e Diabetes *Mellitus*, entre outras.(IMAEDA *et al.* 2001, CERIELLO *et al.* 2000).

O Diabetes *Mellitus* (DM) aparece como uma das principais doenças da atualidade. Essa doença progressiva vêm sendo estudada desde o início do século passado e muito já se avançou na compreensão das alterações bioquímicas provocadas pela hiperglicemia, tanto em nível de Sistema Nervoso Central (SNC) quanto nos demais sistemas orgânicos.

A evolução clínica de portadores do DM inclui uma série de complicações secundárias a hiperglicemia. Dentre estas, podemos destacar a cetoacidose ou o coma hiperosmolar, nos quais o paciente corre risco de vida, devido a hiperglicemia aguda (HENRY,2002). Com a progressão da doença podem ocorrer complicações específicas, tais como, a retinopatia, insuficiência renal, neuropatia periférica e aterosclerose, todas causadas pela exposição crônica destes órgãos ou tecidos a elevados níveis de glicose (HENRY, 2002).

Além das complicações descritas anteriormente, existem danos ao Sistema Nervoso Central causados pela exposição crônica do mesmo a estas elevadas taxas de glicose. Estas alterações incluem isquemia, alterações cognitivas e depressão, caracterizando a encefalopatia diabética (BIESSELS *et al.* 2002). Este quadro pode ser mimetizado em animais experimentais. Para tanto, utiliza-se, por



exemplo, a administração intraperitoneal de estreptozotocina, um agente quimioterápico da família dos alquilantes.

A incidência de depressão em diabéticos pode estar associado ao quadro de encefalopatia diabética, uma vez que a incidência de depressão nesses indivíduos é de 39%, cerca de 2 a 3 vezes maior que em pacientes não diabéticos (BIESSELS *et al.* 2002).

O clonazepam, um agente benzodiazepínico similar estruturalmente ao nitrazepam e ao diazepam, é utilizado desde 1976 nos Estados Unidos como antiepilético (MORISHITA, 2004). Devido a suas propriedades farmacológicas de agonista GABAérgico, somada a sua elevada meia-vida, grande potência, e menor incidência de efeitos colaterais em relação a outros benzodiazepínicos, o que facilita a interrupção do tratamento de maneira mais fácil (NARDI & PERNA, 2006) vem sendo empregado em diversos distúrbios psiquiátricos, dentre os quais destacamos a depressão. De fato, uma dose diária de 3 mg/dia de clonazepam pode ser utilizada no tratamento de depressões resistentes aos inibidores da recaptação da serotonina (MORISHITA, 2004).

Tendo em vista que: 1) o estresse oxidativo parece ser um fator importante na fisiopatogenia do DM, assim como no desenvolvimento das complicações diabéticas como, por exemplo, a encefalopatia diabética; 2) a encefalopatia diabética envolve depressão, isquemia cerebral e alterações cognitivas; 3) o estresse oxidativo tem sido postulado como um fator importante na progressão da aterosclerose, uma das causas da encefalopatia diabética; 4) o comportamento tipo depressivo é revertido por um benzodiazepínico, o clonazepam; 5) os benzodiazepínicos e outros agentes GABA parecem diminuir estresse oxidativo; 6) o papel das espécies reativas de oxigênio e o balanço entre o estresse oxidativo e os antioxidantes em indivíduos diabéticos com alterações comportamentais ou hiperlipêmicos ainda é desconhecido; esta dissertação propõe avaliar o efeito do clonazepam sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo em ratos submetidos ao diabetes e testados em um modelo animal de depressão, o teste da natação forçada.

## **OBJETIVOS**

---



## **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho de pesquisa foi avaliar o estresse oxidativo em ratos diabéticos sob depressão, verificando o efeito do clonazepam nestes animais.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1** Avaliar o estresse oxidativo em ratos diabéticos submetidos ao modelo de depressão tratados ou não com clonazepam através de diferentes parâmetros, como:

- a) Determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em plasma e em diferentes regiões cerebrais (córtex, hipocampo e estriado);
- b) Medida da reatividade antioxidante total (TAR) em plasma e em diferentes regiões cerebrais (córtex, hipocampo e estriado);
- c) Determinação da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) em eritrócitos;
- d) Determinação da atividade da enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD) em eritrócitos;

**2.2.2** Avaliar o comportamento de ratos diabéticos submetidos ao modelo de depressão, o teste da natação forçada, tratados ou não com clonazepam;

**2.2.3** Correlacionar os parâmetros de estresse oxidativo com o comportamento dos animais submetidos ao modelo de depressão tratados ou não com o clonazepam.



## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

---



### 3.1 Estresse Oxidativo

A descoberta de radicais livres em materiais biológicos ocorreu na década de 50 com COMMONER *et al.* (1954). Desde então, vem sendo estudada sua importância na biologia da célula. Radical livre é definido como um átomo ou uma molécula que contém um ou mais elétrons não pareados. Eles alteram a reatividade química de um átomo ou de uma molécula, normalmente tornando-os mais reativos.

Várias são as fontes geradoras de radicais livres. Existem as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). A radiação eletromagnética de baixo comprimento de onda pode gerar o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ). Outras espécies de radicais livres são geradas endogenamente, como, por exemplo, o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) o qual é formado pela adição de um elétron à molécula de oxigênio. Assim, as catecolaminas, os tetrahidrofolatos e alguns constituintes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial são produtoras “naturais” de íons superóxidos. Fagócitos ativados (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) geram grandes quantidades de superóxidos. Durante processos crônicos inflamatórios, este mecanismo normal de proteção pode se tornar danoso.

Outro radical livre fisiológico é o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), o qual é produzido pelo endotélio vascular, por fagócitos e no cérebro pela enzima óxido nítrico sintetase. O óxido nítrico tem muitas funções fisiológicas como, por exemplo, relaxamento do tônus endotelial levando a vasodilação (IGNARRO & KADOWITZ, 1985) e inibição da adesão plaquetária (RADOWSKY *et al.*, 1987). Além disso, afeta uma série de processos bioquímicos dependentes do aumento de guanidina monofosfato cíclico ( $\text{GMP}_c$ ) através da ativação da guanilato ciclase. O excesso de sua produção, porém, pode ser tóxico. Os superóxidos e o óxido nítrico não são quimicamente muito reativos e sob certas circunstâncias podem gerar produtos tóxicos (HALLIWELL, 1994).



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

As ações biológicas dos radicais livres são variadas: o radical hidroxila ataca o ácido desoxirribonucléico (DNA) produzindo mutações, oxida lipídeos de membrana, danifica proteínas de membrana, e produz compostos citotóxicos como os aldeídos. O oxigênio *singlet* e as reações associadas causam reações de fotossensibilização e também peroxidação de lipídeos.

As defesas antioxidantes existem para proteger o organismo contra a ação dos radicais livres. As defesas antioxidantes intracelulares incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT), bem como a ferritina. Entre as defesas antioxidantes extracelulares encontra-se a proteína transportadora de ferro plasmático transferrina, a ceruloplasmina, a hemopexina, a haptoglobina e a albumina, entre outras. O alfa-tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) estão localizados tanto intra como extracelularmente, constituindo-se em agentes antioxidantes importantes para o organismo.

Quando as defesas antioxidantes não são completamente eficientes, o aumento na concentração intracelular de radicais livres potencialmente acarretará dano tecidual, situação esta definida como estresse oxidativo. O estresse oxidativo severo pode causar morte celular.

Os radicais livres parecem estar envolvidos em um grande número de enfermidades do ser humano. Evidências têm se acumulado mostrando que o dano gerado pelos radicais livres é importante nas doenças neurodegenerativas,

nas doenças crônicas-inflamatórias, nas doenças vasculares e no câncer (HALLIWELL B., 1994).

O cérebro tem níveis relativamente baixos de enzimas antioxidantes e um conteúdo lipídico relativamente alto, com grandes quantidades de ácidos graxos insaturados e catecolaminas, os quais são substratos suscetíveis ao ataque pelas espécies reativas de oxigênio. Várias doenças neurológicas nas quais parece haver envolvimento de radicais livres em sua fisiopatologia estão descritas: doença de Parkinson, doença de Alzheimer, isquemia, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doenças inflamatórias, epilepsia, fenilcetonúria e adrenoleucodistrofia, entre outras (REZNICK.AZ AND PACKER L, 1993; PRZEDBORSKI S. *et al*, 1996; BEN-MENACHEM E *et al*, 2000; SIRTORI, L *et al*. 2005; DEON, M. *et al*. 2006).

### **3.2 O Diabetes**

*Diabete Mellitus (DM)* corresponde um grupo de distúrbios do metabolismo glicídico, no qual a glicose é subutilizada, produzindo hiperglicemia. Alguns pacientes podem desenvolver episódios hiperglicêmicos agudos, com risco de vida, como cetoacidose ou coma hiperosmolar. A progressão da doença pode acarretar complicações crônicas como retinopatia, que leva a cegueira, insuficiência renal, neuropatia e aterosclerose. Esta doença metabólica pode ser classificada em: diabete gestacional, diabete tipo 1 e a diabete tipo 2, sendo esta última mais freqüente (SACKS, 1998).

Clinicamente, o Diabete caracteriza-se pela eliminação de grande volume de urina, sede excessiva, fraqueza muscular e, em casos mais graves, cetoacidose e coma seguido de morte (SCHIMMER & GEORGE, 1991).

O *Diabetes Mellitus* tipo 1 caracteriza-se pela manifestação precoce, normalmente antes dos 30 anos de idade, em indivíduos magros e dependentes

de insulina. Frequentemente o início dos sintomas ocorre de maneira súbita, com indivíduo apresentando cetonúria com propensão a cetose. A fisiopatologia inclui inflamação das ilhotas de Langerhans com destruição parcial de células beta pancreáticas e conseqüente deficiência na produção de insulina. Anticorpos anti-insulina, anticorpos anti-ilhotas e anti-GAD (ácido glutâmico descarboxilase) estão presentes no soro. Devido ao uso crônico de insulina, os pacientes estão mais propensos a episódios hipoglicêmicos agudos que podem levar a morte por choque (ROZMAN, 1999).

O Diabetes Mellitus tipo 2 compreende aproximadamente 90% dos casos de diabetes. Os pacientes apresentam sintomas mínimos, não são propensos à cetose e raramente utilizam insulina. Os níveis de insulina podem ser normais, diminuídos ou aumentados, e a maioria das pessoas acometidas com essa forma de diabetes tem a ação da insulina prejudicada. Os fatores de risco incluem obesidade, sedentarismo, história familiar, idade avançada (após 40 anos, podendo ocorrer em indivíduos jovens), etnia, história de diabetes gestacional (mães de recém-nascido > 4Kg), doença cardiovascular antes dos 50 anos, hipertensão e dislipidemia. Para detectar o Diabetes Mellitus tipo 2 é recomendado a triagem em indivíduos que apresentem um ou mais fatores de risco (HENRY, 2001). Muitos pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 podem ser eficientemente tratados através de dieta, de exercícios físicos e/ou de administração de hipoglicemiante oral, porém outros necessitam de terapia insulínica (HARDMAN, 1996).

O estresse oxidativo parece ser um importante fator no desenvolvimento de complicações no diabetes (IMAEDA *et al.* 2001). CERIELLO *et al.* (2000), demonstraram uma falha nos mecanismos de defesa antioxidante em fibroblastos de pele de pacientes diabéticos tipo 1 com nefropatia. Existe uma susceptibilidade individual à nefropatia diabética e acredita-se que o estresse oxidativo tenha um importante papel na patogenia desta complicação.

A hiperglicemia, marcador através do qual se diagnostica tanto Diabetes tipo 1 quanto Tipo 2, promove aumento na produção de espécies reativas de oxigênio por diversas rotas (BAYNES, JW, 1991; NISHIKAWA *et al.*, 2000). Demonstrou-se, em cultura de células endoteliais de aorta bovina, que sua exposição a

elevadas concentrações de glicose aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio pelo complexo mitocondrial II da cadeia de transporte de elétrons (NISHIGAWA *et al.*, 2000). Além disso, ocorrem efeitos bioquímicos secundários que influenciam na patogenia da doença, como, por exemplo, a produção do ânion superóxido pela auto-oxidação da glicose. Ainda, o aumento de proteínas glicadas no plasma dos pacientes está relacionado com o estresse oxidativo (BAYNES, 1991; NISHIGAWA *et al.* 2000), uma vez que essas proteínas interagem com receptores celulares, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio, o que depleta a glutathiona intracelular. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos mecanismos descritos acima, contribui para uma série de complicações secundárias ao diabetes, tais como a aterosclerose e a peroxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) nas células endoteliais.

O ácido ascórbico (vitamina C) e o alfa-tocoferol (vitamina E) são reconhecidos antioxidantes e verificou-se que o tratamento com estas substâncias, em doses farmacológicas, diminuiu a excreção de albumina urinária em pacientes diabéticos tipo 2 portadores de micro/macroalbuminúria (GAEDE *et al.*, 2001).

O Diabetes dos tipos 1 e 2 são estados hiperglicêmicos e hipoinsulinêmico crônico que podem modificar funções dos SNC (BELLUSH *et al.*, 1991; LUSTAMN *et al.*, 1992). O impacto do Diabetes no SNC tem sido estudado mais intensamente na última década (MCCALL, 1992) e já se descreve a encefalopatia diabética (BIESSELS *et al.*, 2002). Além das bem conhecidas conseqüências, como o aumento do risco de acidente vascular pela aterosclerose já detalhada acima, o Diabetes é associado a déficits cognitivos e alterações estruturais e neurofisiológicas no cérebro (BIESSELS *et al.*, 2002). Manifestações psiquiátricas parecem acompanhar esta encefalopatia, uma vez que a prevalência da depressão é de 39% nos diabéticos, o que é 2 a 3 vezes mais elevado que na população não diabética (GAVARD *et al.*, 1997; LUSTMAN *et al.*, 1992; TÉLLEZ-ZENTENO & CARDIEL, 2002).

A encefalopatia diabética pode ser replicada em animais experimentais. A relação entre hiperglicemia e dano neuronal no córtex cerebral é demonstrado em ratos diabéticos por estreptozotocina e o tratamento com insulina previne o dano

neuronal (GUYOT *et al.*, 2001). Também tem sido descrito que ratos e camundongos diabéticos apresentam comportamentos tipo depressivo no teste da natação forçada (GOMEZ e BARROS, 2000; HILAKIVI-CLARCK *et al.*, 1990). O tratamento com insulina previne a variação comportamental dos ratos diabéticos (HILAKIVI-CLARCK *et al.*, 1990), assim como o clonazepam, um modulador positivo do receptor GABA<sub>A</sub> (GOMEZ AND BARROS, 2000).

Em estudos recentes observou-se que ratos diabéticos tem níveis diminuídos de GABA durante o teste da natação forçada, enquanto o clonazepam aumenta a concentração de glicose no líquido extracelular de animais diabéticos (GOMEZ e BARROS, 2003). Como o clonazepam tem potencial de diminuir reações de lipoperoxidação de cérebros de ratos com hepatopatias (RHODEN *et al.*, 2000), postulamos que o clonazepam tenha o potencial de reduzir a lipoperoxidação no SNC de ratos diabéticos e que este efeito possa auxiliar na depressão associada ao diabetes.

### **3.3 Depressão**

#### **3.3.1 Conceito**

O termo *depressão*, na linguagem corrente, tem sido empregado para designar tanto um estado afetivo normal (a tristeza), quanto um sintoma, uma síndrome e uma (ou várias) doença(s).

Os sentimentos de *tristeza* e *alegria* colorem o fundo afetivo da vida psíquica normal. A tristeza constitui-se na resposta humana universal às situações de perda, derrota, desapontamento e outras adversidades. Cabe lembrar que essa resposta tem valor adaptativo, do ponto de vista evolucionário, uma vez que, através do retraimento, poupa energia e recursos para o futuro. Por outro lado, constitui-se em sinal de alerta, para os demais, de que a pessoa está precisando de companhia e ajuda. As reações de luto, que se estabelecem em resposta à perda de pessoas queridas, caracterizam-se pelo sentimento de profunda tristeza, exacerbação da atividade simpática e inquietude. As reações de

luto normal podem estender-se até por um ou dois anos, devendo ser diferenciadas dos quadros depressivos propriamente ditos. No luto normal a pessoa usualmente preserva certos interesses e reage positivamente ao ambiente, quando devidamente estimulada. Não se observa, no luto, a inibição psicomotora característica dos estados melancólicos (LAFER, *et al.* 2000). Enquanto *sintoma*, a depressão pode surgir nos mais variados quadros clínicos, entre os quais: transtorno de estresse pós-traumático, demência, esquizofrenia, alcoolismo, doenças clínicas, etc. Pode ainda ocorrer como resposta a situações estressantes, ou a circunstâncias sociais e econômicas adversas. Enquanto *síndrome*, a depressão inclui não apenas alterações do humor (tristeza, irritabilidade, falta da capacidade de sentir prazer, apatia), mas também uma gama de outros aspectos, incluindo alterações cognitivas, psicomotoras e vegetativas (sono, apetite). Finalmente, enquanto *doença*, a depressão tem sido classificada de várias formas, na dependência do período histórico, da preferência dos autores e do ponto de vista adotado. Entre os quadros mencionados na literatura atual encontram-se: transtorno depressivo maior, melancolia, distímia, depressão integrante do transtorno bipolar tipos I e II, depressão como parte da ciclotímia, entre outras (LAFER, B *et al.* 2000).

### **3.3.2 Neuroquímica**

Nos últimos 30 anos, a neuroquímica é a área que vem recebendo maior destaque nas pesquisas sobre a fisiopatologia da depressão. Isto teve início a partir do descobrimento do mecanismo de ação dos antidepressivos. Este mecanismo foi estudado inicialmente em relação às alterações agudas sobre os níveis sinápticos dos neurotransmissores na tentativa de estabelecer hipóteses sobre a fisiopatologia dos transtornos do humor. A partir da observação de que essas hipóteses eram muito limitadas na sua capacidade de explicar a fisiopatologia, foram propostas hipóteses mais complexas, focalizando as alterações em múltiplos sistemas de neurotransmissão e as adaptações celulares e moleculares aos medicamentos antidepressivos (GOODMAN, 2004).

Apresentaremos a seguir um resumo das hipóteses neuroquímicas para a depressão.

### **3.3.2.1 Hipótese dos Sistemas Monoaminérgicos**

Os sistemas monoaminérgicos se originam em pequenos núcleos no tronco cerebral e mesencéfalo e projetam-se difusamente pelo córtex e sistema límbico. Esses sistemas são compostos por neurônios que contêm norepinefrina (NE), serotonina (5-HT) e dopamina (DA). Junto com a acetilcolina (ACh), eles exercem efeitos de modulação e integração sobre outras atividades corticais e subcorticais e estão envolvidos na regulação da atividade psicomotora, apetite, sono e, provavelmente, do humor (GOODMAN, 2004).

A observação dos efeitos antidepressivos dos inibidores da monoaminoxidase (MAO) e dos tricíclicos, a partir do final da década de 50, permitiu o surgimento de especulações sobre os substratos cerebrais nos transtornos afetivos. Pesquisas nas áreas básicas sugeriam que os inibidores da MAO aumentavam as concentrações cerebrais de noradrenalina e serotonina. Os antidepressivos tricíclicos, por sua vez, inibiam a recaptura sináptica das monoaminas, principalmente de NE, mas também de 5-HT, aumentando agudamente os níveis sinápticos. Essas e outras observações culminaram em 1965 com a hipótese catecolaminérgica, que propunha a existência de uma depleção de NE no nível sináptico como fator patogenético nos transtornos depressivos (SCHILDKRAUT, 1965). A hipótese envolvendo a participação da serotonina foi subsequente proposta apenas em 1988 (COPPEN, 1988).

Pode-se dizer que a partir da formulação das hipóteses noradrenérgica e serotoninérgica, a atividade desses sistemas vem sendo exaustivamente pesquisada. Estudos básicos e clínicos procuraram confirmar a hipótese monoaminérgica na fisiopatologia da depressão e descreveram anormalidades nos níveis desses metabólitos no sangue, urina e líquido céfalo-raquidiano (LCR) (POTTER, 1993).

A partir da década de 70 as pesquisas focalizaram mais a complexa interação entre os neurotransmissores. Daí o advento da hipótese permissiva da serotonina, que postulava um efeito modulador do sistema serotoninérgico sobre NE e DA. A hipótese permissiva representou um avanço sobre hipóteses anteriores que enfatizavam a falta ou excesso de um só neurotransmissor e permitiu a integração do conhecimento de que depressão e mania não são estados totalmente opostos, mas que compartilham alguns sintomas e achados biológicos (GRAEFF, 1990).

Os antidepressivos aumentam os níveis de NE e 5-HT algumas horas após administrados, mas demoram de 2 a 3 semanas para exercer o efeito terapêutico. Foi necessário o estabelecimento de hipóteses que explicassem esta latência na resposta e que levassem em conta os efeitos adaptativos crônicos dos receptores na administração de antidepressivos (GOODMAN, 2004).

### **3.3.2.2 Hipótese da dessensibilização de receptores**

Alterações da função dos sistemas neurotransmissores podem ocorrer através da mudança na sensibilidade de receptores pré e pós-sinápticos, sem alteração da quantidade do próprio neurotransmissor. Essa observação permitiu que a hipótese de deficiência de neurotransmissores fosse modificada e, em seu lugar, proposta a hipótese de dessensibilização dos receptores. Tal hipótese propunha que o atraso no aparecimento do efeito terapêutico dos antidepressivos estava relacionado a alterações no número e sensibilidade dos receptores monoaminérgicos. Como esse efeito demora dias ou semanas para ocorrer, os investigadores propunham que a depressão podia ser explicada por uma supersensibilidade de receptores beta-adrenérgicos (HYMAN, 1993). As alterações presentes na sensibilidade e no número de receptores podem ser vistas meramente como marcadores de adaptações crônicas dos neurônios monoaminérgicos ao invés de representarem o mecanismo terapêutico (HYMAN, 1993). Não há dados convincentes de que a regulação de receptores adrenérgicos ou serotoninérgicos seja o único fator responsável pelos efeitos terapêuticos das drogas antidepressivas. A hipótese de dessensibilização tem



limitações e não deixa claro se a super ou subsensibilização de receptores é apenas um epifenômeno ou é um passo fundamental na ação antidepressiva.

O desafio das pesquisas contemporâneas sobre o mecanismo antidepressivo das medicações é determinar exatamente o que produz a resposta terapêutica. Os principais mecanismos (que estão sendo estudados) incluem a regulação de enzimas (proteínas quinases) e da expressão gênica que contribuem para mudanças na eficácia sináptica (SHENG, 1990). POST *et al.* (1992) propõe que um melhor entendimento desses mecanismos pode inclusive permitir a integração de fatores ambientais e biológicos na fisiopatologia da recorrência dos episódios de depressão ao longo do tempo.

### **3.3.3 Depressão e Diabetes**

O DM é uma doença crônica que afeta aproximadamente 7,6% da população brasileira (MALERBI e FRANCO, 1992). A hiperglicemia persistente, característica da doença, atinge de forma significativa os indivíduos, exigindo alterações importantes em seus estilos de vida. Pacientes com diabetes necessitam modificar hábitos alimentares e aderir a esquemas terapêuticos restritivos, tais como aplicações regulares de insulina e monitorização glicêmica diária. Além disso, estes pacientes devem lidar com o fato de ter que conviver durante toda a vida com uma doença que é responsável por complicações clínicas que prejudicam a saúde do indivíduo. Todas essas variáveis repercutem no estado de humor dos pacientes diabéticos.

A incidência de depressão em pacientes com DM está em torno de 39%, o que é três vezes maior que na população não diabética (BIESSELS *et al.* 2002). A presença desta doença dificulta o bom controle glicêmico, e aumenta a incidência de complicações secundárias.

As complicações macrovasculares, principalmente a doença arterial coronariana (DAC), a doença vascular periférica e a disfunção erétil, parecem correlacionar-se positivamente com os sintomas depressivos (WINOCOUR *et al.*, 1990; VIDIELLA *et al.*, 1996; PEYROT *et al.*, 1999). A presença de DAC, mais

especificamente, esteve associada a uma maior gravidade de sintomas depressivos (LLOYD *et al.* 1992). Da mesma forma, GARY *et al.* (2000) mostraram que pacientes diabéticos com sintomas depressivos mais graves apresentaram níveis mais elevados de pressão arterial diastólica, colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides, além de valores mais baixos de HDL-colesterol. Em relação à disfunção erétil, a presença de queixas de impotência em homens já se mostrou relacionada à depressão (WINOCOUR *et al.* 1990; LUSTMAN *et al.* 1990). Esta relação ocorreu independentemente da presença de neuropatia, o que sugere uma maior relevância do comprometimento vascular ou dos sintomas depressivos no aparecimento da disfunção erétil (LUSTMAN *et al.* 1990). A ocorrência de queixas de disfunção sexual também em mulheres corrobora a importância dos sintomas depressivos em pacientes diabéticos com queixas de disfunção sexual (LEEDOM *et al.* 1991).

As complicações microvasculares do DM (retinopatia, nefropatia e neuropatia) também parecem ter correlação com sintomas depressivos. A retinopatia e a nefropatia foram as principais complicações relacionadas com os sintomas depressivos, possivelmente devido ao grande comprometimento funcional que ambas acarretam (ROY e ROY, 2001; MIYAOKA *et al.*, 1997). Uma meta-análise evidenciou que o aumento da prevalência dos sintomas depressivos encontrava-se associado ao número e à gravidade das complicações desta doença (DE GROOT *et al.*, 2001). Ainda, o estresse oxidativo pode estar envolvido no aparecimento de sintomas relacionados as complicações secundárias ao DM. Ocorre aumento de lipoperoxidação em eritrócitos e plasma de pacientes com DM (PASAOGLU *et al.*, 2004) e este aumento pode estar envolvido no aparecimento nas complicações vasculares do DM.

O papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da depressão também vêm sendo estudado. OZCAN *et al.* (2004) mostraram haver aumento da lipoperoxidação em plasma e eritrócitos de pacientes com depressão e a suplementação com vitamina E melhorou estes parâmetros, assim como os sintomas depressivos.

Baseado nos dados de literatura acima descritos, pode-se dizer que existe aumento de lipoperoxidação em plasma e eritrócitos, tanto em pacientes com

diabetes quanto em pacientes com depressão. Logo, estes efeitos poderiam estar potencializados em pacientes diabéticos e com depressão. Contudo, não existem estudos que comprovem haver este tipo de correlação, embora pareça haver.

### 3.4 Clonazepam

O clonazepam é um derivado 7-nitro-benzodiazepínico com fórmula química 5-(2-Clorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4benzodiazepino-2-ona. Ele foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1976, primariamente para o uso como medicamento antiepilético.

Atualmente é comercializado no Brasil em duas formas farmacêuticas: comprimidos de 2 miligramas e solução oral de concentração 2,5 miligramas por mililitro, com nome comercial de Rivotril® (Roche). Existe também um medicamento genérico CLONAZEPAM 2 mg, comprimido (Laboratório Apotex).

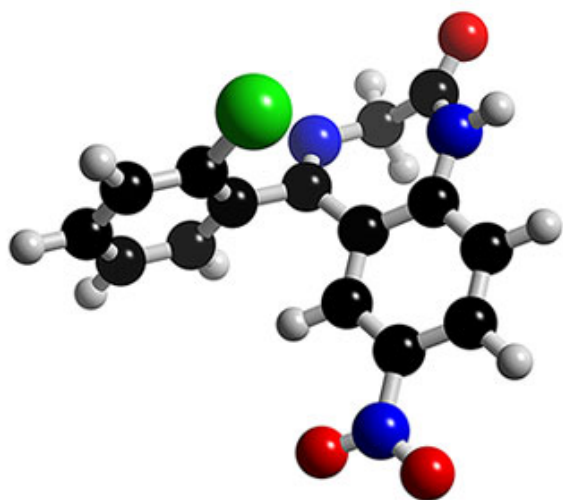


Figura 1. Representação tridimensional da molécula do clonazepam.

#### 3.4.1 Farmacocinética

A absorção do clonazepam é rápida e de 82 até 98% da dose ingerida é absorvida no trato gastrintestinal. Possui alta solubilidade e o pico plasmático

varia de 3 a 12 horas. O início de sua ação ocorre de 3 até 60 minutos após a ingestão via oral e dura de 6 à 8 horas na criança e de 8 à 12 horas no adulto. Este fármaco é altamente distribuído, com 82% de ligação a proteínas plasmáticas e atravessa a barreira hemato-encefálica por difusão passiva (PATSALOS, 2005). Em estudo de fase III, as variáveis cinéticas do clonazepam foram determinadas em voluntários sadios. A meia-vida de absorção foi de 24 minutos, a meia-vida de eliminação foi de 40 horas e o *clearance* foi de 72 mL/minuto, demonstrando que esta via de administração é bem efetiva (GREENBLATT *et al.*, 2005).

Este fármaco sofre biotransformação hepática em cinco metabólitos já identificados, e a rota bioquímica de sua transformação ocorre em duas etapas. Na primeira, o grupo nitro sofre redução, produzindo o metabólito ativo 7-aminoclonazepam. Na segunda fase, o metabólito é acetilado em diferentes posições e, posteriormente, eliminado na urina. Possui meia-vida plasmática que varia de 32 a 38 horas (KOROLKOVAS, 2004).

Devido à eficácia do clonazepam no tratamento de convulsões generalizadas, novas formas farmacêuticas estão sendo desenvolvidas. Por exemplo, estudos em modelos animais com microemulsões para uso intranasal mostrou ser maior e mais rápida a disponibilidade no sistema nervoso central em relação à administração intravenosa (VYAS *et al.*, 2006).

O uso do clonazepam na forma de injeções subcutâneas de absorção lenta, forma utilizada para tratamentos prolongados, já está sendo testado em ensaios clínicos de fase III. Neste ensaio, a nova forma obteve resultados similares aos obtidos pela ingestão oral de uma dose diária por 12 dias, com a vantagem de manter a concentração plasmática mais estável (GREENBLATT, *et al.*, 2005).

### **3.4.2 Farmacodinâmica**

O clonazepam é utilizado como anticonvulsivante e no tratamento de distúrbios neurológicos, como, por exemplo, mioclonias, tremor cerebelar,

espasmo facial, acatisia induzida por neurolépticos, na síndrome de pernas inquietas e na síndrome da boca ardente. Também possui indicação clínica no tratamento de transtornos do humor, como o transtorno afetivo bipolar, a depressão maior e o transtorno do pânico (GOODMAN, 2004).

Atualmente, o clonazepam vêm sendo empregado também para o combate ao bruxismo. Estudo controlado com placebo demonstrou que a administração aguda de clonazepam melhorou os sintomas do bruxismo, assim como a qualidade do sono dos pacientes submetidos ao protocolo (SALETU *et al.*, 2005). Outra aplicação na área de odontologia é como alternativa a carbamazepina na neuralgia do trigêmeo ou em associação com outras drogas para esta mesma doença (SINDRUP e JENSEN , 2002).

O clonazepam também se mostrou útil no tratamento da dor neuropática, sozinho ou em associação com outros anticonvulsivantes (CONVIGTON, 1998).

O clonazepam é um modulador positivo do receptor GABA<sub>A</sub>, que potencializa a ação inibitória do GABA na atividade neural, através de interações com sítios receptores específicos (WILSON, 1992). Estes sítios são estruturas moleculares complexas e reguladoras dos receptores GABA<sub>A</sub>.

O GABA<sub>A</sub> é um receptor ionotrópico cuja ativação aumenta a condutância do íon cloro na membrana, aumentando o limiar para o potencial de ação (BOWERY, 1989). Possui 5 sub-unidades e sua função varia dependendo de sua constituição, a partir da combinação destas sub-unidades, e sua localização no SNC (RUDOLPH e MOHLER , 2006). Por exemplo, receptores contendo subunidade alfa 1 mediam a sedação e são alvos para hipnóticos. Agonistas seletivos para as subunidades alfa 2 e alfa 3 podem ser ansiolíticos, sem provocar sedação, o que é o inverso do que ocorre para agonistas alfa-5. Agonistas seletivos para a subunidade alfa-3 podem ser úteis no tratamento de déficits motores presentes em doenças psiquiátricas. (RUDOLPH e MOHLER, 2006). O clonazepam atua neste receptor através de sua interação com a sub-unidade alfa de forma inespecífica, provocando, assim, efeitos sedativos e ansiolíticos.

Como os demais benzodiazepínicos, suas interações medicamentosas incluem o ácido valpróico, o qual pode potencializar seu efeito hipnótico,

produzindo estado de ausência em alguns pacientes. Além disso, a carbamazepina, por ser indutora do sistema microssomal hepático, aumenta sua biotransformação, acarretando diminuição dos níveis séricos de clonazepam.

Sua atividade antidepressiva ainda não está bem estudada. A vantagem no emprego do clonazepam estaria no fato do mesmo possuir apenas um metabólito ativo e ser menos tóxico nos seus efeitos, uma vez que atua somente em receptores centrais (NARDI e PERNA, 2006). Sua indicação como antidepressivo apresenta como vantagem a meia-vida elevada, que facilita a interrupção do tratamento em caso de aparecimento de efeitos colaterais (NARDI e PERNA, 2006). É utilizado em combinação com inibidores da recaptação da serotonina em pacientes com depressão. (MORISHITA, 2004).



## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

---





## 4.1 Animais e Reagentes

Ratos albinos machos da raça Wistar com 30 dias de idade (peso  $300 \pm 50$  g), obtidos do Biotério da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre - FFFCMPA, foram mantidos em gaiolas coletivas com no máximo 5 animais, em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), água e alimento à vontade, ciclo claro-escuro de 12 horas (7-19h).

Todos os experimentos animais seguiram as recomendações oficiais da Federação da Sociedade Brasileira de Biologia Experimental e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA).

Todos os reagentes utilizados nos ensaios de estresse oxidativo são de grau de pureza para análise (PA) e foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO), exceto o TBARS, adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). O TAR foi dosado usando espectrofotômetro de Beta-cintilação líquida (modelo Wallac 1409). A medida do TBARS e da atividade das enzimas antioxidantes foram realizadas com espectrofotômetro com controle de temperatura (modelo Hitachi U-2001).

## 4.2 Estreptozotocina

A estreptozotocina (STZ) (Sigma, St. Louis, MO) é um pó estéril, facilmente dissolvido em uma solução tampão citrato 0,05M (pH 4,3). Para o experimento foi preparada uma solução de concentração 60 mg/mL deste fármaco.

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

Uma das vantagens do estudo da Diabetes por STZ em ratos está no fato de que é possível isolar e manipular diretamente variáveis individuais, caracterizando a relação entre elas, além do que, em doses apropriadas, os animais sobrevivem sem insulina. Desta forma, as conseqüências fisiológicas da hiperglicemia crônica e o tratamento com insulina podem ser observados independentemente. Embora

devam ser tomados cuidados na extrapolação de resultados obtidos com modelos animais para desordens clínicas em humanos, o modelo do diabetes em animais tem explicado muitas das alterações metabólicas complexas induzidas pelo Diabetes.

### **4.3 Clonazepam**

O clonazepam é um pó branco, estéril, pouco solúvel em água. Para preparação da solução contendo 0,5 mg/Kg utilizada no experimento, foi utilizado tampão citrato-salina pH 4,3.

Para a realização dos experimentos foi utilizado clonazepam obtido através da maceração de comprimidos de Rivotril® 2 mg (Roché).

### **4.4 Indução do Diabetes**

Para indução do Diabetes experimental, utilizou-se solução de STZ, recém preparada em tampão citrato pH 4,3, em dose única, de 60 mg/Kg, via intraperitoneal.

No primeiro dia do experimento, os ratos foram pesados e separados aleatoriamente em dois grupos. No grupo I foi induzido o Diabetes com uma injeção, via intraperitoneal, de estreptozotocina 60 mg/kg após um jejum de 12 horas. O grupo II recebeu, também por via intraperitoneal, solução salina. Logo após a administração estes animais permaneceram em gaiolas individuais por 4 dias com água e comida *ad libitum* para confirmação do estado de Diabetes através de avaliação da hiperglicemia, utilizando glicosímetro *Advantage* marca Roche® por sangue coletado de punção na cauda. Os animais do grupo I que apresentaram glicemia sem jejum menor que 250 mg/mL foram descartados do experimento.

### **4.5 Ensaio de Natação Forçada**

Este método é baseado nas observações de que o rato introduzido em água profunda, sem possibilidade de fuga, cessa os movimentos após um período inicial de nado vigoroso, mantendo, somente, os movimentos necessários para

manter a cabeça fora da água. Esse comportamento de imobilidade tem valor preditivo na avaliação do efeito antidepressivo de fármacos (PORSOLT *et al.*, 1977, YATES *et al.*, 1991 e GOMEZ & BARROS, 2000).

Após 21 dias de aplicação de STZ, os animais foram submetidos ao modelo de natação forçada. No primeiro dia, os animais foram submetidos a ambientação durante 15 minutos em aquário (22 X 22 X 35 cm) contendo 27 cm de altura de água a temperatura de 24-26° C, exatamente 24 horas antes do teste propriamente dito. Logo após, os ratos eram secos com toalhas e era aplicada a primeira dose de 0,5 mg/Kg do fármaco testado, correspondente a dose de 24 horas antes do experimento. Para o segundo dia de teste (5min) os animais, em jejum, receberam o tratamento subagudo com clonazepam 0,5 mg/kg ou solução citrato-salina, por via i.p., 5 h e 1 h antes de serem submetidos novamente ao aquário. A fase comportamental foi filmada em video-cassete para posterior avaliação etológica quanto à imobilidade dos animais e correlação com os parâmetros bioquímicos testados (GOMEZ & BARROS, 2000). Foram considerados como imobilidade a ausência de nado ativo e movimentos realizados com intuito de manter a cabeça fora da água. Trinta minutos após o teste os animais foram sacrificados por decapitação para a coleta dos tecidos.

O experimento comportamental foi realizado no período entre 13 h e 17 horas para evitar variações decorrentes do ciclo hormonal dos animais.

#### **4.6 Obtenção de tecidos**

Após a realização do ensaio de natação forçada, os animais foram anestesiados com éter etílico para a coleta de sangue venoso heparinizado obtido por punção ocular. Este foi centrifugado por 10 minutos a 3 000 X g, o plasma separado foi congelado a – 80 °C. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com o dobro do volume de NaCl 0,9%, centrifugando-se por 10 min a 3000 X g, após cada lavagem. Os eritrócitos obtidos foram diluídos na proporção de 1:11 em salina, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer – 80 °C (SERRA, *et al.*, 2000).

A coleta de estriado, córtex pré-frontal e hipocampo foi realizada em gelo. O tecido foi homogeneizado com pistilo de teflon em tampão fosfato 20 mM pH

7,4, contendo 140 mM de cloreto de potássio, e mantido refrigerado para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo em 24 horas.

#### **4.7 Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Esta determinação foi realizada pelo método de BUEGE & AUST (1978). Um volume de 250  $\mu$ L da amostra foi incubado em meio ácido com ácido tiobarbitúrico (TBA) em banho-maria fervente. Após 15 min de incubação, os tubos foram resfriados e o produto formado entre o TBA e o MDA resultante da lipoperoxidação foi extraído com 1,5 ml de butanol, e a absorbância medida a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg proteína.

#### **4.8 Determinação da atividade da catalase (CAT)**

A atividade da catalase foi determinada de acordo com o método descrito por AEBI (1984), baseado na decomposição da  $H_2O_2$ , acompanhada a 240 nm, à temperatura ambiente. A amostra (eritrócitos) foi diluída 100 vezes em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e a absorbância acompanhada a 240 nm antes e após a adição de  $H_2O_2$  para uma concentração final de 30 mM. Os resultados foram expressos em unidades de atividade para a catalase por mg de proteína (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1  $\mu$ mol de  $H_2O_2$  /min/mg de proteína) e calculados utilizando-se o coeficiente de absorção molar para a  $H_2O_2$  ( $40 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 240 nm).

#### **4.9 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada com o Kit RANSOD (Ransox, Antrim, UK). O método baseia-se na formação de um formazan púrpura pela reação do cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazólio e o radical superóxido (produzido no meio de incubação do sistema de reação xantina-xantina oxidase), o qual foi analisado espectrofotometricamente a 505 nm. Para a determinação da SOD foram utilizados 12,5  $\mu$ L de eritrócitos lisados. A inibição do cromógeno produzido é proporcional a atividade da SOD presente na amostra. Uma inibição

de 50% é definida como uma unidade de SOD e a atividade específica é representada como U/mg de proteína.

#### **4.10 Determinação da Reatividade Antioxidante Total (TAR)**

Este parâmetro representa a qualidade dos antioxidantes teciduais e foi determinado pela medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida por ABAP (2,2" Azo-Bis 2-amidinoproprano) de acordo com o método de Lissi et al. (1992). A quimiluminescência de fundo foi determinada pela adição de 4 mL de ABAP 2 mM em tampão de glicina 0.1M, pH 8.6 em um vial de cintilação. Foram adicionados quinze microlitros de luminol (4 mM) a cada vial e a quimiluminescência foi medida, a qual foi considerada o valor basal. Dez microlitros de Trolox 10  $\mu$ M ou amostra foi, então, adicionada e a quimiluminescência foi medida durante 60 segundos. A adição de Trolox ou da amostra diminui a quimiluminescência. A redução rápida na intensidade do luminol é considerada como uma medida da capacidade TAR. A medida da TAR foi calculada como mol Trolox / mg proteína.

#### **4.11 Determinação da Glicose**

A determinação da glicose foi feita em soro pelo método enzimático da glicose oxidase, utilizando-se um Kit industrial – Labtest. Este método enzimático é indireto e baseia-se na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase, resultando em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Este em presença de um cromógeno reduzido (fenol + 4-aminoantipirina) e da enzima peroxidase forma um cromógeno (antipirilquinonina) que apresenta uma coloração intensa, a qual é proporcional a concentração de glicose na amostra. A medida foi realizada em espectrofotômetro em 500nm, sendo os resultados expressos em mg/dL.

#### **4.12 Dosagem de Proteínas**

As proteínas foram determinadas segundo a técnica proposta por Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando albumina bovina como padrão.

#### **4.13 Análise Estatística**

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados através do programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”) em um computador PC compatível. Para os parâmetros de estresse oxidativo, perfil glicêmico e comportamento (imobilidade) foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Duncan, quando o valor F foi significativo. A correlação de Pearson foi utilizada na avaliação da correlação entre os parâmetros bioquímicos e o comportamento. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## **RESULTADOS**

---





## 5.1 Avaliação do Modelo Experimental

A monitorização clínica dos animais diabéticos revelou que eles apresentavam glicosúria, polidipsia e poliúria. O pêlo tornou-se menos brilhoso e mais amarelo. Houve perda de peso por parte dos animais diabéticos e a diferença das médias de peso entre os dois grupos foi significativa 21 dias após a indução do diabetes. Os animais diabéticos apresentaram peso médio de  $250,00 \pm 14,74$  g, enquanto os animais não diabéticos apresentaram peso médio de  $315 \pm 27$  g. A glicose no plasma foi medida e os animais diabéticos apresentaram glicemia média maior em relação aos animais não diabéticos [ $F_{(1,51)} = 1251$ ,  $p < 0,01$ ], por ANOVA de uma via. O clonazepam não mostrou qualquer impacto sobre a glicemia dos animais, confirmando os resultados obtidos por GOMEZ *et al.* (2001), conforme podemos observar na tabela 1.

Cabe salientar que foram descartados 4 animais que não tornaram-se diabéticos após administração de estreptozotocina. Não houve perda por morte no intervalo entre a indução do diabetes e o teste de natação forçada.

**Tabela 1** Glicemia dos grupos de animais tratados ou não tratados com clonazepam.

Grupo	Média (mg/dL)	Desvio Padrão	N
Diabético	454,73*	30,26	14
Não Diabético	106,00	8,40	12
Não Diabético + clonazepam	116,61	21,88	12
Diabético + clonazepam	428,87*	24,78	14
Total			52

Glicemia no plasma de ratos Wistar. \*  $p < 0,05$  em relação aos grupos não diabéticos (ANOVA seguida pelo teste de Duncan). [ $F_{(1,51)} = 1251$ ,  $p < 0,05$ ]

## 5.2 Avaliação dos Parâmetros de Estresse Oxidativo

### 5.2.1 Avaliação dos Parâmetros de Estresse Oxidativo em Plasma e Eritrócitos

Animais diabéticos apresentaram medida de TBARS aumentada significativamente em relação a animais não diabéticos. O clonazepam diminuiu

significativamente o TBARS em plasma de ratos diabéticos [ $F_{(1,41)} = 32,27, p < 0,01$ ] em relação aos animais diabéticos não tratados, porém este parâmetro continua elevado em relação aos animais não diabéticos (figura 2). Entre os grupos não diabéticos, o clonazepam não exerceu efeito significativo sobre este parâmetro.

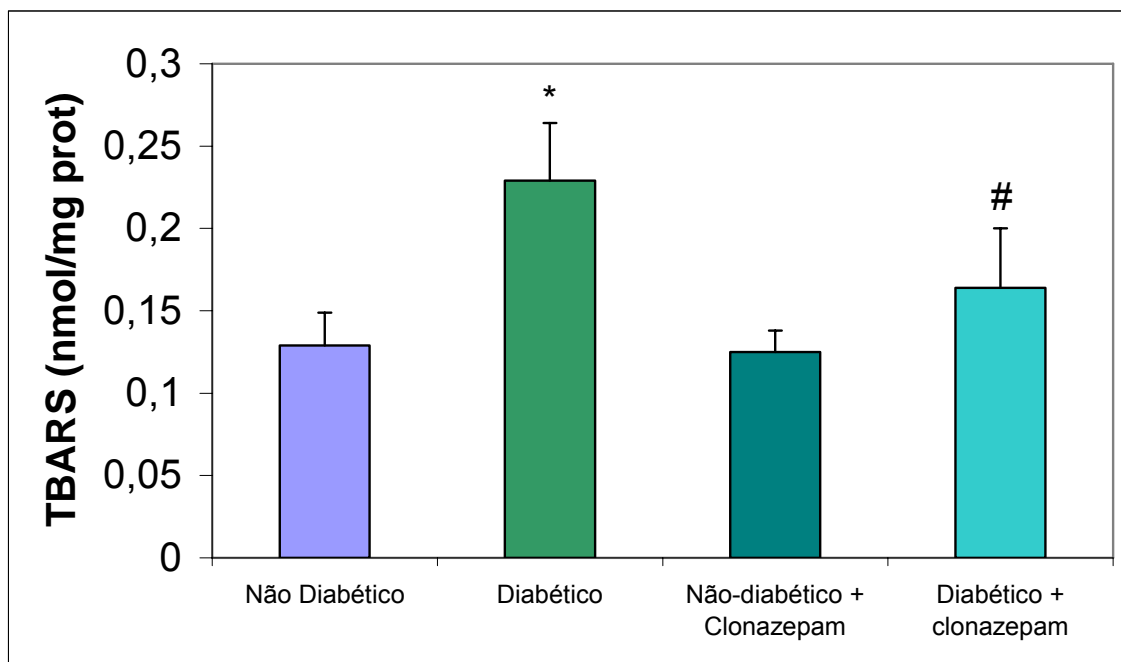


Figura 2: Medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em plasma de ratos Wistar. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 10). \*, #  $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, seguida pelo teste de Duncan) [ $F_{(1,41)} = 32,27, p < 0,01$ ].

A reatividade antioxidante total no plasma também apresentou resultados significantes. Houve uma redução do TAR em animais diabéticos não tratados em relação aos demais grupos [ $F_{(1,13)} = 3,92, p < 0,05$ ]. A administração de clonazepam em animais diabéticos aumentou o TAR em relação aos animais não tratados, confirmando influência periférica do fármaco no combate aos radicais livres (figura 3). O clonazepam não exerceu efeito sobre o TAR em ratos não diabéticos.

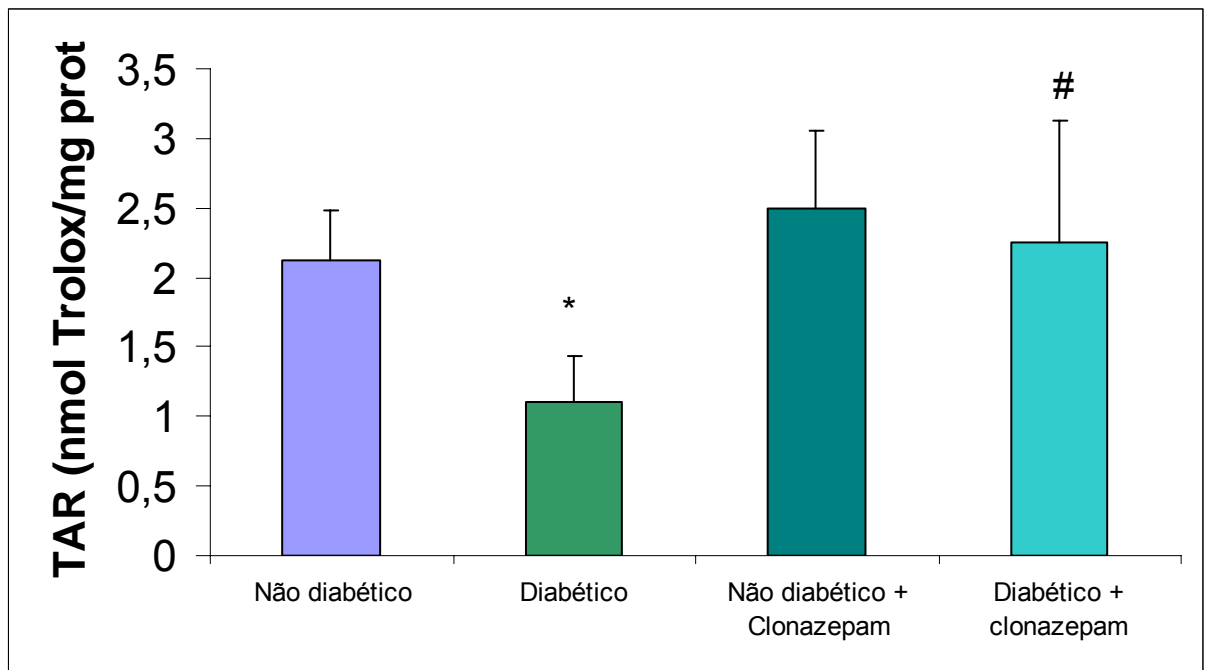


Figura 3: Medida da reatividade antioxidante total em plasma de ratos Wistar. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). \*, #  $p < 0,05$  em relação ao controle, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo diabético (ANOVA, seguida pelo teste de Duncan) [ $F_{(1,13)} = 3,92$ ,  $p < 0,05$ ].

A medida das atividades enzimáticas antioxidantes CAT e SOD em eritrócitos não apresentou diferenças significativas entre os grupos: CAT [ $F_{(1,22)} = 0,20$ ,  $p > 0,05$ ] e SOD [ $F_{(1,24)} = 0,85$ ,  $p > 0,05$ ] (figuras 4 e 5).

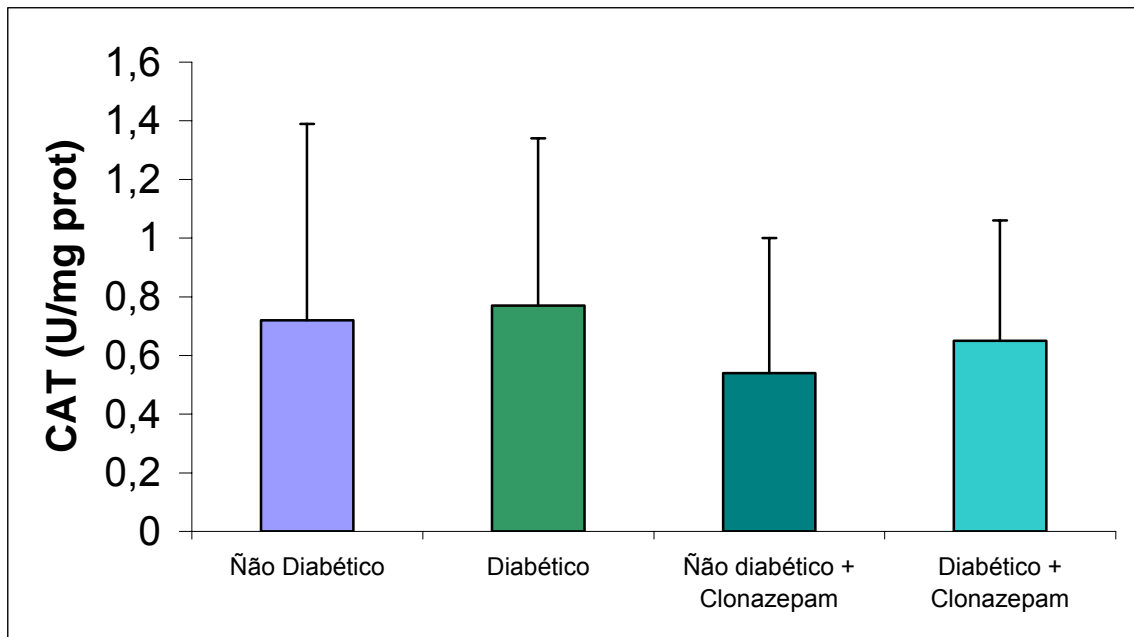


Figura 4: Atividade da catalase em eritrócitos de ratos wistar. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 6) [ $F_{(1,22)} = 0,20$ ,  $p > 0,05$ ].

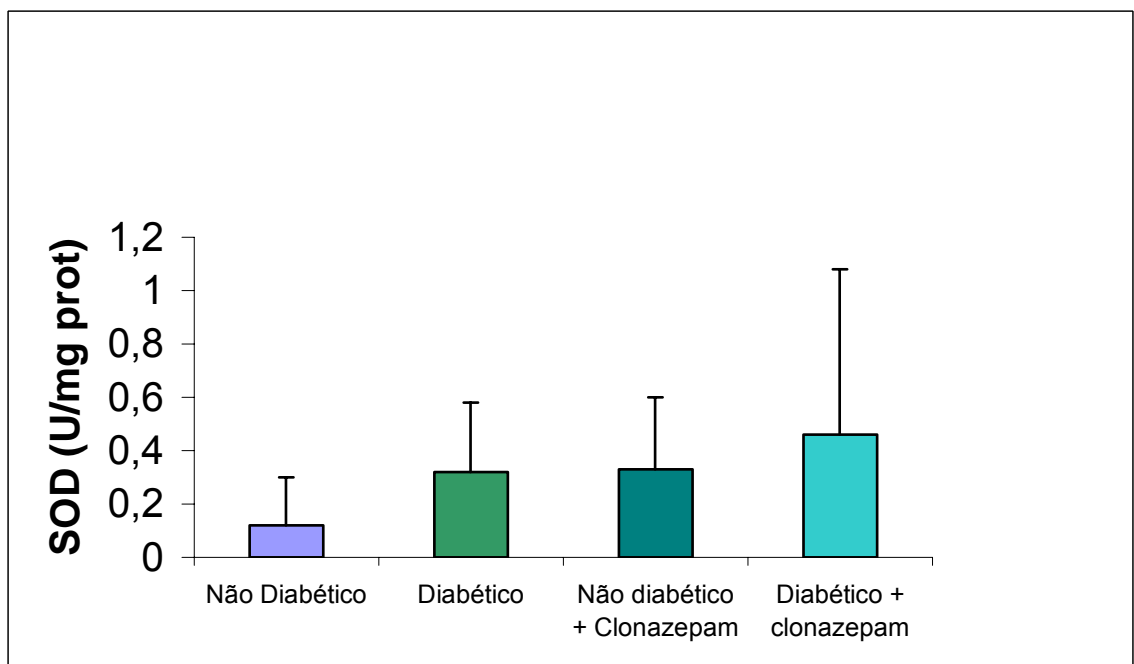


Figura 5: Atividade da superóxido dismutase em eritrócitos de ratos wistar. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 6) [ $F_{(1,24)} = 0,85$ ,  $p > 0,05$ ].

## 5.2.2 Parâmetros de Estresse Oxidativo no Sistema Nervoso Central

### 5.2.2.1 Hipocampo

Os parâmetros de estresse oxidativo analisados em hipocampo mostraram diferenças entre os grupos. Animais diabéticos apresentaram valores de TBARS aumentados em relação aos demais grupos [ $F_{(1,12)} = 4,37, p < 0,05$ ]. A utilização de clonazepam não exerceu qualquer efeito sobre o TBARS em animais não diabéticos. Porém, a administração do fármaco reduziu significativamente este parâmetro em animais diabéticos (figura 6).

O parâmetro TAR não mostrou diferenças significativas entre os grupos [ $F_{(1,13)} = 0,60, p > 0,05$ ], ou seja, não foi demonstrada mudanças na reatividade antioxidante total neste tecido induzido por diabetes e/ou clonazepam (figura 7).

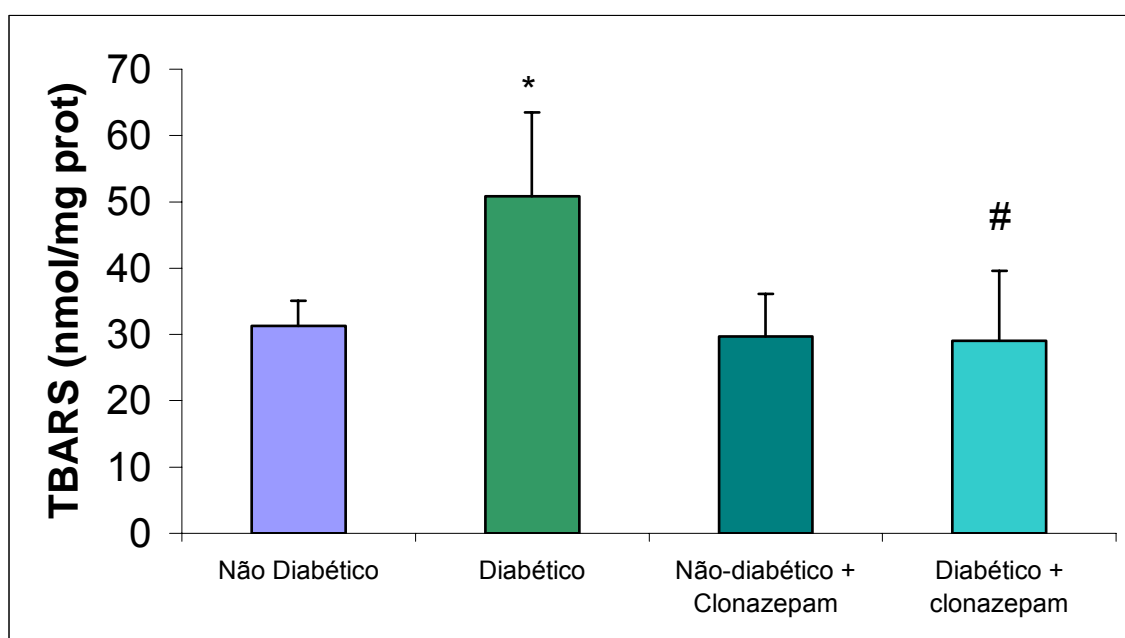


Figura 6: Medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em hipocampo de ratos Wistar. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). \*,  $p < 0,05$  em relação ao controle, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo diabético (ANOVA, seguida pelo teste de Duncan) [ $F_{(1,12)} = 4,37, p < 0,05$ ]. #

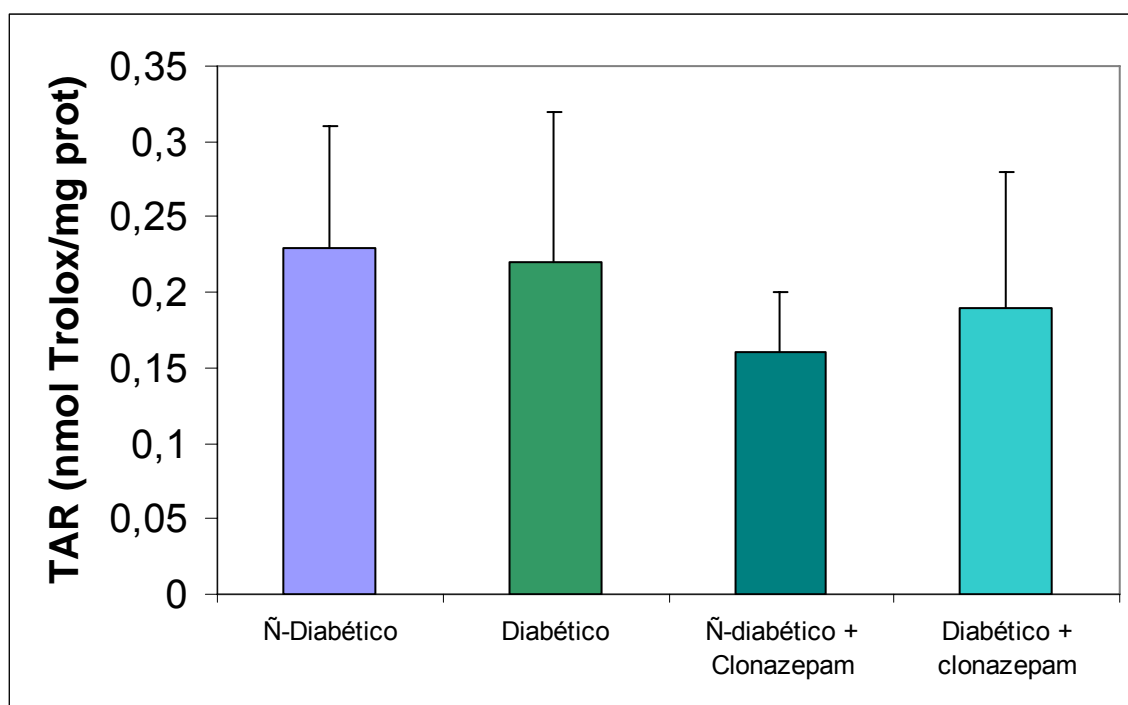


Figura 7: Medida da reatividade antioxidante total em hipocampo de ratos Wistar. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$  [ $F_{(1,13)} = 0,60, p > 0,05$ ]).

### 5.2.2.2 Córtex Pré-frontal

Os valores de TBARS no córtex estão significativamente aumentados nos animais diabéticos em relação aos animais não diabéticos [ $F_{(1,16)} = 9,60, p < 0,01$ ]. Notou-se uma redução no valor médio do TBARS quando foi administrado o clonazepam, tanto em animais diabéticos quanto em animais não diabéticos em relação a seus controles, embora não significativo (figura 8).

No parâmetro TAR, o clonazepam aparentemente altera esta reatividade, porém este efeito não pode ser demonstrado estatisticamente (figura 9). Apenas o fator Diabetes mostrou-se significativo, uma vez que animais diabéticos apresentaram valores de TAR significativamente menores que animais não diabéticos [ $F_{(1,11)} = 6,95, p < 0,05$ ].

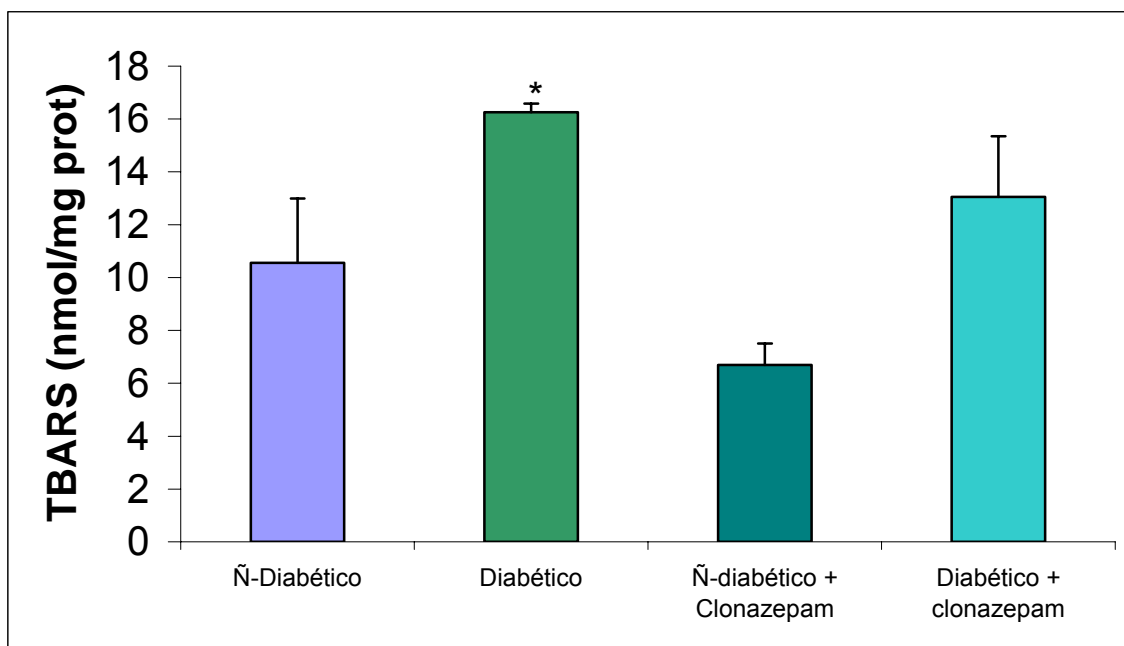


Figura 8: Medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em córtex de ratos Wistar. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 4). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, seguida pelo teste de Duncan) [ $F_{(1,16)} = 9,60, p < 0,01$ ].

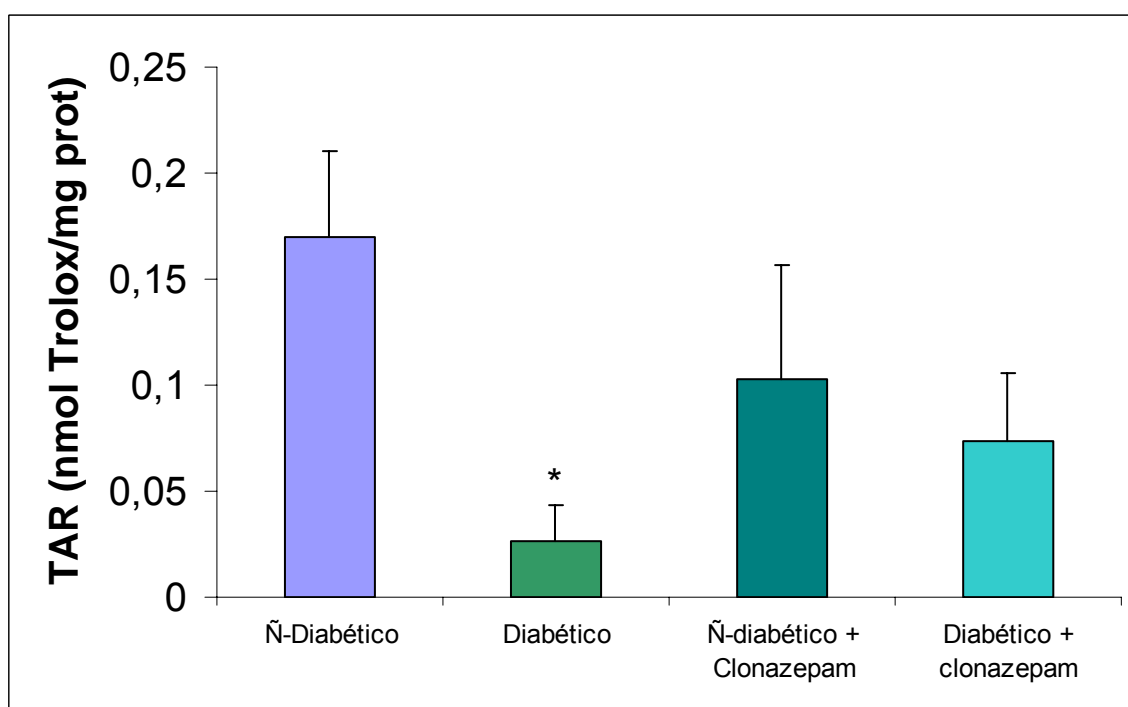


Figura 9: Medida da reatividade antioxidante total em córtex de ratos Wistar. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). \*  $p < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA, seguida pelo teste de Duncan) [ $F_{(1,11)} = 6,95, p < 0,05$ ].



### 5.2.2.3 Estriado

Os ensaios de estresse oxidativo realizados no estriado mostraram que o TBARS não encontra-se alterado em animais diabéticos, tratados ou não por clonazepam [ $F_{(1,16)} = 0,92, p > 0,05$ ] (figura 10).

No ensaio de TAR, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, mostrando que tanto o Diabetes quanto o clonazepam não influenciaram a reatividade antioxidante nesta estrutura cerebral [ $F_{(1,13)} = 0,48, p > 0,05$ ] (figura 11).

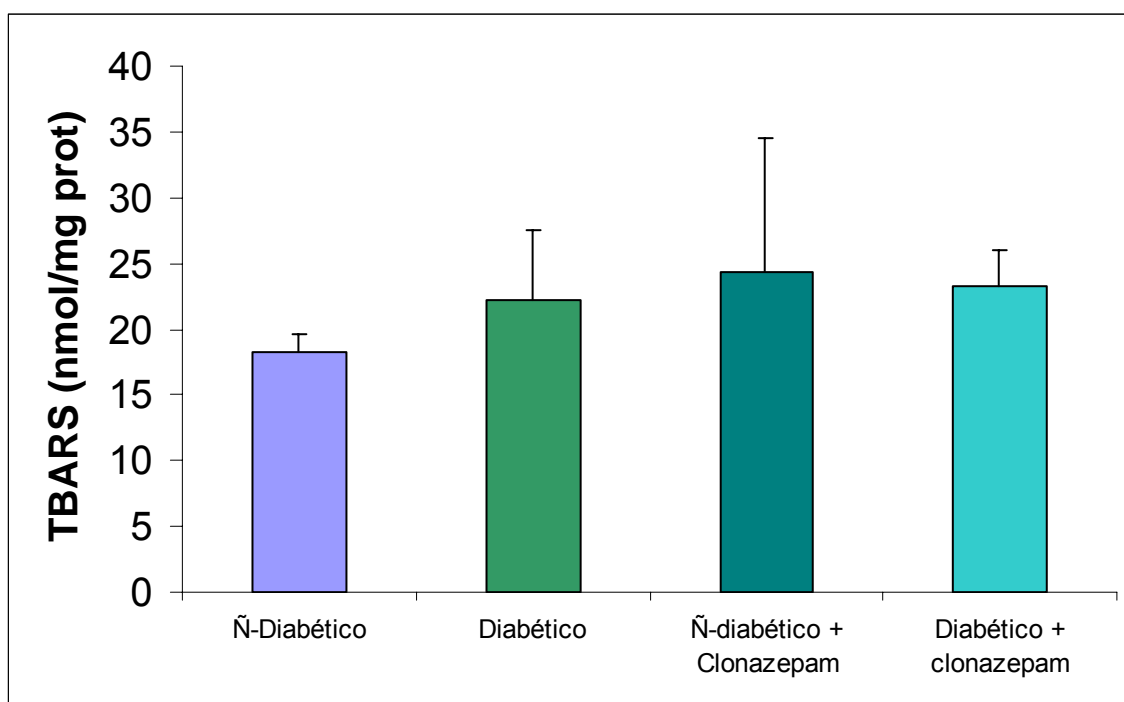


Figura 10: Medida das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em estriado de ratos Wistar. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 4) [ $F_{(1,16)} = 0,92, p > 0,05$ ].

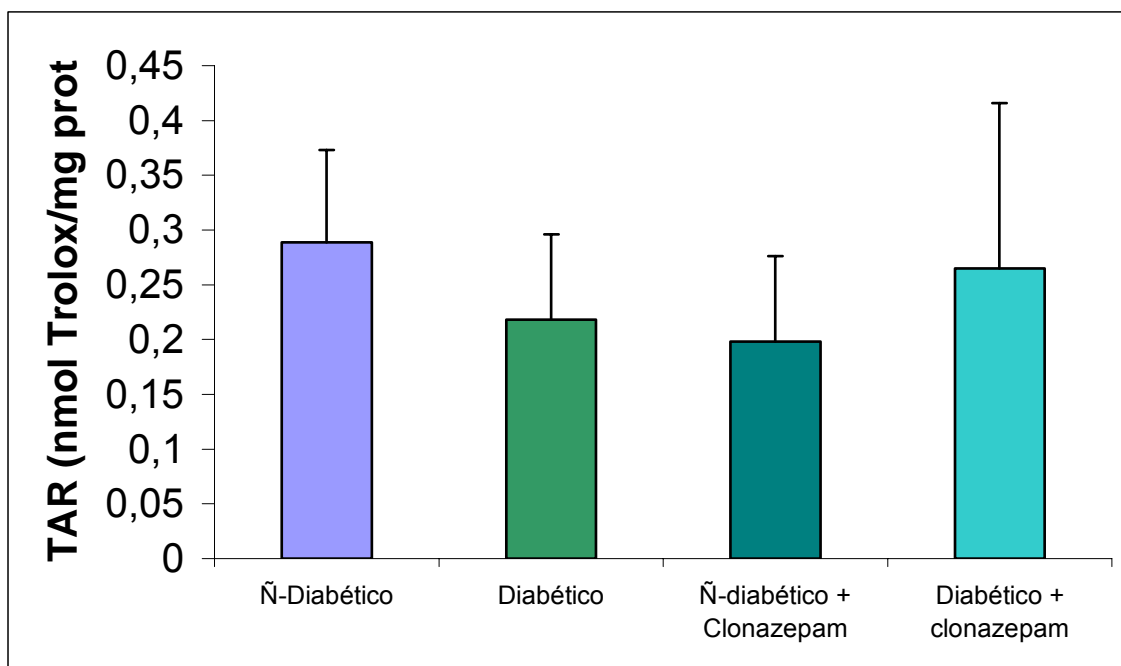


Figura 11: Medida da reatividade antioxidante total em estriado de ratos Wistar. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 3) [ $F_{(1,13)} = 0,48, p > 0,05$ ].

### 5.3 Avaliação Comportamental

No experimento de natação forçada houve diferenças significativas entre os grupos testados. Os grupos diabéticos e não diabéticos que não utilizaram o fármaco apresentaram imobilidade média maior em relação aos grupos que utilizaram [ $F_{(1,18)} = 43,82, p < 0,01$ ]. O grupo diabético que utilizou o fármaco movimentou-se mais que ambos os controles (diabético e não diabético), porém movimentou-se menos em relação ao grupo não diabético que utilizou o fármaco (tabela 2).

Ainda, a correlação de Pearson, embora não estatisticamente significativa, mostrou-se positiva entre imobilidade e TBARS no plasma ( $R = 0,685$ ), no hipocampo ( $R = 0,754$ ) e no córtex ( $R = 0,812$ ) e negativa entre imobilidade e TAR no plasma ( $R = -0,864$ ).

**Tabela 2** Imobilidade dos animais submetidos ao teste de natação forçada

Grupo	Média Imobilidade (seg)	Desvio Padrão	N
Não Diabético	224,75	10,04	4
Diabético	248,50*	5,44	4
Não Diabético + clonazepam	152,00#	20,17	5
Diabético + clonazepam	187,83**	12,22	6
Total			19

Imobilidade de ratos Wistar. Resultados expressos como média em segundos dos animais submetidos a 300 segundos de natação forçada. \*  $p < 0,05$  em relação aos controles (ANOVA seguida pelo teste de Duncan), \*\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo diabético e #  $p < 0,05$  em relação em relação aos controles [ $F_{(1,18)} = 43,82$ ,  $p < 0,01$ ]

## **DISCUSSÃO**

---



## 6.1 Estresse Oxidativo em Plasma e Eritrócitos

Os parâmetros de estresse oxidativo medidos no plasma e nos eritrócitos dos animais de experimentação avaliam a lipoperoxidação (medida de TBARS), a reatividade dos sistemas antioxidantes não enzimáticos em sua totalidade (medida de TAR) e a atividade das enzimas que desempenham importante papel antioxidante na neutralização dos radicais livres gerados (CAT e SOD).

A enzima superóxido dismutase catalisa a reação de neutralização do ânion superóxido formado em diversas rotas (PRYOR *et al.*, 2006). Esta enzima está presente tanto no meio intra-celular quanto no meio extracelular e catalisa a reação mostrada abaixo:

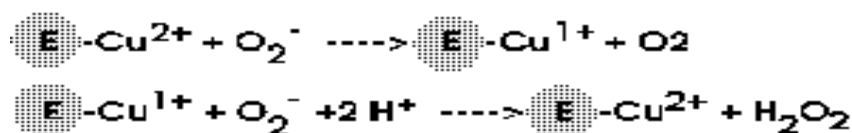


Figura 12. Reação da Superóxido Dismutase

Além do cobre, esta enzima possui outras duas isoformas que catalisam a mesma reação utilizando como co-fatores os cátions  $\text{Zn}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  (PRYIOR *et al.*, 2006).

O peróxido de hidrogênio gerado por esta reação pode se decompor em nova espécie reativa de oxigênio (ERO), capaz de gerar estresse oxidativo ao atacar lipídeos de membrana ou DNA. Para que isso não ocorra, este produto é desativado por outra enzima que também está onipresente, a CAT, segundo a reação abaixo.

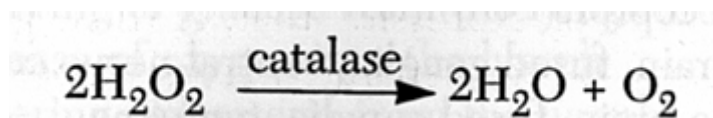


Figura 13. Reação da Catalase

A conjugação das duas enzimas constitui o maior complexo de defesa enzimático contra ERO, razão pela qual foram testadas em amostras periféricas. Em diabéticos não controlados, devido a altas taxas de glicose no sangue, gera-se uma elevada quantidade de ERO induzida pela hiperglicemia, notadamente o ânion superóxido (CERIELLO, 2006).

A atividade destas duas enzimas não foram alteradas em eritrócitos nos quatro grupos de animais testados, ou seja, não houve mudanças significativas de atividade enzimática antioxidante da SOD e da CAT em animais diabéticos submetidos à natação forçada tratados ou não com o clonazepam.

No entanto, os resultados obtidos nas medidas de TAR e TBARS em plasma, principalmente nos grupos diabéticos, mostrou a ocorrência do estresse oxidativo, uma vez que animais diabéticos apresentaram aumento de TBARS e diminuição de TAR. O tratamento destes animais com clonazepam reverteu o aumento do TBARS e a redução do TAR em plasma, mostrando o efeito protetor deste fármaco. Em animais não diabéticos a administração do fármaco não gerou qualquer modificação perceptível nos parâmetros de estresse oxidativo. Isto comprova que há um aumento na produção de radicais livres devido ao DM, e que o clonazepam exerceu efeito em sua diminuição. Estudos utilizando gliclazida, um hipoglicemiante oral utilizado para controle glicêmico de pacientes diabéticos, mostraram redução do estresse oxidativo em plasma e eritrócitos por mecanismos não elucidados (CERIELLO, 2006b). Além disso, o fato de não haver qualquer alteração na atividade das principais enzimas antioxidantes nos grupos de animais testados, somente reforça a hipótese de que o clonazepam exerceu um efeito benéfico sobre o controle de ER, pela ação de antioxidantes não enzimáticos.

O efeito da diminuição do TBARS, o qual mede o malondialdeído, um produto da lipoperoxidação, e do aumento da reatividade antioxidante total, a qual mede a capacidade de modular a ação dos radicais livres, devido à administração de clonazepam, pode sugerir a diminuição da ocorrência de distúrbios periféricos secundários ao Diabete, como a retinopatia e a neuropatia, uma vez que as ERO desempenham papel importante no desenvolvimento destes quadros (CERIELLO, 2006b). A comprovação desta hipótese somente será possível através da

realização de estudos envolvendo a administração crônica de clonazepam em modelos animais de Diabetes, e verificando suas respostas a dor (teste de tail flick) para verificar o desenvolvimento ou não de neuropatia diabética. Ainda, seu possível efeito protetor sobre a nefropatia diabética poderia ser analisado pela avaliação de marcadores bioquímicos de função renal neste modelo animal (SARAFIDIS & RUILOPE 2006; YIN, 2006). Cabe salientar que a avaliação de outros marcadores bioquímicos de estresse oxidativo poderiam elucidar melhor alguns aspectos do envolvimento dos radicais livres no Diabetes.

## **6.2 Estresse Oxidativo no Sistema Nervoso Central**

O desenvolvimento do DM leva a aumento da produção de ERO, devido a hiperglicemia, o qual desempenha um papel central no desenvolvimento das complicações secundárias do diabetes (CERIELLO, 2006a). O SNC não está protegido das complicações do DM. Estudos em modelos animais de DM demonstram alterações cognitivas, estruturais, neuroquímicas, psicobiológicas, e na atividade apoptótica celular no SNC, porém seu mecanismo não está bem elucidado (LI e SIMA, 2004).

Nos experimentos realizados neste trabalho procurou-se avaliar o impacto do DM e do clonazepam sobre parâmetros de estresse oxidativo em diferentes regiões cerebrais, procurando correlacioná-los a alterações cognitivas no modelo animal de natação forçada.

O hipocampo, estrutura constituinte do sistema límbico, que possui papel importante e, ainda não elucidado, na formação de memória de longa duração foi avaliado. Nesta estrutura cerebral foi verificado aumento na lipoperoxidação, evidenciada pelo aumento do TBARS, em animais diabéticos em relação a controles não diabéticos. O clonazepam, na dosagem utilizada, não alterou o TBARS em animais não diabéticos, porém diminuiu o TBARS em animais diabéticos que o utilizaram. Entretanto, a reatividade antioxidante total não foi significativamente diferente entre os grupos estudados, tratados ou não com clonazepam nas doses utilizadas.



O estriado é uma região cerebral que possui funções de processamento de informações sobre o sistema motor e resposta a estímulos do ambiente, dependendo de suas conexões com outras áreas do encéfalo (ROLLS, 1994). Este tecido cerebral possui conexões com o hipocampo a partir do qual comanda a execução de seqüências de movimentos pré-determinados por experiências anteriores. Não verificou-se nenhuma alteração significativa nas concentrações de malondialdeído, medido pelo TBARS, nem mesmo na reatividade antioxidante total no estriado dos animais diabéticos submetidos ao teste de natação forçada tratados e não tratados com clonazepam em nosso estudo. Isto sugere uma menor susceptibilidade do estriado ao ataque das espécies reativas e, portanto, ao estresse oxidativo.

Não existem, na literatura, estudos de farmacocinética que tenham realizado dosagem do clonazepam nas diferentes áreas do SNC, o que poderia explicar este fenômeno pela menor disponibilidade do fármaco em determinado local, exercendo diferente efeito antioxidante. Contudo, os efeitos farmacológicos deste fármaco levam a crer que sua distribuição seja uniforme por todo córtex e apresente-se muito disponível no estriado, especialmente devido a seu efeito anticonvulsivante. Estudo recente mostrou o papel dos neurônios GABAérgicos de projeção nigro-striatal no espalhamento das convulsões (LOSCHER *et al.*, 2006). Outra possibilidade que explicaria este fenômeno seria a maior ligação do clonazepam a receptores GABA no estriado, exercendo maior efeito farmacológico que efeito antioxidante. Desta forma, a droga estaria menos tempo livre para exercer efeito antioxidante nesta estrutura.

Outro fator importante para esta diferença está no fato de que o clonazepam é mais efetivo no controle das convulsões generalizadas do que no controle de convulsões focais (VELISEK & MARES, 2004), ou seja, sua atividade farmacológica está mais relacionada a neurônios GABAérgicos do estriado que em neurônios GABAérgicos hipocâmpais. Logo, o clonazepam está muito mais ligado a receptores no estriado que no hipocampo e isso explicaria o menor poder antioxidante do clonazepam no estriado.

Por outro lado, estudos utilizando plaquetas e neutrófilos isolados de ratos, mostraram que o clonazepam diminuiu a produção de ERO mediada por neutrófilos e que este efeito foi revertido por antagonistas de benzodiazepínicos,

*in vitro* (RAJTAR G *et al.* 2002). Este efeito poderia também ocorrer *in vivo* e o efeito antioxidante do clonazepam em hipocampo, evidenciado em nosso experimento, poderia se dever a um efeito farmacológico do mesmo em receptores específicos, diminuindo a formação e liberação de marcadores pró-inflamatórios pelos mesmos. Neste caso, o clonazepam protegeria melhor o hipocampo quando comparado ao estriado porque na primeira estrutura estariam presentes mais receptores específicos que desempenham esta função inibitória na formação de marcadores pró-inflamatórios em relação à segunda estrutura.

De qualquer forma, mais estudos utilizando outros parâmetros de estresse oxidativo devem ser realizados para confirmar estas hipóteses. O que há de certo é que o clonazepam exerceu, na dose estudada, um efeito antioxidante no hipocampo de animais diabéticos e que este efeito não foi evidenciado no estriado.

O Córtex Pré-Frontal, considerado uma formação recente na evolução das espécies é a sede da personalidade e da vida intelectual, modula a energia límbica e tem a possibilidade de criar comportamentos adaptativos adequados ao tomar consciência das emoções (ARNSTEN e LI, 2005). Na ausência desta parte do córtex, as emoções ficam fora de controle, são exageradas e persistem após cessar o estímulo que as provocou, até que se esgote a energia nervosa.

Estudos realizados utilizando técnicas de imagem revelaram anormalidades nesta região do córtex em pacientes com depressão, assim como mostraram que a utilização de medicamentos antipsicóticos aumentaram a disponibilidade de dopamina nesta região, melhorando os sintomas da depressão maior (BENEDETTI, *et al.*, 2006). Agentes agonistas GABAérgicos também se mostraram úteis na melhora dos sintomas de pacientes com Desordem Afetiva Bipolar e em pacientes com esquizofrenia, pela maior disponibilidade de GABA no córtex pré-frontal (GUIDOTTI, *et al.*, 2005). Isto demonstra que em pacientes com desordens afetivas ocorre um desequilíbrio nos neurotransmissores nesta região, notadamente a dopamina e o GABA. Pacientes com depressão unipolar e com depressão maior também apresentam níveis diminuídos de GABA no córtex pré-frontal (HASLER, G *et al.*, 2005).

O aumento do TBARS e a diminuição do TAR no córtex pré-frontal em animais diabéticos, em relação aos animais não diabéticos, mostraram que o DM provoca, devido a seus efeitos metabólicos, estresse oxidativo neste tecido cerebral, e isto pode estar relacionado com a diminuição dos níveis de GABA, através da destruição dos neurônios GABAérgicos nesta estrutura. De fato, animais diabéticos apresentam níveis diminuídos de GABA no SNC (GUIDOTTI, A *et al.*, 2005). Ainda, também ocorre diminuição de dopamina e de serotonina no SNC, mostrando que a natureza da alteração não é seletiva a neurônios GABAérgicos, o que reforça a hipótese de que o estresse oxidativo provoca destruição dos neurônios e que esta destruição é uma das causas da depressão no DM.

Outro fato que reforça esta hipótese é o aparecimento de anticorpos anti-ácido glutâmico descarboxilase (anti-GAD), enzima responsável pela síntese de GABA no SNC, em diabéticos (PEARCE *et al.*, 2005). A destruição dos neurônios GABAérgicos provocaria a liberação desta enzima em grandes quantidades no meio extra-celular, e esta exposição provocaria a geração de auto-anticorpos. Quanto maior a destruição, ou seja, com a progressão da doença, maior a tendência ao desenvolvimento de neuropatia diabética e outras complicações secundárias. Pacientes diabéticos com elevados títulos de anticorpos anti-GAD em líquido, apresentam resistência ao tratamento com insulina e tendência a epilepsia resistente ao tratamento com anticonvulsivantes (YOSHIMOTO, T *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos nos experimentos mostraram que ocorre uma redução da reatividade antioxidante no córtex de animais diabéticos não tratados em relação a animais não diabéticos. Além disso, o marcador de lipoperoxidação TBARS também mostrou-se aumentado em córtex de animais diabéticos. O clonazepam não conseguiu reverter os processos de estresse oxidativo nesta estrutura, embora os resultados mostrem uma tendência de efeito protetor deste fármaco. A realização de experimentos utilizando administração crônica de clonazepam para a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo, bem como a dosagem periférica e central, através de microdiálise, de anticorpos anti-GAD poderiam elucidar a hipótese da destruição gradual de neurônios GABAérgicos pelas ERO, a qual leva a sintomas depressivos.

A atividade farmacológica do clonazepam está relacionada a sua ligação com um subtipo de receptor GABA. Existem 5 subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> no sistema nervoso central conhecidos e suas funções variam de acordo com sua constituição, suas conexões e local onde se encontra no SNC. A ação do clonazepam sobre o receptor GABA<sub>A</sub> ocorre por ligação à subunidade alfa, promovendo a abertura do canal de cloro no neurônio. Não existem estudos que mostrem o predomínio de algum dos subtipos de receptores nas diferentes estruturas cerebrais em estudo, o que dificulta a compreensão de como atuaria o clonazepam, quais seus efeitos bioquímicos e farmacológicos nas diferentes regiões cerebrais. Sabe-se que existem subtipos de receptores GABA<sub>A</sub> que não contam com subunidade alfa, logo o clonazepam não exerce nenhum tipo de efeito neste receptor. Por outro lado, outros receptores são extremamente suscetíveis à ação do clonazepam, pois contam, em sua constituição, com mais de uma subunidade alfa (LOSCHER *et al.*, 2006).

A melhor compreensão de como atuam os receptores GABA<sub>A</sub> *in situ*, no seu microambiente e qual o predomínio de subtipos de receptor GABA<sub>A</sub> nas diferentes regiões cerebrais, estabeleceriam uma visão mais ampla da ação e das conseqüências bioquímicas da ligação do clonazepam em seu receptor. Evidências indiretas indicam que o clonazepam tem sua atividade farmacológica ligada a sua ação sobre neurônios presentes no estriado e no córtex pré-frontal, respectivamente, em sua ação anticonvulsivante (LOSCHER *et al.*, 2006; VELISEK & MARES, 2004) e antidepressiva (MORISHITA, 2004).

Os efeitos sobre os parâmetros de estresse oxidativo testados neste trabalho mostraram que o clonazepam exerceu um efeito sobre a geração de ERO em hipocampo de animais diabéticos e que este efeito poderia estar relacionado a seus efeitos antidepressivos. Existe uma importante correlação entre o DM e os anticorpos anti-GAD, presentes tanto no SNC quanto em tecidos periféricos. Postula-se que poderia haver uma correlação entre o estresse oxidativo e a geração de anticorpos anti-GAD que levam a uma diminuição do GABA no SNC e conseqüente propensão a convulsões e sintomas depressivos. O clonazepam, além de exercer seus efeitos farmacológicos de agonista GABAérgico, aumentando a ação do GABA e exercendo efeitos anticonvulsivantes e antidepressivos, poderia exercer um efeito bioquímico

antioxidante, evitando a destruição dos neurônios GABAérgicos por parte das ERO e, a longo prazo, retardar o aparecimento da encefalopatia diabética e dos sintomas depressivos.

### **6.3 Depressão**

O teste de natação forçada é aceito como um modelo animal de depressão. A imobilidade dos animais observada na água é um fenômeno relativamente específico e reproduz alguns aspectos da depressão em humanos, como a imobilidade e a hipotermia (PORSOLT *et al.*, 1977). Também se verifica que ratos submetidos ao nado forçado apresentam anedonia e menor índice de aprendizado no labirinto de Morris (RATES, 1997). Estas características comportamentais assumidas pelos animais quando submetidas ao modelo são interpretados como uma desistência a luta na situação desagradável e estressante, mostrando semelhança de face e preditiva (WILLNER, 1986).

Neste trabalho, o DM mostrou ser fator desencadeante de comportamento tipo depressivo no teste de natação forçada, pois os animais diabéticos apresentaram imobilidade maior em relação aos animais não diabéticos. Este dado confirma os resultados de estudos anteriores utilizando ratos Wistar e camundongos onde avaliou-se o comportamento dos animais diabéticos que foi revertido por administração de clonazepam (GOMES & BARROS, 2000) e insulina (HILAKIVI-CLARKE *et al.* 1990).

O DM induzido pela estreptozotocina pode induzir alterações em animais, semelhantes às alterações produzidas pelo estresse crônico. BELLUSH, *et al.* (1991), estudando alterações neuroquímicas e hormonais em animais 3 semanas após a indução do diabete e submetidos a estresse por imobilização, observaram um aumento maior do nível de corticosterona, em comparação com animais não diabéticos também submetidos a este teste. Estes autores observaram, ainda, que o estresse por imobilização aumenta significativamente a mobilização de 5-hidroxitriptamina (5-HT) nos ratos diabéticos, sugerindo menor adaptação deste sistema para estímulos estressores nestes animais. As alterações no SNC de animais diabéticos, como o aumento no estresse oxidativo no córtex pré-frontal,

poderiam se refletir nos resultados do comportamento, resultando em maior tempo de imobilidade no nado forçado.

Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho nos grupos de animais testados, observou-se que o clonazepam reverteu o tempo de imobilidade dos animais diabéticos. Alguns fármacos reconhecidos como de utilidade clínica como antidepressivos (tricíclicos, atípicos e IMAO) diminuem o tempo de imobilidade em animais (PORSOLT *et al.*, 1978). Este efeito anti-imobilidade foi observado também por GOMEZ, *et al.* (2001), em ratos diabéticos com estreptozotocina utilizando clonazepam em diferentes doses.

Outros agentes GABAérgicos também diminuem o tempo de imobilidade no nado forçado em ratos e camundongos, efeito este revertido por antagonistas do receptor GABA como a biculina e a picrotoxina (BORSINI *et al.*, 1986). BORSINI *et al.* (1988) demonstraram que, no nado forçado, 5 minutos após o pré-teste, o GABA está diminuído no núcleo *acumbens* e córtex cerebral. Os níveis de GABA no estriado não encontram-se alterados em animais diabéticos em relação a animais não diabéticos. No entanto, animais não diabéticos apresentam aumento nos níveis de GABA nesta estrutura, o que não é observado em animais diabéticos após o teste de natação forçada (GOMEZ, R. *et al.*, 2003).

A função do neurotransmissor GABA nas desordens do humor, em especial na depressão, vêm sendo estudada nas últimas décadas, e seu envolvimento é evidente, sendo, inclusive, considerada a possibilidade do sistema GABAérgico ser alvo de estudos para desenvolvimento de novas drogas antidepressivas (KENDEL, S.F *et al.* 2005).

Sabe-se que a administração crônica de diferentes antidepressivos altera a densidade de receptores GABA<sub>A</sub> (SURANY-CADOTTE *et al.*, 1984) e receptores GABA<sub>B</sub> (SCATTON *et al.*, 1987), e que a concentração plasmática do GABA é menor em pacientes com mania e depressão. É aceita a hipótese que diversos sistemas de neurotransmissores estão envolvidos na patogenia da depressão, porém os mecanismos de interação não estão completamente elucidados. Alguns estudos mostram interação positiva entre a terapia concomitante entre clonazepam e fluoxetina em pacientes com depressão maior resistente a tratamento (SMITH, *et al.* 2002). Além disso, já está provada interação entre os

sistemas GABAérgico e noradrenérgico (PETTY, 1995) na patogenia da depressão.

Foram observados baixos níveis de GABA no fluido cérebro-espinhal de indivíduos deprimidos e estas concentrações apresentavam correlação inversa à severidade da depressão (GERNER & HARE, 1981). Outro estudo mostrou diminuição dos níveis de GABA no fluido cérebro-espinhal de pacientes com depressão maior (VIEIRA *et al.*, 2006).

Não existem estudos envolvendo a dosagem de GABA em indivíduos diabéticos. Sabe-se, através de estudos com modelos animais, que o DM não afeta o transporte do GABA e do glutamato na membrana (DUARTE, *et al.*, 2004). Porém, o mesmo estudo mostrou que a insulina modula o transporte de GABA e glutamato, alterando os níveis de GABA na fenda sináptica e, ao mesmo tempo, revertendo a lipoperoxidação (TBARS). Nos animais testados no presente estudo, o clonazepam poderia estar exercendo efeito similar sobre este transporte e, como pode ser demonstrado, diminuindo o TBARS, exercendo efeito neuroprotetor. Tanto a insulina quanto o clonazepam exercem efeitos similares sobre o comportamento de animais diabéticos no teste de natação forçada, ou seja, ambos possuem efeitos antidepressivos (GOMES & BARROS, 2000; HILAKIVI-CLARKE *et al.*, 1990).

O emprego do clonazepam como agente antidepressivo, associado a seu efeito ansiolítico, é de especial interesse para pacientes diabéticos insulino-dependentes, uma vez que a ansiedade também está presente nesta doença. Outra vantagem do emprego deste fármaco é que o mesmo parece diminuir o estresse oxidativo de animais diabéticos. Atuando como antioxidante, o clonazepam pode reduzir o efeito das ERO sobre os sistemas, reduzindo algumas complicações secundárias do DM, como, por exemplo, a encefalopatia diabética.

## **CONCLUSÕES**

---

---





Avaliando os efeitos do clonazepam sobre o comportamento e parâmetros de estresse oxidativo de ratos diabéticos por estreptozotocina submetidos ao teste de natação forçada, podemos inferir que:

a) Houve aumento significativo do TBARS no plasma, no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais diabéticos. O clonazepam reverteu o TBARS em plasma e hipocampo. Não houve alteração significativa do TBARS no estriado.

b) Houve diminuição significativa do TAR no plasma e no córtex dos animais diabéticos. O clonazepam reverteu o TAR em plasma. Não houve alteração significativa do TAR em hipocampo e estriado.

c) A atividade da enzima antioxidante CAT nos eritrócitos não foi alterada significativamente em nenhum dos grupos de animais testados.

d) A atividade da enzima antioxidante SOD em eritrócitos não diferiu significativamente em nenhum dos grupos de animais testados.

e) Os animais diabéticos apresentaram maior imobilidade no ensaio de natação forçada em relação aos animais não diabéticos. O clonazepam exerceu efeito de diminuição significativa de imobilidade nos animais diabéticos e não diabéticos submetidos ao teste de natação forçada.

f) Não foi verificada correlação significativa entre a imobilidade dos animais testados e a medida do TBARS em plasma, hipocampo e córtex, nem mesmo entre a imobilidade e a medida de TAR em plasma.

Em conclusão, os resultados mostram que ocorre estresse oxidativo em animais diabéticos submetidos ao modelo de depressão tanto a nível periférico como central. Ainda, o clonazepam exerceu efeito protetor contra a lipoperoxidação em plasma e em hipocampo de animais diabéticos sob depressão, bem como aumentou a reatividade antioxidante total em plasma. Além disso, o clonazepam reverteu a imobilidade destes animais. Considerando sua conhecida ação ansiolítica e antidepressiva, sugere-se que o clonazepam possa ser uma alternativa no tratamento da depressão em pacientes diabéticos, com a vantagem de não alterar a glicemia e proteger contra ação dos radicais livres, que contribuem para o desenvolvimento das complicações secundárias do DM.



## REFERÊNCIAS

---

---



AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** V. 105, p. 121-126, 1984.

ANDREWS, T.C.; BALLANTYNE, C.M.; HSIA, J.A.; KRAMER, J.H. Achieving and maintaining national cholesterol education program low-density lipoprotein cholesterol goals with five statins. **American Journal of Medicine.** V. 111, n. 3, p. 185-191, 2001.

ARNSTEN, AF AND LI, B.M. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. **Biological Psychiatry.** V. 57, n. 11, p. 1377-1384, 2005.

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes.** V. 40, p. 405-412, 1991.

BELLUSH, L.L.; REID, S.G.; NORTH, D. The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. **Physiology & Behavior.** V. 50, p. 973-981, 1991.

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

BENEDETTI, F.; BERNASCONI, A.; PONTIGGIA, A. Depression and neurological disorders. **Current Opinion in Psychiatry.** V. 19, n. 1, p. 8-14, 2006.

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

BORSINI, F.; EVANGELISTA, S.; MELI, A. Effect of GABAergic drugs in the behavioral 'despair' test in rats. **European Journal of Pharmacology.** V. 21, n. 2, p. 265-268, 1986.

BORSINI, F.; MANCINELLI, A.; D'ARANO, V.; EVANGELISTA, S.; MELI, A. On the role of endogenous GABA in the forced swimming test in rats. **Pharmacology Biochemical Behaviour**. V. 29, n. 2, p. 275-279, 1988.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods of Enzimology**. V. 52, p. 302-309, 1978.

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

CERIELLO, A. Oxidative stress and diabetes-associated complications. **Endocrinology Practice**. V. 12, n. 1, p. 60-62, 2006.

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

CONVINGTON, E.C. Anticonvulsants for neuropathic pain and detoxification. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. V. 65, n. 1, p. 21-29, 1998.

COPPEN, A.J.; DOOGAN, D.P. Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. **Journal of Clinical Psychiatry**. V. 49, p. 4-11, 1988.

DE GROOT, M.; ANDERSON, R.; FREEDLAND, K.E.; CLOUSE, R.E.; LUSTMAN, P.J. Association of depression and diabetes complications: A meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**. V. 63, p. 619-630, 2001.

DEON, M.; WAJNER, M.; SIRTORI, L.R.; FITARELLI, D.; COELHO, D.M.; SITTA, A.; BARSCHAK, A.G.; FERREIRA, G.C.; HAESER, A.; GIUGLIANI, R.; VARGAS, C.R. The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**. V 247, p.157-164, 2006.

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

DUARTE, A.I.; SANTOS, M.S.; SEICA, R.; OLIVEIRA, C.R. Oxidative stress affects synaptosomal gamma-aminobutyric acid and glutamate transport in diabetic rats: the role of insulin. **Diabetes**. V. 53, n. 8, p. 2110-2116, 2004.

GAEDE, P.; POULSEN, H.E.; PARVING, H.H.; PEDERSEN, O. Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in Type 2 diabetic patients. **Diabetic Medicine**. V. 18, n. 9, p. 756-790, 2001.

GARY, T.L.; CRUM, R.M.; COOPER-PATRICK, L.; FORD, D.; BRANCATI, F.L. Depressive symptoms and metabolic control in African-Americans with type 2 diabetes. **Diabetes Care**. V. 23, n. 1, p. 23-29, 2000.

GAVARD, J.A.; LUSTMAN, P.J.; CLOUSE, R.E. Prevalence of depression in adults with diabetes. **Diabetes Care**. V. 16, p. 1167-1178, 1993.

GREENBLATT, D.J.; BLASKOVICH, P.D.; NUWAYSER, E.S.; HARMATZ, J.S.; CHEN, G.; ZINNY, M.A. Clonazepam pharmacokinetics: comparison of subcutaneous microsphere injection with multiple-dose oral administration. **Journal of Clinical Pharmacology**. V. 45, n. 11, p. 1288-1293, 2005.

GERNER, R.H. and HARE, T.A. CSF GABA in normal subjects and patients with depression, schizophrenia, mania, and anorexia nervosa. **American Journal of Psychiatry**. V. 138, n. 8, p. 1098-1101, 1981.

GOMEZ, R. and BARROS, H.M.T. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. **Pharmacological Biochemical Behavioural**. V. 66, p. 329-335, 2000.



GOMEZ, R.; HUBER, J.; TOMBINI, G.; BARROS, H.M. Acute effect of different antidepressants on glycemia in diabetic and non-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**. V. 34, n. 1, p. 57-64, 2001.

GOMEZ, R. and BARROS, H.M. Clonazepam increases *in vivo* striatal extracellular glucose in diabetic rats after glucose overload. **Pharmacology Biochemical Behaviour**. V. 76, n. 3, p. 443-450, 2003.

GOMEZ, R.; VARGAS, C.R.; WAJNER, M.; BARROS, H. M. Lower *in vivo* brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. **Brain Research**. V. 968, n. 2, p. 281-284, 2003.

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Radical and Biological Medicine**. V. 10, p. 93-100, 1991.

GRAEFF, F.G. **Drogas psicotrópicas e seu modo de ação**. 2<sup>a</sup>. ed. E.P.U.: São Paulo, 1990.

GUIDOTTI, A.; AUTA, J.; DAVIS, J.M.; DONG, E.; GRAYSON, D.R.; VELDIC, M.; ZHANG, X.; COSTA, E. GABAergic dysfunction in schizophrenia: new treatment strategies on the horizon. **Psychopharmacology**. V. 180, n. 2, p. 191-205, 2005.

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

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**. V. 344, p. 721-724, 1994.

HAIRE-JOSHU, D.; HEADY, S.; THOMAS, L.; SCHECHTMAN, FISHER, E.B. Depressive symptomatology and smoking among persons with diabetes. **Research in Nursing & Health**. V. 17, p. 273-282, 1994.

HASLER, G.; NEUMEISTER, A.; VAN DER VEEN, J. W.; TUMONIS T.; BAIN E.E.; SHEN J.; DREVETS W.C.; CHARNEY D.S. Normal prefrontal gamma-aminobutyric acid levels in remitted depressed subjects determined by proton magnetic resonance spectroscopy. **Biological Psychiatry**. V. 58, n.12, p.969-973, 2005.

HARDMAN, J. G.; GOODMAN GILMAN, A.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman & Gilman's: The pharmacological basic of therapeutics**. 9<sup>th</sup> ed.; McGraw-Hill: New York, 1996.

HENRY, J. B.; KNUDSON, P. E.; WEINSTOCK, R.S. Carbohydrate. *In*: Henry, J. B. (Ed.). **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 20<sup>th</sup>, W.B.Saunders: Philadelphia, 2001.

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

HYMAN, S.E.; NESTLER, E.J. **The molecular foundations of psychiatry**. American Psychiatric: Washington, 1993.

KENDEL, S.F.; KRYSTAL, J.H.; SAMACORA, G. GABA and glutamate systems as therapeutic targets in depression and mood disorders. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. V. 1, p. 153-168, 2005.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

IMAEDA, A.; AOKI, T.; KONDO, Y.; HORI, M.; OGATA, M.; OBAYASHI, H.; HASEGAWA, G.; NAKAMURA, N.; TOKUDA, K.; NISHINO, H.; YOSHIKAWA, T.; KONDO, M. Protective effects of fluvastatin against reactive oxygen species

induced DNA damage and mutagenesis. **Free Radical Research**. V. 34, n. 1, p. 33-44, 2001.

LAFER, B.; ALMEIDA, O.P.; FRAGUAS, R.; MIGUEL, E.C. **Depressão no Ciclo da Vida**. ARTMED, Porto Alegre, 2000.

LEEDOM, L.; MEEHAN, W.P.; PROCCI, W.; ZEIDLER, A. Symptoms of depression in patients with type II diabetes mellitus. **Psychosomatics**. V. 32, n. 3, p. 280-286, 1991.

LI, Z.G.; SIMA, A.A. C-peptide and central nervous system complication in diabetes. **Experimental Diabetes Research**. V. 5, n. 1, p. 79-90, 2004.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; CASTILLO, M.D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radical Research Communications**. V. 17, p. 299-311, 1992.

LLOYD, C.E.; MATTHEWS, K.A.; WING, R.R.; ORCHARD, T.J. Psychosocial factors and complications of IDDM. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study VIII. **Diabetes Care**. V. 15, n. 2, p. 166-173, 1992.

LOSCHER, SCHIRMER, M.; FREICHEL, C.; GERNERT, M. Distribution of GABAergic neurons in the striatum of amygdala-kindled rats: An immunohistochemical and in situ hybridization study. **Brain Research**. V. 1083, n. 1, p. 50-60, 2006.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.I.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. V. 193, p. 265-275, 1951.

LUSTMAN, P.J.; CLOUSE, R.E. Relationship of psychiatric illness to impotence in men with diabetes. **Diabetes Care**. V. 13, n. 8, p. 893-895, 1990.

LUSTMAN, P.J.; GRIFFITH, L.S.; GAVARD, J.A.; CLOUSE, R.E. Depression in adults with diabetes. **Diabetes Care**. V. 15, p. 1631-1639, 1992.

LUSTMAN, P.J.; GRIFFITH, L.S.; FREEDLAND, K.E.; CLOUSE, R.E. The course of major depression in diabetes. **General Hospital Psychiatry**. V. 19, p. 138-143, 1997.

MALERBI, D.A.; FRANCO, L.J. Multicenter study of the prevalence of diabetes *mellitus* and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**. V. 15, p. 1509-1516, 1992.

MCCALL, A.L. The impact of diabetes on the CNS. **Diabetes**. V. 41, p. 557-570, 1992.

MIYAOKA, Y.; MIYAOKA, H.; MOTOMIYA, T.; KITAMURA, S.; ASAI, M. Impact of sociodemographic and diabetes-related characteristics on depressive state among non-insulin-dependent diabetic patients. **Psychiatry Clinical Neuroscience**. V. 51, p. 203-206, 1997.

MORISHITA, S. Clonazepam as a therapeutic adjunct to improve the management of depression. **Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi**. V. 24, n. 2, p. 75-78, 2004.

NARDI, A.E.; PERNA, G. Clonazepam in the treatment of psychiatric disorders: an update. **International Clinical Psychopharmacology**. V. 21, n. 3, p. 131-142, 2006.

NISHIKAWA, Y.; EDELSTEIN, D.; D.U.; X.L.; YAMAGISHI, S.; MATSUMURAI, T.; KANEDA, Y.; YOREK, M.A.; BEEBE, D.; OATES, P.J.; HAMMES, H.P.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**. V. 404, p. 787-790, 2000.

ORANJE, W.A.; SELS, J.P.J.E.; RONDAS-COLBERS, G.J.W.M.; LEMMENS, P.J.M.R.; WOLFFENBUTTEL, B.H.R. Effect of atorvastatin on LDL oxidation and antioxidants in normocholesterolemic type 2 diabetic patients. **Clinica Chimica Acta**. V. 311, n. 2, p. 91-94, 2001.

OZCAN, M.E.; GULEC, M.; OZEROL, E.; POLAT, R.; AKYOL, O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **International Clinical Psychopharmacology**. V. 19, n. 2, p. 89-95, 2004.

PATSALOS, P.N. Properties of antiepileptic drugs in the treatment of idiopathic generalized epilepsies. **Epilepsia**. V. 46, n. 9, p. 140-148, 2005.

PASAOGLU, H.; SANCAK, B.; BUKAN, N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 Diabetes Mellitus. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**. V. 203, p. 211-218, 2004.

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

PEYROT, M.; RUBIN, R.R. Persistence of depressive symptoms in diabetic adults. **Diabetes Care**. V. 22, n. 3, p. 448-452, 1999.

PETTY, F. GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis. **Journal of Affect Disorders**. V. 34, p. 275-281, 1995.

POST, R.M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **American Journal of Psychiatry**. V. 149, p. 999-1010, 1992.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**. V. 266, p. 730-732, 1977.

POTTER, W.Z.; MANJI, H.K. Are monoamine metabolites in cerebrospinal fluid worth measuring. **Archives of General Psychiatry**. V. 49, p. 653-656, 1993.

PRICE, J.L. Free will versus survival: brain systems that underlie intrinsic constraints on behavior. **The Journal of Comparative Neurology**. V. 493, n. 1, p. 132-139, 2005.

PRYOR, W.A.; HOUK, K.N.; FOOTE, C.S. *et al.* Free Radical Biology and Medicine: It's a Gas, Man! **American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**. V. 291, n. 3, p. 491-511, 2006 .

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

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J. AND MONCADA, S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium interactions between prostacyclin and Nitric Oxide. **Brithish Journal of Pharmacology**. V. 92, n. 3, p. 639-646, 1987.

RAJTAR, G.; ZOLKOWSKA, D.; KLEINROK, Z. Effect of diazepam and clonazepam on the function of isolated rat platelet and neutrophil. **International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**. V. 8, n. 4, p. 137-144, 2002.

RATES, S. M. K. **Efeitos Comportamentais em Ratos Wistar de diferentes regimes de estresse relacionados com modelos animais de depressão**. Tese – Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997.

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

RHODEN, E.L.; PEREIRA-LIMA, L.; KALIL, A.N.; LUCAS, M.L.; MAURI, M.; MENTI, E.; RHODEN, C.R.; PEREIRA-LIMA, J.; ZETTLER, C.G.; BELLO-KLEIN, A. Effects of ischemia and reperfusion on oxidative stress in hepatic cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. **The Kobe Journal of Medical Sciences**. V. 46, n. 4, p. 171-180, 2000.

ROBBINS, T.W. Chemistry of the mind: neurochemical modulation of prefrontal cortical function. **Journal of Comparative Neurology**. V. 493, n. 1, p. 140-146, 2005.

ROY, A.; ROY, M. Depressive symptoms in African-Americans type 1 diabetics. **Depress Anxiety**. V. 13, p. 28-31, 2001.

ROZMAN, C. **Compêndio de Medicina Interna**. Manole: São Paulo, 1999.

RUDOLPH, U.; MOHLER, H. GABA-based therapeutic approaches: GABA<sub>A</sub> receptor subtype functions. **Current Opinion in Pharmacology**. V. 6, n. 1, p. 18-23, 2006.

SACKS, D.B. Glicídeos. *In*: Burtis, C.A., Ashwood, E. R. (Ed.). **Tietz Fundamentos de Química Clínica**. 4<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1998.

SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **American Journal of Psychiatry**. V. 122, p. 509-520, 1965.

SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**, 8<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill: New York, 2001.

SERRA, J. A.; MARSCHOFF, E. R.; DOMINGUEZ, R.; LUSTIG, E.S.; FAMULARI, A.L.; BARTOLOMÉ, E.L.; GUARESCHI, E.M. Comparison of the determination of superoxide dismutase and antioxidant capacity in neurological patients using two different procedures. **Clinica Chimica Acta**. V. 301, p. 87-102, 2000.

SHENG, M.; GREENBERG, M.E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**. V. 4, p. 477-485, 1990.

SALETU, A.; PARAPATICS, S.; SALETU, B.; ANDERER, P.; PRAUSE, W.; PUTZ, H.; ADELBAUER, J.; SALETU-ZYHLARZ, G.M. On the pharmacotherapy of sleep bruxism: placebo-controlled polysomnographic and psychometric studies with clonazepam. **Neuropsychobiology**. V. 51, n. 4, p. 214-222, 2005.

SARAFIDIS, P.A.; RUILOPE, L.M. Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, and Renal Injury: Mechanisms and Implications. **American Journal of Nephrology**. V. 26, n. 3, p. 232-244, 2006.

SCATTON, B.; LLOYD, K.G.; ZIVKOVIC, B. Fengabine, a novel antidepressant GABAergic agent. II. Effect on cerebral noradrenergic, serotonergic and GABAergic transmission in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V. 41, n. 1, p. 251-257, 1987.

SINDRUP, S.H.; JENSEN, T.S. Pharmacotherapy of trigeminal neuralgia. **The Clinical Journal of Pain**. V. 18, n. 1, p. 22-27, 2002.

SINET, P.M.; MICHELSON, A.M.; BAZIN, A.; LEJEUNE, J.; JEROME, H. Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. **Biochemical Biophysical Research Community**. V. 67, p. 910-915, 1975.

SIRTORI, L.R.; DUTRA-FILHO, C.S.; FITARELLI, D.; SITTA, A.; HAESER, A.; BARSCHAK, A.G.; WAJNER, M.; COELHO, D.M.; LLESUY, S.; BELLO-KLEIN, A.; GIUGLIANI, R.; DEON, M.; VARGAS, C.R. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. **Biochemical Biophysical Acta**. V. 1740, n. 1, p. 68-73, 2005.

SURANYI-CADOTTE, B.E.; DAM, T.V.; QUIRION, R. Antidepressant--anxiolytic interaction: decreased density of benzodiazepine receptors in rat brain following chronic administration of antidepressants. **European Journal of Pharmacology**. V. 106, n. 3, p. 673-675, 1984.



TÉLLEZ-ZENTERO, J.F.; CARDIEL, M.H. Risk factors associated whit depression in patients with type 2 diabetes mellitus. **Archives of Medical Research**. V. 33, p. 53-60, 2002.

VAN DER DOES, F.E.E.; DE NEELING, J.N.D.; SNOEK, F.J.; KOSTENSE, P.J.; GROOTENHUIS, P.A.; BOUTER, L.M.; HEINE, R.J. Symptoms and well-being in relation to glycemic control in type II diabetes. **Diabetes Care**. V. 19, n. 3, p. 204-210, 1996.

VELISEK, L.; MARES, P. Hippocampal afterdischarges in rats. Effects of antiepileptics. **Physiological Research**. V. 53, p. 453-461, 2004.

VIDIELLA, M.B.; LIAMBRICH, J.A.; CIRERA, J.M.; SOLER, M.C.T.; VILLEGAS, P.; PÉREZ DEL CAMPO, A.M. Ansiedad y depresión en pacientes diabéticos tipo II. **Atención Primaria**. V. 17, n. 1, p. 84-88, 1996.

VIEIRA, D.S.; NAFFAH-MAZACORATTI, M.G.; ZUKERMAN, E.; SENNE SOARES, C.A.; ALONSO, E.O.; FAULHABER, M.H.; CAVALHEIRO, E.A.; PERES, M.F. Cerebrospinal fluid GABA levels in chronic migraine with and without depression. **Brain Research**. V. 1090, n. 1, p. 197-201, 2006.

VON DRAS, D.D.; LICHTY, W. Correlates of depression in diabetic adults. **Behavioural Health Aging**. V. 1, p. 79-84, 1990.

VYAS, T.K.; BABBAR, A.K.; SHARMA, R.K.; SINGH, S.; MISRA, A. Intranasal mucoadhesive microemulsions of clonazepam: preliminary studies on brain targeting. **Journal of Pharmaceutic Sciences**. V. 95, n. 3, p. 570-580, 2006.

WEINMANN, A.R.M.; OLIVEIRA, M.S.; SALIM, J.M.; MARTINS, A.R. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of retinol by fluorometry and tocopherol by ultraviolet absorbance in the serum of newborns. **Journal of Chromatography**. V. 729, p. 231-236, 1999.

WRIGLEY, M.; MAYOU, R. Psychosocial factors and admission for poor glycemic control: a study of psychological and social factors in poorly controlled insulin dependent diabetic patients. **Journal of Psychosomatic Research**. V. 35, n. 2, p. 335-343, 1990.

WINOCOUR, P.H.; MAIN, C.J.; MEDLICOTT, G.; ANDERSON, D.G. A psychometric evaluation of adults patients with type I (insulin-dependent) diabetes *mellitus*: prevalence of psychological dysfunction and relationship to demographic variables, metabolic control and complications. **Diabetes Research**. V. 14, p. 171-176, 1990.

YAMAMOTO, A.; HOSHI, K.; ICHIHARA, K. Fluvastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation in rat liver microsomes. **European Journal of Pharmacology**. V. 361, n. 1, p. 143–149, 1998.

YATES, G.; PANKSEPP, J.; IKEMOTO, S.; NELSON, E.; CONNER, R. Social isolation effects on the “behavioral despair” forced swimming test: effect of the age and duration of testing. **Physiological Behaviour**. V. 49, p. 347-353, 1991.

YOSHIMOTO, T.; DOI, M.; FUKAI, N.; IZUMIYAMA, H.; WAGO, T.; MINAMI, I.; UCHIMURA, I.; HIRATA, Y. Type 1 diabetes *mellitus* and drug-resistant epilepsy: presence of high titer of anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies in serum and cerebrospinal fluid. **Internal medicine**. V. 44, n. 11, p. 1174-1177, 2005.

YIN, X.; ZHANG, Y.; YU, J.; ZHANG, P.; SHEN, J.; QIU, J.; WU, H.; ZHU, X. The Antioxidative Effects of Astragalus Saponin I Protect Against Development of Early Diabetic Nephropathy. **Journal of Pharmacological Sciences**. V. 101, n. 2, p. 166-173, 2006.