

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
BACHAREL EM BIOMEDICINA  
PAULA REGINA GELINSKI KEMPE

**Efeito do tratamento crônico com sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) sobre respostas comportamentais relacionadas com a depressão e ansiedade em ratos com o diabetes induzido por estreptozotocina**

Curitiba  
2016

PAULA REGINA GELINSKI KEMPE

**Efeito do tratamento crônico com sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) sobre respostas comportamentais relacionadas com a depressão e ansiedade em ratos com o diabetes induzido por estreptozotocina.**

Trabalho de Conclusão de Curso II (Projeto de Trabalho) apresentado à Universidade Federal do Paraná – UFPR, Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas, como requisito parcial da obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janaina Menezes Zanoveli

Curitiba

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado força e saúde para superar as dificuldades, por todas as oportunidades e por tudo que aprendi. Por me guiar pelo caminho que fosse o mais correto e proveitoso para mim.

Agradeço a minha mãe, Maria Gelinski, que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis e que sempre acreditou que eu conseguiria chegar onde eu quisesse. Você é minha maior inspiração. Muito obrigada!

Agradeço a Universidade Federal do Paraná e a todos os professores, pelo empenho dedicado em me ensinar sobre ciência e sobre valores da vida. Vocês têm meus eternos agradecimentos.

A minha orientadora, Janaína Zanoveli, que me recebeu de braços abertos e me orientou de forma paciente e amiga e que me ajudou a desenvolver minhas habilidades. Muito obrigada!

A minhas colegas de laboratório, Helen de Moraes, Mariana Machado e Ana Paula Farias, companheiras de trabalho que me ajudaram nos experimentos e a ter momentos de descontração. Muito obrigada!

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu sincero muito obrigada!

## RESUMO

O diabetes *mellitus* é uma doença metabólica crônica que pode ser agravada pela ocorrência de transtornos psiquiátricos como a ansiedade e a depressão. Estudos discutem uma relação bidirecional entre essas doenças, no qual o diabetes pode precipitar o surgimento de ansiedade e depressão; e a ansiedade e depressão podem precipitar o surgimento do diabetes. No entanto o mecanismo fisiopatológico da depressão e ansiedade associadas ao diabetes ainda não é esclarecido. Uma das hipóteses sugere que uma hiperexcitação via ativação de receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) no hipocampo possa estar envolvida. Sabe-se também que uma deficiência do mineral essencial magnésio ( $Mg^{2+}$ ), comumente conhecido por antagonizar o receptor NMDA está relacionada ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas como diabetes, depressão e ansiedade. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento prolongado com o sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) sobre respostas comportamentais de ansiedade e depressão em ratos diabéticos. Para tanto, o diabetes tipo I foi induzido por estreptozotocina (STZ; 60 mg/Kg; i.p.) no início do experimento e um grupo de animais normoglicêmicos (NGL) foi conduzido em paralelo a fim de ter um grupo controle do diabetes. O tratamento com  $MgSO_4$  (0, 5, 15, 30, 90, 180 mg/Kg; i.p.) ou fluoxetina (FLX; 10 mg/Kg; i.p.), usada como um controle positivo no tratamento da ansiedade/depressão foi iniciado 7 dias após a diabetização e perdurou por 21 dias. No dia dos testes, os tratamentos foram realizados 1 hora antes da realização dos mesmos. No 21º dia foram realizados os testes de ansiedade (Labirinto em cruz elevado/Teste de transição claro/escuro) e no 22º dia foi realizado o pré-teste do teste de natação forçada (depressão), sendo que no 23º dia o teste propriamente dito foi realizado seguido pelo teste do campo aberto (atividade locomotora). Os resultados encontrados nesse estudo indicam que a suplementação com magnésio levou a melhoras na ansiedade, mas não na depressão, relacionados com o diabetes tipo I. Acreditamos que mesmo possuindo efeitos neuroprotetores, o magnésio não foi capaz de induzir melhoras na depressão devido a complexidade dessa doença, principalmente quando associada ao diabetes. Ainda, não observamos melhoras na glicose sanguínea. Porém, acreditamos que com um período de tratamento maior com magnésio possam haver melhoras nesses parâmetros metabólicos e psico-comportamentais.

**Palavras chaves:** diabetes, depressão, ansiedade, sulfato de magnésio

## ABSTRACT

Diabetes *mellitus* is a chronic metabolic disease that can be aggravated by the occurrence of psychiatric disorders such as anxiety and depression. Studies discuss a bidirectional relationship between these diseases, in which diabetes may precipitate the onset of anxiety and depression; and anxiety and depression may precipitate the onset of diabetes. However, the pathophysiological mechanism of depression and anxiety associated with diabetes is still unclear. One hypothesis suggests that hyperexcitation via activation of glutamatergic receptors of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) in the hippocampus may be involved. It is also known that a deficiency of the essential magnesium mineral ( $Mg^{2+}$ ), commonly known to antagonize the NMDA receptor, is related to the development of various chronic diseases such as diabetes, depression and anxiety. Thus, the goal of this study is to evaluate the effects of prolonged treatment with magnesium sulfate ( $MgSO_4$ ) on behavioral anxiety and depression responses in diabetic rats. To do so, all animals were streptozotocin-induced type I diabetes (STZ, 60 mg/kg, ip) at the start of the experiment and a group of normoglycemic animals (NGL) were conducted in parallel in order to have a diabetes control group. Treatment with  $MgSO_4$  (0, 5, 15, 30, 90, 180 mg/Kg; ip) or fluoxetine (FLX; 10 mg/Kg; ip), used as a control treatment for anxiety/depression, started 7 days after diabetes induction and lasted for 21 days. On the day of the tests, treatments were performed 1 hour before the tests. On the 21<sup>st</sup> day, the anxiety tests were performed (Plus maze test/light-dark transition test) and on the 22<sup>nd</sup> day was performed the pre-test of the forced swimming test (depression), and on the 23<sup>rd</sup> day the test properly said was performed following the open field test (locomotor activity). The results found in this study indicate that magnesium supplementation led to improvements in anxiety, but not depression, related to type I diabetes. We believe that even with neuroprotective effects, magnesium was not able to induce improvements in depression due to the complexity of this disease, especially when associated with diabetes. Still, we did not observed improvements in blood glucose levels. However, we believe that with a longer treatment period with magnesium there may be improvements in these metabolic and psycho-behavioral parameters.

**Key words:** diabetes, depression, anxiety, magnesium sulfate

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 3-HK – 3-Hidroxiquinurenina  
5-HT – Neurotransmissor serotonina  
CA – Teste do Campo Aberto  
DBT – Diabético  
DM – Diabetes *Mellitus*  
DMI – Diabetes *Mellitus* tipo I  
DM – Diabetes *Mellitus* tipo II  
FLX – Fluoxetina  
IDO – Indoleamina-2,3-dioxigenase  
KA – Ácido quinurênico  
LCE – Teste do Labirinto em Cruz Elevado  
Mg – Magnésio  
MgSO<sub>4</sub> – Sulfato de magnésio  
NGL – Normoglicêmico  
NMDA – Receptor N-metil-D-aspartato  
QA – Ácido quinolínico  
SAL – Salina  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SSRI – Inibidor seletivo da recaptação da serotonina  
STZ – Estreptozotocina  
TCA – Antidepressivo tricíclico  
TCE – Teste Claro-Escuro  
TNFm – Teste da Natação Forçada modificado  
TRYCATs – Catabólitos do triptofano

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	12
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1.1.1. Animais.....	14
1.1.2. Testes Comportamentais.....	15
5. RESULTADOS.....	17
6. DISCUSSÃO.....	22
7. REFERÊNCIAS.....	25

## INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica que pode ser resultado de defeitos da secreção e/ou ação da insulina (Piryaei et al., 2015), resultando em deficiência relativa ou absoluta desse hormônio (Wayhs et al., 2010). O DM pode ser classificado em Tipo I (DMI), que corresponde a 10% dos casos e é decorrente da destruição das células  $\beta$  pancreáticas, ocasionando uma deficiência de insulina, e Tipo II (DMII), que corresponde a 90% dos casos e é decorrente da baixa secreção ou ação da insulina devido a disfunção das células  $\beta$  pancreáticas (Bhansali et al., 2015) e, ainda, diabetes *mellitus* gestacional (Associação Americana de Diabetes, 2007) e outros tipos, que podem ter origem genética, por doenças infecciosas ou pelo uso de algumas drogas como glucocorticóides (Associação Americana de Diabetes, 2014).

Sabe-se que além da doença em si existem muitas outras complicações associadas. Dentre essas se destaca a neuropatia diabética (Tesfaye et al., 2013), nefropatia, retinopatia, doenças cardiovasculares (Bertoluci et al., 2008; Pereira et al., 2009; Jazi et al., 2016) e psicopatologias (Moulton et al., 2015; Zanolveli et al., 2015; Buchberger et al., 2016). De particular interesse para este estudo, dentre as psicopatologias o diabetes tem sido bastante associado com a depressão (Moulton et al., 2015; Zanolveli et al., 2015) e ansiedade (Buchberger et al., 2016).

Sabe-se que a depressão/ansiedade são condições que agravam ainda mais a própria condição diabética aumentando a morbidade e mortalidade (Talbot et al., 2000; Musselman et al., 2003). Uma análise longitudinal de 10 anos identificou a depressão e a ansiedade como as duas principais comorbidades do diabetes (Buchberger et al., 2016). Mais ainda, estudos sugerem que o risco é de 15 a 20% maior de pacientes diabéticos desenvolverem depressão (Talbot et al., 2000; Anderson et al., 2001) e de 32% de desenvolverem ansiedade (Buchberger et al., 2016) em relação à população não diabética.

### **Diabetes e Psicopatologias**

Atualmente tem sido discutida a existência de uma relação bidirecional entre diabetes e depressão/ansiedade. Essa relação pode ser observada em estudos neuropsicológicos e de neuroimagem, uma vez que déficits neurocognitivos são perceptíveis nessas três doenças (McIntyre et al., 2007). Mais ainda, foi demonstrado que o diabetes induzido experimentalmente em animais leva a um comportamento do tipo depressivo e ansioso mais expressivo comparado a animais normoglicêmicos (Wayhs et al., 2010, 2013; de Moraes et al.,

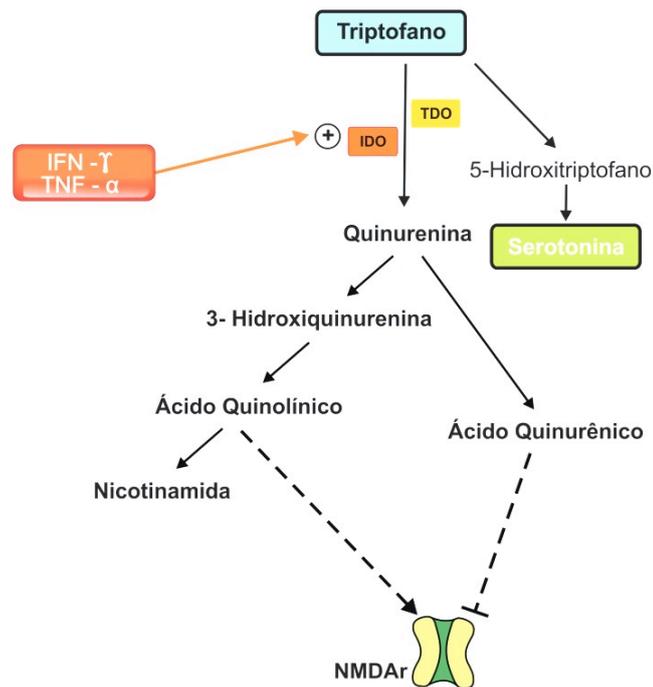
2014; Gambeta et al., 2015), assim como também leva a danos na neurogênese hipocampal (Wang et al., 2009), sugerindo que o diabetes e tais psicopatologias compartilham mecanismos neurobiológicos comuns.

Uma das hipóteses propostas dos mecanismos patofisiológicos sugere que a desregulação do sistema imune seja a causa da relação entre diabetes e essas psicopatologias, uma vez que nessas condições patológicas ocorre aumento de proteína C-reativa e de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  no plasma e hipocampo (Pickup et al., 1998; Lutgendorf et al., 1999; Pradhan et al., 2001; Kiecolt-Glaser et al., 2002; da Silva Dias et al., 2016). Nesse contexto, cabe ressaltar o papel da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), que é ativada por tais citocinas pró-inflamatórias (Dantzer, 2009; Maes et al., 2011a) e que desvia a via metabólica do aminoácido triptofano para a “via das quinureninas” (Maes et al., 2011a).

A degradação do triptofano pela “via das quinureninas” tem grande importância neuropsiquiátrica, pois a degradação desse aminoácido implica na produção de substâncias neurotóxicas, como os catabólitos do triptofano (TRYCATs), que podem atuar como pró- ou antioxidante, neurotóxico ou neuroprotetor, pode induzir a apoptose, ser ansiogênico e depressivo (Mackay et al., 2006). O primeiro TRYCAT que aparece na cascata enzimática da IDO é a quinurenina, que posteriormente é degradada em 3-hidroxiquinurenina (3-HK), ácido quinolínico (QA) e ácido quinurênico (KA) (Dantzer, 2009; Maes, 2011a, 2011b), sendo o KA um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) com atividade antioxidante (Goda et al., 1999), o QA um agonista do receptor NMDA e potente toxina (Santamaría et al., 2001), e a 3-HK um gerador intenso de espécies reativas de oxigênio causando estresse oxidativo (Goldstein et al., 2000) (FIGURA 1).

Ainda, por desviar a via metabólica do triptofano, a IDO leva a uma diminuição da produção do neurotransmissor serotonina (5-HT), comprometendo o sistema serotoninérgico que é fundamental no controle das emoções. Interessante que diversos trabalhos demonstraram que em pacientes depressivos os níveis desse aminoácido estão diminuídos, seja na forma livre no plasma, total ou a relação triptofano/outras aminoácidos (Maes et al., 1991b). Assim, ressaltando ainda mais a importância deste sistema no controle das emoções, na clínica, drogas que aumentam a disponibilidade de serotonina - como os antidepressivos inibidores seletivos da recaptção da serotonina (SSRIs), são os de primeira linha no tratamento da depressão e da ansiedade (Owens e Nemeroff, 1994; Joca et al., 2003). Também em estudos pré-clínicos tem sido observado que drogas que aumentam os níveis de 5-HT ou melhoram sua atividade, diminuíram o comportamento do tipo depressivo e de

ansiedade do tipo pânico em animais (Zanoveli et al., 2007; Du et al., 2014; Qiu et al., 2014). No trabalho de André e colegas (2012), foi observada uma forte relação entre ativação da IDO e expressão de citocinas pró-inflamatórias no cérebro com o comportamento de ansiedade. Ainda, uma indução de alterações emocionais, como depressão e ansiedade foram atribuídas ao fato de ocorrer um aumento de citocinas pró-inflamatórias e da ativação da IDO no córtex pré-frontal e hipocampo em modelo inflamatório de indução de doença de Alzheimer (Souza et al., 2016).



**FIGURA 1.** Esquema da “via das quinureninas”. Adaptado de Dantzer et al., 2008.

Interessante que essa desregulação de neurotransmissores no Sistema Nervoso Central (SNC) também é observada na condição diabética (Abraham et al., 2010; Gupta et al., 2014; da Silva Dias et al., 2016). Pacientes diabéticos apresentaram a mesma redução nos níveis plasmáticos de triptofano da mesma forma que pacientes depressivos (Maes et al., 1991b; Manjarrez et al., 2006). Mais ainda, estudos conduzidos no nosso laboratório mostraram que animais diabéticos apresentaram diminuição no comportamento do tipo depressivo e nos níveis de 5-HT quando comparados a ratos normoglicêmicos, aumento da expressão da IDO e de citocinas em áreas como o hipocampo (da Silva Dias et al., 2016). Essas evidências sugerem que há a necessidade de terapias que sejam capazes de aumentar a disponibilidade de 5-HT além de causar efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores.

## **Magnésio**

Nesse sentido, vale destacar o magnésio (Mg), mineral essencial para o organismo humano, uma vez que atua como cofator de uma grande variedade de reações metabólicas (Eby et al., 2010). Este mineral é crucial para processos metabólicos que requerem energia, como síntese protéica, secreção hormonal e metabolismo intermediário (Laires et al., 2004). Além disso, participa de processos de óxido-redução metabólica e regulação iônica no cérebro (Eby et al., 2010) e tem um papel essencial na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios (Anetor et al., 2002).

No SNC, o Mg interage com os sistemas serotoninérgicos, adrenérgicos e dopaminérgicos, uma vez que atua alostericamente em alguns receptores desses sistemas (Kantak, 1988; Serefko et al., 2013) e é comumente conhecido por antagonizar o receptor NMDA através do bloqueio do poro do canal iônico (Serefko et al., 2013; Wlaz et al., 2015). Os receptores NMDA são encontrados em maior quantidade nas regiões corticais e límbicas, o que leva aos seus efeitos na cognição, percepção e emoção (Krystal et al., 1999). Quando há uma deficiência de Mg, o receptor NMDA fica mais susceptível a ativação, ocorrendo maior influxo de  $Ca^{2+}$  do que o necessário, o que leva à geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em níveis tóxicos (Carafoli, 2005) implicando na morte neuronal (Eby et al., 2010). Esse influxo de cálcio ativa ainda a liberação do neurotransmissor glutamato, exacerbando os efeitos tóxicos (Serefko et al., 2013).

Diversos estudos demonstram que deficiência de Mg induzida experimentalmente leva a um comportamento do tipo depressivo (Muroyama et al., 2009; Whittle et al., 2011) e ansiogênico (Laarakker et al., 2011) em roedores. Porém, quando esses animais são tratados com antidepressivos ou com suplementação de Mg, o tempo de imobilidade no teste de natação forçada diminui (Poleszak et al. 2004, 2007; Whittle et al., 2011), demonstrando um potencial antidepressivo desse íon. Animais suplementados com Mg também tiveram seus sintomas relacionados com ansiedade diminuídos (Poleszak et al., 2004, 2005). Ainda, administração de sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) em ratos submetidos a danos cerebrais diminuiu significativamente a incidência e severidade de depressão e ansiedade pós-traumática (Fromm et al., 2004).

Deficiência de magnésio tem sido apontada também como um possível fator para o desenvolvimento do diabetes (Djurhuus et al., 1999; Laires et al., 2004), tendo sido descrita em 30% de pacientes com DMI (Djurhuus et al., 1999). A deficiência desse íon é frequentemente associada com mudanças na homeostase do metabolismo de carboidratos (Gueux e Rayssiguier, 1983), sendo essencial para a ativação de algumas enzimas fosfato-

dependente nas células  $\beta$ -pancreáticas, assim como para a transcrição nuclear de fatores protéicos que são necessários para a liberação de insulina (Sales et al., 2011). Ainda, a função da insulina é dependente do Mg uma vez que este mineral é responsável pela ativação da subunidade  $\beta$  do domínio tirosina-quinase do receptor da insulina, e pela estimulação de proteínas e substratos da cascata de sinalização da insulina (Takaya et al., 2004; Sales et al., 2011). Corroborando a importância do Mg na condição diabética *per se*, diversos estudos demonstraram que os níveis de Mg estão diminuídos em roedores após indução do diabetes (Soltani et al. 2005a, 2005b, 2007), sendo que a administração oral desse mineral normalizou parcialmente os níveis de glicose no plasma desses animais, sugerindo que há um papel modulatório do Mg na homeostase da glicose sanguínea. No entanto, um possível efeito antidepressivo e ansiolítico do Mg, bem como os mecanismos moleculares e metabólicos envolvidos em animais diabéticos ainda não foram elucidados.

De acordo com o exposto acima, torna-se necessário investigar o potencial terapêutico do Mg no tratamento de psicopatologias como ansiedade/depressão associadas ao diabetes. Mais ainda, o potencial do Mg no controle da glicemia sanguínea.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Gerais**

Investigar em ratos com o diabetes induzido por estreptozotocina os efeitos do tratamento crônico com  $MgSO_4$  sobre respostas comportamentais relacionadas com a ansiedade e depressão.

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito do tratamento crônico com  $MgSO_4$  (curva dose-resposta; 0, 5, 15, 30, 90, 180 mg/Kg) em animais diabéticos sobre as respostas comportamentais relacionadas com ansiedade nos testes de Transição Claro-Escuro e do Labirinto em Cruz Elevado.
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com  $MgSO_4$  (curva dose-resposta; 0, 5, 15, 30, 90, 180 mg/Kg) em animais diabéticos sobre as respostas comportamentais relacionadas com depressão no teste da Natação Forçada Modificada.

- Avaliar o efeito do tratamento prolongado com  $MgSO_4$  (curva dose-resposta; 0, 5, 15, 30, 90, 180 mg/Kg) em animais diabéticos sobre as respostas locomotoras no teste do Campo Aberto.

## **JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

Estima-se que atualmente cerca de 387 milhões de pessoas no mundo vivem com diabetes, número que cresce a cada ano (estima-se que este número alcance 590 milhões de pessoas em 2035) (International Diabetes Federation, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Brasil teve 4,6 milhões de diabéticos em 2000 e espera-se que esse número cresça para 11,3 milhões em 2030 (Wild et al., 2004). Os transtornos de ansiedade e de humor como a depressão, além de possuírem uma maior prevalência no diabetes quando comparados aos indivíduos não diabéticos, aumentam a morbidade da doença causando prejuízos significativos para o indivíduo e para a sociedade. Embora existam terapias e drogas disponíveis para o tratamento da depressão e da ansiedade em pacientes diabéticos, como a Terapia Cognitiva-Comportamental, antidepressivos tricíclicos (TCAs) e SSRIs, muitos desses pacientes não atingem uma resposta satisfatória, sendo de 43% o potencial terapêutico para os TCAs e de 52% para os SSRIs (Lustman e Clouse, 2002), o que pode levar ao abandono do tratamento. Além dessas características supracitadas, há relatos de alteração na glicemia de pacientes diabéticos tratados com antidepressivos, podendo agravar ainda mais o controle da glicemia. Esses dados ressaltam a necessidade de novos alvos farmacológicos para melhorar a eficiência do tratamento da depressão/ansiedade em pacientes diabéticos. Sabe-se que antagonistas do receptor glutamatérgico do tipo NMDA, como o íon magnésio, apresentam efeitos benéficos tanto no tratamento da condição diabética, como da depressão/ansiedade associada a esta condição. Mais ainda, estudos apontam que uma deficiência de magnésio induzida experimentalmente leva a um comportamento do tipo depressivo em roedores o qual pode ser revertido com a suplementação de tal mineral, demonstrando a importância deste mineral no controle de respostas comportamentais relacionadas com a emoção. Todavia, até o presente momento nenhum estudo investigou os efeitos comportamentais relacionados com depressão e ansiedade em ratos diabéticos tratados com sulfato de magnésio, o que justifica a importância e necessidade do presente estudo.

## MATERIAL E MÉTODO

### Animais

A metodologia apresentada neste projeto foi aprovada pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR - nº 964). Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* pesando entre 180 - 220 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Estes animais foram mantidos em condições controladas de iluminação, com água e alimentação (ração Nuvilab CR<sub>1</sub> – Nuvital Nutrientes S/A) *ad libitum*. Foram mantidos quatro ratos por caixa (60x25x15 cm), com a maravalha trocada diariamente devido a poliúria induzida pela condição diabética.

### Indução do Diabetes Tipo I e delineamento experimental

Os animais foram divididos em normoglicêmicos (NGL) e diabéticos (DBT), sendo o diabetes induzido por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ (Sigma); 60 mg/Kg; diluída em tampão citrato, 10mM, pH 4.5), droga utilizada para mimetizar o diabetes tipo I, em ratos submetidos a jejum de 12 horas. Após o procedimento de indução, os animais foram mantidos ainda em jejum por 1 hora a fim de evitar a competição da STZ com a glucose pelo receptor GLUT-2 na célula  $\beta$ -pancreática (Szkudelski, 2001). A condição diabética foi confirmada 3 dias após o tratamento com STZ por meio da aplicação de 5  $\mu$ L de sangue da veia caudal à fitas de teste impregnadas com glucose oxidase (Accu-Check Active<sup>TM</sup>, Roche). 28 dias após a indução com STZ, a condição diabética foi reconfirmada afim de verificar se não houve reversão do quadro diabético. Animais normoglicêmicos receberam somente tampão citrato (10 mM, pH 4.5, volume equivalente). Apenas ratos com níveis de glucose no sangue  $\geq$  250 mg/dL foram considerados diabéticos e mantidos no estudo (de Moraes et al., 2014).

É importante citar que tal modelo foi escolhido devido ao fato de a STZ ser transportada para o interior das células  $\beta$  pancreáticas através do transportador GLUT-2, o qual não está presente na barreira hematoencefálica (Kumagai et al., 1999). Dessa forma, a possibilidade de a STZ causar danos diretos no SNC pode ser excluída, sendo esses efeitos comportamentais atribuídos somente à condição metabólica da hiperglicemia causada pelo indução diabética com STZ.

Após 4 dias da confirmação do diabetes, o tratamento com MgSO<sub>4</sub> (5, 15, 30, 90, 180 mg/Kg; i.p), fluoxetina (FLX; Daforin; 10 mg/kg; i.p.) ou veículo (salina) foi iniciado e



compartimento para o outro: um desses compartimentos é pintado de preto, não iluminado; e o outro é pintado de branco e iluminado a 50 lux. Durante o teste, os ratos foram colocados com a face voltada para a porta que separa os dois compartimentos no lado claro. Após a primeira transição para o compartimento escuro da caixa, o comportamento do animal foi registrado por um período adicional de 5 minutos. Todos os testes foram gravados e analisados após os experimentos através do uso de uma câmera. Foram quantificados o tempo total gasto no compartimento claro e o número de transições entre os dois compartimentos. Após cada animal testado, a caixa claro-escuro foi limpada com uma solução de etanol a 10%.

**Teste do Labirinto em Cruz Elevado:** O teste foi realizado em um aparato de madeira, elevado a 50 cm do chão, o qual apresenta 4 braços, sendo 2 abertos e 2 fechados apresentando no cruzamento entre os braços uma área central de 10 cm<sup>2</sup> seguindo o protocolo descrito por Pellow (1985). Para a realização desse teste, os animais foram colocados individualmente no centro do aparato por 5 minutos. Todos os testes foram gravados e analisados após os experimentos através do uso de uma câmera. Foram avaliados o tempo em que cada animal permaneceu nos braços abertos, bem como, o número de entradas nos mesmos, sendo considerada entrada quando o animal ultrapassasse com as 4 patas as delimitações de cada braço. Foram avaliados também o tempo gasto na porção final dos braços abertos e a frequência de afundamentos da cabeça. Após cada animal ser testado, o aparato foi limpado com uma solução de etanol a 10%.

**Teste de Natação Forçada modificado:** O teste de natação forçada foi originalmente descrito por Porsolt e colaboradores (1977) e modificado por Detke (1995). Resumidamente, o teste foi conduzido em 2 sessões. Durante o pré-teste os animais foram colocados em um cilindro de plástico opaco (20x20x40 cm) contendo água a uma profundidade de 30 cm e uma temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 min. Após 24 horas, os animais foram submetidos a uma sessão de teste por 5 min. A sessão de teste foi gravada por uma câmera posicionada acima do cilindro para posterior análise. Ao final de cada período de 5 segundos, a frequência de comportamento ativo (natação e escalada) e passivo (imobilidade) foram quantificados (Detke et al., 1995; Cryan et al., 2005). Imobilidade é caracterizada pela execução de movimentos necessários apenas para manter a cabeça acima da água, levando a flutuação do animal dentro do cilindro de água, demonstrando um movimento passivo. Natação é determinado por movimentos além dos necessários para manter a cabeça acima da água; por exemplo: se mover pelo aparato. Ainda, escalada foi quantificada quando os animais demonstraram

movimentos ativos com as patas dianteiras, dentro ou fora do cilindro de água, geralmente direcionado contra as paredes verticalmente (Detke et al., 1995). Após cada sessão (pré-teste ou sessão teste), os animais foram secados com uma toalha e devolvidos as suas respectivas caixas. Os cilindros foram lavados e preparados para o próximo animal.

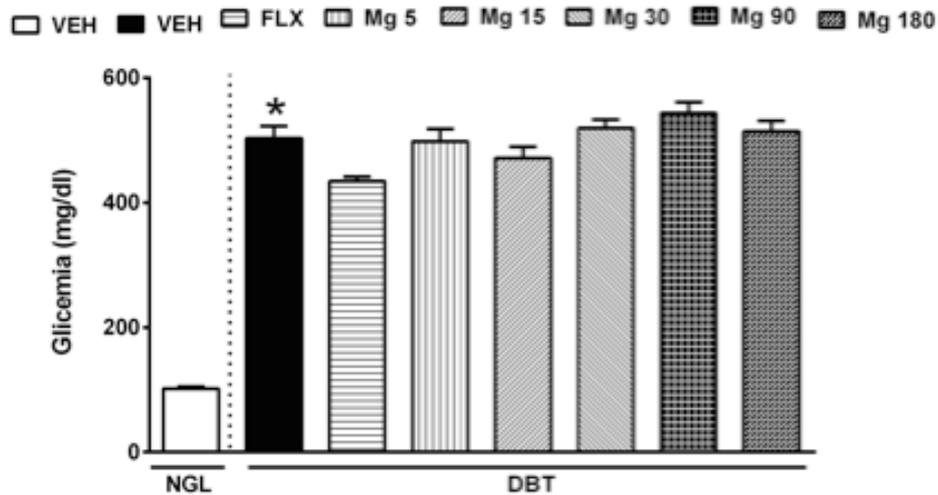
### **Análise estatística**

Os dados paramétricos foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados comportamentais foram analisados pela análise de variância de uma via (one-way-ANOVA) para comparação dos animais DBT-VEH e NGL-VEH seguida pelo teste post hoc de Newman-Keuls para os animais diabéticos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0.05$ .

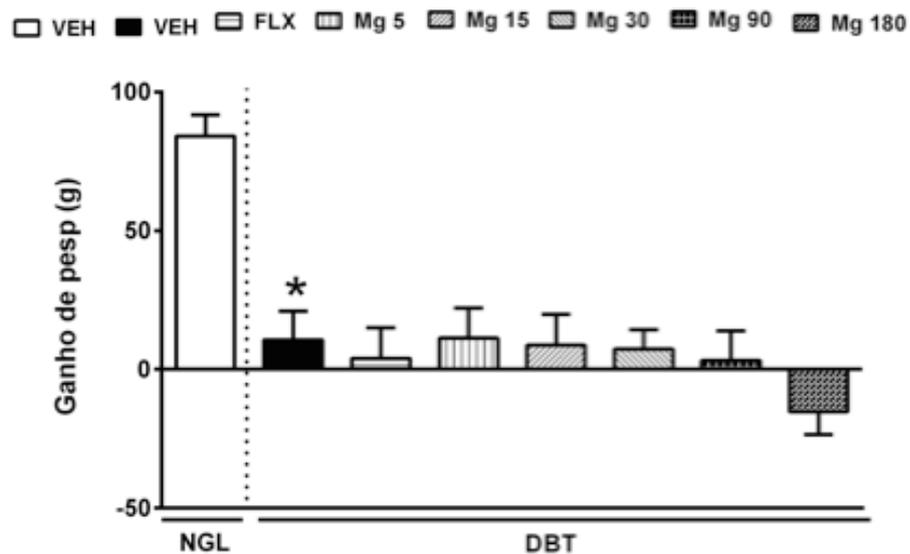
## **RESULTADOS**

### **Efeito do tratamento com sulfato de magnésio sobre a glicemia e massa corporal**

O teste *t* de Student mostrou que animais diabéticos tratados com veículo possuem um aumento significativo da glicemia (FIGURA 3;  $p < 0,05$ ) e redução do ganho de peso (FIGURA 4;  $p < 0,05$ ) quando comparados aos animais normoglicêmicos. Entre os animais que foram tratados com o sulfato de magnésio, a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls mostrou que não houve diferença significativa em nenhuma das doses empregadas ou de fluoxetina, em comparação aos diabéticos tratados com veículo para glicemia (FIGURA 3;  $p < 0,05$ ) ou massa corporal (FIGURA 4;  $p < 0,05$ ). Mais ainda, na dose de 180 mg/kg de  $MgSO_4$  o tratamento com sulfato de magnésio levou a uma diminuição do peso bastante acentuada.



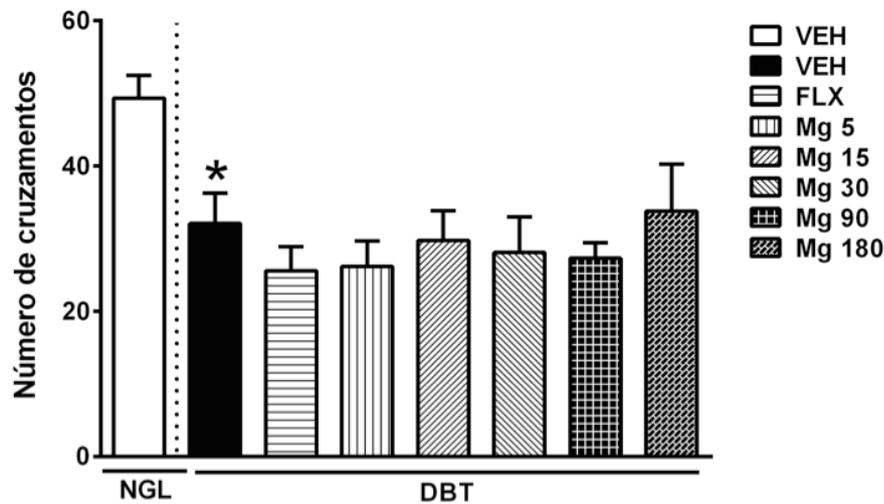
**FIGURA 3.** Efeito do tratamento prolongado com sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) (Mg 5, 15, 30, 90 e 180 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais diabéticos (DBT) sobre a glicemia. Valores estão representados em média  $\pm$  EPM; n= 10 – 12; \* $p < 0.05$  comparado ao grupo NGL-VEH.



**FIGURA 4.** Efeito do tratamento prolongado com sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) (Mg 5, 15, 30, 90 e 180 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais diabéticos (DBT) sobre o ganho de peso. Valores estão representados em média  $\pm$  EPM; n= 10 – 12; \* $p < 0.05$  comparado ao grupo NGL-VEH.

### Efeito do tratamento com sulfato de magnésio sobre a locomoção

O resultado do número de cruzamentos (FIGURA 5) no teste *t* de Student mostrou que animais diabéticos tratados com veículo possuem uma redução na frequência de cruzamentos ( $p < 0,05$ ), porém entre os animais que foram tratados com o sulfato de magnésio, a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls não mostrou diferença significativa em nenhuma das dose, sendo o mesmo observado no tratamento com fluoxetina.



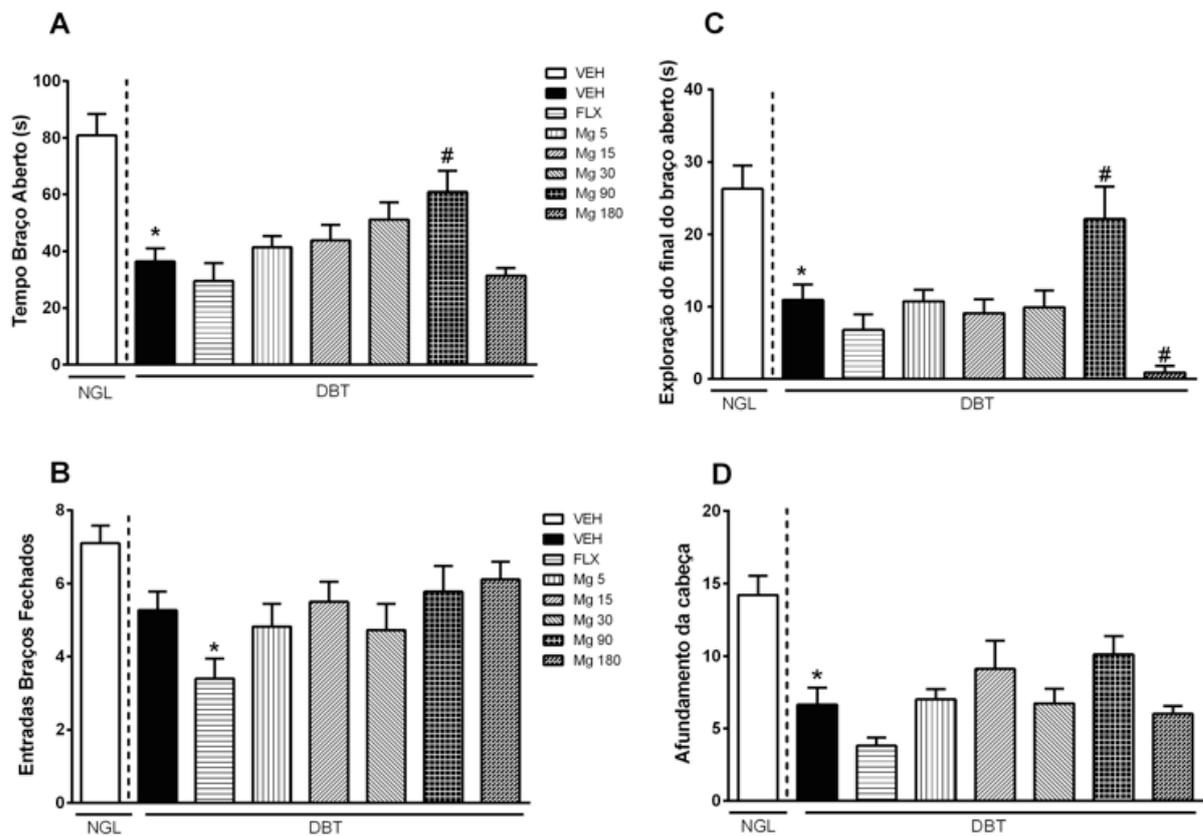
**FIGURA 5.** Efeito do tratamento prolongado com sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) (Mg 5, 15, 30, 90 e 180 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais diabéticos (DBT) sobre a frequência de cruzamentos dos quadrantes do aparato do teste de campo aberto. Valores estão representados em média  $\pm$  EPM; n= 10 – 12; \* $p < 0.05$  comparado ao NGL-VEH.

### **Efeito do tratamento com sulfato de magnésio sobre o comportamento do tipo ansioso no Teste do Labirinto em Cruz Elevado**

Os parâmetros avaliados no teste do labirinto em cruz elevado foram os seguintes: tempo de permanência nos braços abertos, tempo que o animal passa explorando a porção final dos mesmos e o número de afundamentos da cabeça, sendo todos parâmetros de comportamento do tipo ansiolítico; já o número de entradas nos braços fechados é um parâmetro de comportamento do tipo ansiogênico.

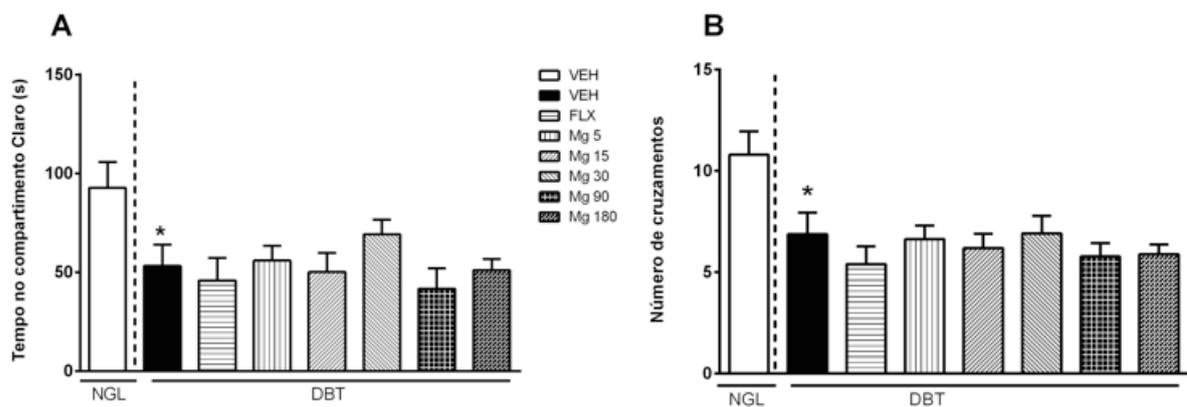
O teste *t* de Student mostrou que animais diabéticos tratados com veículo possuem uma diminuição significativa de tempo de permanência nos braços abertos quando comparados aos animais normoglicêmicos (FIGURA 6A;  $p < 0,05$ ). Entre os animais que foram tratados com o sulfato de magnésio, a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls mostrou que apenas na dose de 90 mg/kg observou-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) tanto no tempo de permanência nos braços abertos (FIGURA 6A) como no tempo de exploração da porção final dos mesmos (FIGURA 6C). Já nos animais que foram tratados com a fluoxetina não se observou uma diferença significativa no tempo de permanência nos braços abertos em comparação ao grupo DBT-VEH. No número de entradas nos braços fechados (FIGURA 6B) somente o grupo tratado com FLX apresentou uma diminuição significativa no número de entradas nos braços fechados. As análises estatísticas

demonstraram que os animais DBT-VEH apresentaram menor tempo de exploração no fim do braço aberto (FIGURA 6C;  $p<0,05$ ) e menor frequência de afundamento da cabeça no braço aberto (FIGURA 6D;  $p<0,05$ ) quando comparados aos animais NGL-VEH. Já nos animais diabéticos que receberam tratamento, apenas o grupo tratado com a dose de 90 mg/kg de sulfato de magnésio obteve um aumento significativo no tempo de exploração no fim do braço aberto ( $p<0,05$ ), mas não na frequência de afundamento da cabeça ( $p<0,05$ ), em relação ao grupo DBT-VEH. Ainda, na dose de 180 mg/kg de sulfato de magnésio, houve uma redução bastante significativa no tempo de exploração no fim do braço aberto quando comparado ao grupo DBT-VEH. Nos grupos que receberam as outras doses do sulfato de magnésio e fluoxetina não houve diferença significativa nestes parâmetros.



### Efeito do tratamento com sulfato de magnésio sobre o comportamento do tipo ansioso no Teste de Transição Claro-Escuro

O teste *t* de Student mostrou que animais diabéticos tratados com veículo possuem uma diminuição significativa de tempo de permanência no compartimento claro do teste de transição claro-escuro quando comparados aos animais normoglicêmicos (FIGURA 7A;  $p < 0,05$ ) e ainda diminuição no número de cruzamentos entre os compartimentos (FIGURA 7B;  $p < 0,05$ ). O tempo de permanência no compartimento claro é um indicativo de comportamento não ansioso e o número de cruzamentos é um indicativo da atividade locomotora. Entre os animais que foram tratados com o sulfato de magnésio, a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls não mostrou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) tanto no tempo de permanência no compartimento claro (FIGURA 7A) como no número de cruzamentos (FIGURA 7B), sendo o mesmo observado para os animais tratados com fluoxetina.

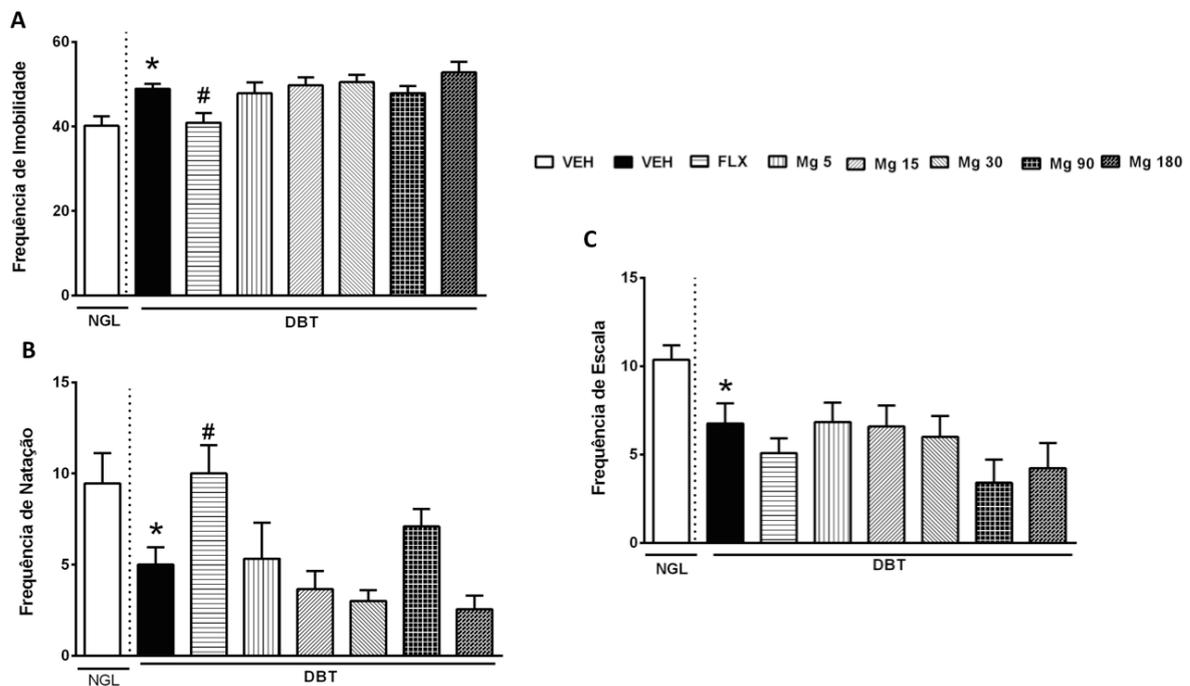


**FIGURA 7.** Efeito do tratamento prolongado com sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) (Mg 5, 15, 30, 90 e 180 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais diabéticos (DBT) sobre o (A) tempo de permanência no compartimento claro e (B) número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro. Valores estão representados em média  $\pm$  EPM;  $n = 10 - 12$ ; \* $p < 0,05$  comparado ao NGL-VEH.

### Efeito do tratamento com sulfato de magnésio sobre o comportamento do tipo ansioso no Teste da Natação Forçada Modificado

No Teste da natação forçada, os animais do grupo DBT-VEH apresentaram no teste *t* de Student uma diferença significativa em relação aos animais normoglicêmicos, sendo que eles obtiveram maior frequência de imobilidade (FIGURA 8A,  $p < 0,05$ ) e menor frequência de escalada e natação (FIGURA 8B e 8C, respectivamente,  $p < 0,05$ ). No entanto, a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls não mostrou diferença significativa

nos animais diabéticos tratados com sulfato de magnésio (em todas as doses), em comparação com os diabéticos tratados com veículo, tanto na frequência de imobilidade como nas frequências de natação e escalada. Houve uma diferença significativa apenas no grupo de animais tratados com a fluoxetina, em comparação com o grupo DBT-VEH ( $p < 0,05$ ). O tratamento com a fluoxetina levou a uma redução na frequência de imobilidade dos animais (FIGURA 8A) além de um aumento na sua frequência de natação (FIGURA 8B), mas sem alteração significativa na sua frequência de escalada (FIGURA 8C).



**FIGURA 8.** Efeito do tratamento prolongado com sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) (Mg 5, 15, 30, 90 e 180 mg/kg), fluoxetina (FLX, 10 mg/kg) ou veículo (VEH) em animais diabéticos (DBT) sobre a (A) frequência de imobilidade, (B) frequência de natação e (C) frequência de escalada. Valores estão representados em média  $\pm$  EPM;  $n = 10 - 12$ ; \* $p < 0.05$  comparado ao NGL-VEH; # $p < 0.05$  comparado ao DBT-VEH.

## DISCUSSÃO

Modelos animais têm contribuído imensamente para o entendimento de modificações bioquímicas do DMI, sendo as alterações encontradas em nosso estudo de acordo com a literatura (Soltani et al., 2005a; Rebolledo-Solleiro et al., 2016; Redivo et al., 2016). Dessa forma, a existência já descrita por diversos autores (Wayhs et al., 2010, 2013; de Moraes et al., 2014; Gambeta et al., 2015; Rebolledo-Solleiro et al., 2016) da relação entre diabetes e depressão/ansiedade foi confirmada em nosso estudo, uma vez que a indução do DMI com a STZ, droga que leva a destruição seletiva das células  $\beta$  pancreáticas e consequente diminuição

da insulina (Junod et al. 1969; Szkudelski 2001), levou a alterações da glicose sanguínea, comportamentais e motoras. Em nosso estudo pudemos observar que ocorre um aumento bastante acentuado da glicemia nos animais diabéticos e perda de peso em relação aos animais normoglicêmicos (Bhansali et al., 2015; Rebolledo-Solleiro et al., 2016). Ainda, esses animais apresentam comportamentos do tipo ansiogênico, uma vez que passam menos tempo explorando os braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado (Thorré et al., 1997; Ramanathan et al., 1998), suas porções finais e afundam menos a cabeça quando nesses braços abertos. Além disso eles apresentam comportamentos do tipo depressivo, uma vez que passam mais tempo imóveis durante o teste de natação forçada modificado. Além dos sintomas comportamentais e metabólicos, esse modelo ainda mostra que os animais têm um déficit locomotor, uma vez que no teste do campo aberto a frequência de cruzamentos é menor do que em animais normoglicêmicos. É importante ressaltar que a STZ é transportada para o interior das células  $\beta$  pancreáticas através do transportador GLUT-2, o qual não está presente na barreira hematoencefálica (Kumagai et al., 1999). Dessa forma, a possibilidade de a STZ causar danos diretos no SNC pode ser excluída, sendo esses efeitos comportamentais atribuídos à condição metabólica da hiperglicemia causada pela indução diabética com STZ.

No entanto, uma vez que tais mecanismos não são bem entendidos, especula-se que o receptor NMDA e citocinas pró-inflamatórias poderiam participar da fisiopatologia dessas doenças. As citocinas pró-inflamatórias, presentes tanto nessas psicopatologias quanto no diabetes, ativam a “via das quinureninas” e ao final de sua cascata metabólica produzem moléculas que ativam o receptor NMDA (Mayer et al., 1984; Dantzer, 2009; Maes, 2011a, 2011b) levando ao aumento da excitabilidade neuronal (Shiekhattar e Aston-Jones, 1992; Grunze e Walden, 1997), o que pode resultar em diversas mudanças moleculares como estresse oxidativo com consequentes danos celulares e mais ativação do sistema imune (Festjens et al., 2006). Dessa forma, o Mg parece ser uma boa alternativa farmacológica, uma vez que esse íon encontra-se em deficiência tanto na depressão/ansiedade quanto no diabetes. Um possível mecanismo do Mg seria devido a sua função essencial no metabolismo celular, uma vez que atua na integridade da membrana, respiração celular, síntese de proteína, metabolismo energético e de glicose, manutenção do transporte de íons, entre outros (Ebel e Gunther, 1980; Choi, 1987; Vink et al., 1988; Gentile e McIntosh, 1993). Outro mecanismo se deve ao fato de o Mg ser um antagonista do receptor NMDA, levando ao bloqueio de seu canal iônico (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984), impedindo que o glutamato exerça sua função ao se ligar em seu sítio ativo. Diversos estudos demonstram que a deficiência de Mg leva a danos exacerbados na função cerebral (McIntosh et al., 1988; McIntosh et al., 1989) e a

desregulação do metabolismo de glicose (Takaya et al., 2004; Soltani et al., 2005a, 2005b, 2005c), os quais podem ser prevenidos com a suplementação de tal íon.

Acredita-se que 30% dos pacientes com DMI apresentam deficiência de Mg (Djurhuus et al., 1999). Porém, Soltani e colegas (2007) relataram que mesmo com a suplementação de Mg, não foi possível atingir os níveis normais de ratos *Wistar* normoglicêmicos, o que poderia ser atribuído ao fato de o Mg ser transportado para o meio intracelular afim de compensar a deficiência (Soltani et al., 2005a, 2005c). Ainda, Soltani e colegas (2005a) relataram que em ratos *Wistar*, os níveis de glicose estabilizaram ao longo do tratamento com Mg na água por 8 semanas. Os autores acreditam que isso se deva ao fato de o Mg ser um cofator necessário para o transporte de glicose e de várias enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (Laires et al., 2004b). Mais ainda, isso poderia estar relacionado com um efeito reparador do pâncreas de animais com o diabetes induzido por STZ, em tratamento prolongado com o Mg, e que isso estaria relacionado com o controle da glicose sanguínea (Soltani et al., 2005b), uma vez que ocorre recuperação parcial da função do pâncreas. Porém, apesar desses dados serem promissores, não observamos melhoras nos níveis de glicose, mesmo em doses elevadas de Mg (Lal et al., 2003). Isso poderia ser devido ao tempo de tratamento adotado em nosso estudo ou ainda devido a forma de administração. Mais ainda, na maior dose avaliada de Mg observamos um possível efeito inespecífico ou até mesmo tóxico, uma vez que levou a uma diminuição de massa corporal quando comparado aos outros animais diabéticos tratados com doses menores ou veículo.

No que diz respeito ao tratamento com Mg em psicopatologias, diversos estudos demonstraram que a suplementação com esse mineral possui efeito terapêutico tanto nos sintomas depressivos (Decollogne et al., 1997; Poleszak et al., 2004) quanto ansiogênicos (Poleszak et al., 2004) em animais normoglicêmicos. Assim, estudos trazem que o Mg é capaz de diminuir o tempo de imobilidade e aumentar a frequência de nado e escalada (Poleszak et al., 2004) no teste da natação forçada. Este tratamento com Mg parece mais efetivo na indução de comportamentos do tipo antidepressivo e ansiolítico quando associado com antidepressivos (Mlyniec et al., 2014; Razmjou et al., 2016). Porém, em nosso trabalho não encontramos esses resultados em nenhuma dose utilizada.

No entanto, mesmo não tendo observado nenhuma alteração na medida da hiperglicemia e na avaliação do comportamento do tipo depressivo, o Mg parece possuir um efeito terapêutico na dose de 90 mg/Kg para a ansiedade, efeito o qual se assemelha ao

comportamento dos animais normoglicêmicos. Assim como Poleszak e colegas (2004), que observaram um efeito ansiolítico do Mg no teste do labirinto em cruz elevado, nós observamos uma maior permanência dos animais com diabetes tratados com Mg nos braços abertos e na porção final dos mesmos, demonstrando que o Mg exerce um efeito ansiolítico nesses animais diabéticos. A deterioração metabólica e hormonal causada pela hiperglicemia associada a deficiência de Mg podem favorecer o desenvolvimento da ansiedade e acreditamos que os animais diabéticos podem requerer uma dose maior de Mg para que ocorra o bloqueio dos canais iônicos do receptor NMDA e assim exercer seu efeito terapêutico, uma vez que Soltani e colegas (2004) demonstraram que nas doses de 20 e 30 mg/Kg os animais apresentavam melhoras nos sintomas ansiosos em animais normoglicêmicos. Mais ainda, na maior dose avaliada de Mg observamos um possível efeito inespecífico, uma vez que levou a comportamentos do tipo ansiogênico, diminuindo o tempo de exploração da porção final dos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado.

Alguns estudos trazem que o Mg é pouco tóxico (Weglicki et al., 1993; Guerrero-Romero et al., 2004), principalmente em pacientes/animais com a função renal conservada. Porém outros estudos relatam que, em doses elevadas, o tratamento com Mg foi deletério e levou a morte dos animais (Soltani et al., 2005c). Dessa forma, são necessários mais estudos para estabelecer uma dose segura que possa atender aos objetivos terapêuticos e possa prevenir complicações e intoxicação.

Sendo assim, mesmo nossos resultados possuindo algumas inconsistências com alguns trabalhos citados acima, acreditamos que o Mg possua um efeito terapêutico na ansiedade associadas ao diabetes e possivelmente na depressão. Mais ainda, acreditamos que o magnésio atue como um coadjuvante no tratamento de tais patologias e que a associação com outras drogas, como antidepressivos, deve ser investigada. Importante ressaltar que este é o primeiro trabalho estudando o efeito de um tratamento prolongado com Mg sobre comportamentos relacionados com a ansiedade/depressão em ratos diabéticos. Assim, tendo em vista os possíveis efeitos neuroprotetores enfatizamos a necessidade de mais estudos que abordem um tempo maior de tratamento além de uma abordagem mais profunda que envolva análises moleculares e celulares.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, P.M.; KURUVILLA, K.P.; MATHEW, J.; MALAT, A.; JOY, S.; PAULOSE, C.S. Alterations in hippocampal serotonergic and INSR function in streptozotocin induced diabetic rats exposed to stress: neuroprotective role of pyridoxine and Aegle marmelose. **J Biomed Sci**, 17:78. 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes - 2007. **Diabetes Care**, 30(1):S4-41. 2007.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 37(1):S81-90. 2014.
- ANDERSON, R.J.; FREEDLAND, K.E.; CLOUSE, R.E.; LUSTMAN, P.J. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, 24(6):1069–1078. 2001.
- ANDRÉ, C.; DINEL, A.L.; FERREIRA, G.; LAYÉ, S.; CASTANON, N. Diet-induced obesity progressively alters cognition, anxiety-like behavior and lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior: focus on brain indoleamine 2,3-dioxygenase activation. **Brain Behav Immun.**, 41:10-21. 2012.
- ANETOR, J.I.; SENJOBI, A.; AJOSE, O.A.; AGBEDANA, E.O. Decreased serum magnesium and zinc levels: atherogenic implications in type-2 diabetes mellitus in Nigerians. **Nutr. Health**, 16:291–300. 2002.
- BERTOLUCI, M.C.; CÉ, G.V.; SILVA, A.M.V.; PUÑALES, M.K.C. Disfunção Endotelial no Diabetes Melito Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 52(2):416-26. 2008.
- BHANSALI, S.; KUMAR, V.; SAIKIA, U.N.; MEDHI, B.; JHA, V.; BHANSALI, A DUTTA, P. Effect of mesenchymal stem cells transplantation on glycaemic profile & their localization in streptozotocin induced diabetic Wistar rats. **Indian J Med Res**, 142:63-71. 2015.
- BUCHBERGER, B.; HUPPERTZ, H.; KRABBEA, L.; LUXA, B.; MATTIVE, J.T.; SIAFARIKAS, A. Symptoms of depression and anxiety in youth with type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, 70:70–84. 2016.
- CARAFOLI, E. Calcium – a universal carrier of biological signals. **FEBS J**, 272:1073–89. 2005.
- CHOI, D.W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **J Neurosci**, 7:369–379. 1987.
- CRYAN, J.F.; VALENTINO, R.J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev**, 29(4-5):547-69. 2005.
- DA SILVA DIAS, I.C.; CARABELLI, B.; ISHII, D.K.; DE MORAIS, H.; DE CARVALHO, M.C.; RIZZO DE SOUZA, L.E.; ZANATA, S.M.; BRANDÃO, M.L.; CUNHA, T.M.; FERRAZ, A.C.; CUNHA, J.M.; ZANOVELI, J.M. Indoleamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes. **Molecular Neurobiology**, 1-13. 2016.
- DANTZER, R.; O'CONNOR, J.C.; FREUND, G.G.; JOHNSON, R.W.; KELLEY, K.W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 9(1):46-56. 2008.
- DANTZER, R. Cytokine, sickness behavior and depression. **Immunol Allergy Clin North Am**, 29(2):247-64. 2009.
- DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C.P.; DA SILVA, L.M.; FERREIRA, D.M.; WERNER, M.F.; ANDREATINI, R.; DA CUNHA, J.M.; ZANOVELI, J.M. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. **Behav Brain Res**, 258:52-64. 2014.
- DECOLLOGNE, S.; TOMAS, A.; LECERF, C.; ADAMOWICZ, E.; SEMAN, M. NMDA receptor complex blockade by oral administration of magnesium: comparison with MK-801. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 58:261–268. 1997.
- DETKE, M.J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, 121(1):66-72. 1995.
- DJURHUUS, M.S.; HENRIKSEN, J.E.; KLITGAARD, N.A.; BLAABJERG, O.; THYE-RONN, P.; ALTURA, B.M.; ALTURA, B.T.; BECK-NIELSEN, H. Effect of moderate improvement in metabolic control on magnesium and lipid concentrations in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, 22:546–554. 1999.
- DU, B.; TANG, X.; LIU, F.; ZHANG, C.; ZHAO, G.I.; REN, F.; LENG, X. Antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extracts of *Hemerocallis citrina* and its potential active components. **BMC Complement Altern Med**, 14:326. 2014.
- EBEL, H.; GÜNTHER, T. Magnesium metabolism: a review. **J Clin Chem Clin Biochem**, 18:257–270. 1980.
- EBY, G.A.; EBY, K.L. Magnesium for treatment-resistant depression: a review and hypothesis. **Med Hypotheses**, 74:649–660. 2010.

FESTJENS, N.; BERGHE, T.V.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, 1757:1371-1387. 2006.

FROMM, L.; HEATH, D.L.; VINK, R.; NIMMO, A.J. Magnesium attenuates post-traumatic depression/anxiety following diffuse traumatic brain injury in rats. **J Am Coll Nutr**, 23:529S-533S. 2004.

GAMBETA, E.; DE SOUZA, C.P.; DE MORAIS, H.; ZANOVELI, J.M. Reestablishment of the hyperglycemia to the normal levels seems not to be essential to the anxiolytic-like effect induced by insulin. **Metabolic Brain Disease**, 1-9. 2015.

GENTILE, N.T.; MCINTOSH, T.K. Antagonists of excitatory amino acids and endogenous opioid peptides in the treatment of experimental central nervous system injury. **Ann Emerg Med**, 22:1028-1034. 1993.

GODA, K.; HAMANE, Y.; KISHIMOTO, R.; OGISHI, Y. Radical scavenging properties of tryptophan metabolites. Estimation of their radical reactivity. **Adv Exp Med Biol**, 467: 397-402. 1999.

GOLDSTEIN, L.E.; LEOPOLD, M.C.; HUANG, X.; ATWOOD, C.S.; SAUNDERS, A.J.; HARTSHORN, M. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. **Biochemistry**, 39(24):7266-75. 2000.

GRUNZE, H.; WALDEN, J. Reduction of the frequency of occurrence of low magnesium induced field potentials in the hippocampus slice preparation of guinea pigs: a good screening tool for calcium antagonistic effects of anticonvulsant and antipsychotic drugs. **Magnesium Research**, 10:119-126. 1997.

GUERRERO-ROMERO, F.; TAMEZ-PEREZ, H.E.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, G.; SALINAS-MARTÍNEZ, A.M.; MONTES-VILLARREAL, J.; TREVINO-ORTIZ, J.H.; RODRÍGUEZ-MORAN, M. Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity in non-diabetic subjects with insulin resistance. A double-blind placebo-controlled randomized trial. **Diabetes Metab**, 30:253-258. 2004.

GUEUX, E.; RAYSSIGUIER, Y. The effect of magnesium deficiency on glucose stimulated insulin secretion in rats. **Hormonal Metabolism**, 15:594-597. 1983.

GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y. Ondansetron, a 5HT<sub>3</sub> receptor antagonist reverses depression and anxiety-like behavior in streptozotocin-induced diabetic mice: possible implication of serotonergic system. **Eur J Pharmacol**, 744:59-66. 2014.

HAJ-MIRZAIAN, A.; KORDJAZY, N.; HAJ-MIRZAIAN, A.; OSTADHADI, S.; GHASEMI, M.; AMIRI, S.; FAIZI, F.; DEHPOUR, A.R. Evidence for the involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like effect of nicotine in mouse forced swimming and tail suspension tests. **Psychopharmacology**, 232:3551-3561. 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, IDF ATLAS, 6th ed. Belgium. 2013.

JAZI, M. F.; BIGLARI, A.; MAZLOOMZADEH, S.; KINGSTON, P.; RAMAZANI, A.; BAZZAZ, T.; ESKANDARI, M. Recombinant fibromodulin has therapeutic effects on diabetic nephropathy by down-regulating transforming growth factor- $\beta$ 1 in streptozotocin-induced diabetic rat model. **Iran J Basic Med Sci**, 19:265-271. 2016.

JOCA, S.R.L.; PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Stress, depression and the hippocampus. **Rev Bras Psiquiatr**, 25(Supl II):46-51. 2003.

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A.E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J Clin Investig**, 48:2129-39. 1969.

KANTAK, K.M. Magnesium deficiency alters aggressive behavior and catecholamine function. **Behavioral Neuroscience**, 102:304-311. 1988.

KIECOLT-GLASER, J.K.; GLASER, R. Depression and immune function: central pathways to morbidity and mortality. **J Psychosom Res**, 53:873-876. 2002.

KRYSTAL, J.H.; D'SOUZA, D.C.; PETRAKIS, I.L.; BELGER, A.; BERMAN, R.M.; CHARNEY, D.S.; ABI-SAAB, W.; MADONICK, S. NMDA agonist and antagonist as probes of glutamergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders. **Harv Rev Psychiatry**, 7:125-143. 1999.

KUMAGAI, A.K. Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complication of diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, 15:261-73. 1999.

LAARAKKER, M.C.; VAN LITH, H.A.; OHL, F. Behavioral characterization of A/J and C57BL/6J mice using a multidimensional test: association between blood plasma and brain magnesium-ion concentration with anxiety. **Physiol. Behav.**, 102:205-219. 2011.

LAIRES, M.J.; MOREIRA, H.; MONTEIRO, C.P.; SARDINHA, L.; LIMA, F.; VEIGA, L.; GONCALVES, A.; FERREIRA, A.; BICHO, M. Magnesium, insulin resistance and body composition in healthy postmenopausal women. **Journal Am. Coll. Nutr**, 23:510S-513S. 2004.

LAIRES, M.J.; MONTEIRO, C.P.; BICHO, M. Role of cellular magnesium in health and human disease. **Front. Biosci**, 1:262-76. 2004b.

LAL, J.; VASUDEV, K.; KELA, A.K.; JAIN, S.K. Effect of oral magnesium supplementation on the lipid profile and blood glucose of patients with type 2 diabetes mellitus. **J Assoc Phys India**, 51:37-42. 2003.

- LUSTMAN, P.J.; CLOUSE, R.E. Depression in diabetic patients: The relationship between mood and glycemic control. **Journal of Diabetes and its Complications**, 19:113–122. 2005.
- LUTGENDORF, S.K.; GARAND, L.; BUCKWALTER, K.C.; REIMER, T.T.; HONG, S.; LUBAROFF, D.M. Life stress, mood disturbance, and elevated interleukin-6 in healthy older women. *J Gerontol, Ser A: Biol Sci Med Sci*, 54:M434-9. 1999.
- MACKAY, G.M.; FORREST, C.M.; STOY, N.; CHRISTOFIDES, J.; EGERTON, M.; STONE, T.W. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with chronic brain injury. **Eur J Neurol**,13(1):30–42. 2006.
- MAES, M.; BOSMANS, E.; SUY, E.; VANDERVORST, C.; DE JONCKHEERE, C.; RAUS, J. Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors. **Neuropsychobiology**, 24(3):115–20. 1991b.
- MAES, M.; LEONARD, B.E.; MYINT, A.M.; KUBERA, M.; VERKERK, R. The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 35(3):702-21. 2011a.
- MAES, M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 35(3):664-75. 2011b.
- MANJARREZ, G.; HERRERA, R.; LEON, M.; HERNANDEZ, R.J. A low brain serotonergic neurotransmission in children with type 1 diabetes detected through the intensity dependence of auditory-evoked potentials. **Diabetes Care**, 29(1):73-7. 2006.
- MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L.; GUTHRIE, P.B. Voltage-dependent block of Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. **Nature**, 309:261–263. 1984. (Letter)
- MCINTOSH, T.K.; FADEN, A.I.; YAMAKAMI, I.; ET AL. Magnesium deficiency exacerbates and pretreatment improves outcome following traumatic brain injury in rats: 31P magnetic resonance spectroscopy and behavioral studies. **J Neurotrauma**, 5:17–31. 1988.
- MCINTOSH, T.K.; VINK, R.; YAMAKAMI, I.; ET AL. Magnesium protects against neurological deficit after brain injury. **Brain Res**, 482:252–260, 1989.
- MCINTYRE, R.S.; SOCZYNSKA, J.K.; KONARSKI, J.Z. Should depressive syndromes be reclassified as "metabolic syndrome type II"? **Ann Clin Psychiatry**, 19:257-264. 2007.
- MLYNIC, K.; DAVIES, I. G.; DE AGUERO SANCHEZ, K.; PYTKA, B.; BUDZISZEWSKA, G. Essential elements in depression and anxiety. Part I. **Pharmacol Rep**, 66:534-544. 2014.
- MOULTON, C.D.; PICKUP, J.C.; ISMAIL, K. The link between depression and diabetes: the search for shared mechanisms. **Lancet Diabetes Endocrinol**, 3(6):461-471. 2015.
- MUROYAMA, A.; INAKA, M.; MATSUSHIMA, H.; SUGINO, H.; MARUNAKA, Y.; MITSUMOTO, Y. Enhanced susceptibility to MPTP neurotoxicity in magnesium-deficient C57BL/6N mice. **Neurosci Res**, 63:72–75. 2009.
- MUSSELMAN, D.L.; BETAN, E.; LARSEN, H.; PHILLIPS, L.S. Relationship of depression to diabetes types 1 and 2: epidemiology, biology, and treatment. **Biol Psychiatry**, 54:317–329. 2003.
- NOWAK, L.; BREGSTOVSKI, P.; ARCHER, P.; ET AL. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**, 307:462–465. 1984. (Letter)
- OWENS, M.J.; NEMEROFF, C.B. Role of Serotonin in the Pathophysiology of Depression: Focus on the Serotonin Transporter. **Clinical Chemistry**, 40:2:288-295. 1994.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, 14:149-167. 1985.
- PEREIRA, G.A.B.; ARCHER, R.L.B.; RUIZ, C.A.C. Avaliação do grau de conhecimento que pacientes com diabetes mellitus demonstram diante das alterações oculares decorrentes dessa doença. **Arq Bras Oftalmol**, 72(4):481-5. 2009.
- PICKUP, J.C.; CROOK, M.A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*, 41:1241-1248. 1998.
- PIRYAEI, A.; NAJAR, A.; BAYAT, M. Effects of pentoxifylline administration on histomorphological parameters of streptozotocin-induced diabetic rat testes. **Lab Anim ReS**, 31(3):111-116. 2015.
- POLESZAK, E.; SZEWCZYK, B.; KĘDZIERSKA, E.; WLAŻ, P.; PILC, A.; NOWAK, G. Antidepressant- and anxiolytic-like activity of magnesium in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, 78:7–12. 2004.
- POLESZAK, E.; WLAZ, P.; KĘDZIERSKA, E.; RADZIOWON-ZALESKA, M.; PILC, A.; FIDECKA, S.; NOWAK, G. Effects of acute and chronic treatment with magnesium in the forced swim test in rats. **Pharmacological Reports**, 57:654–658. 2005.

- POLESZAK, E.; WLAŹ, P.; KĘDZIERSKA, E.; NIEOCZYM, D.; WRÓBEL, A.; FIDECKA, S.; PILC, A.; NOWAK, G. NMDA/glutamate mechanism of antidepressant-like action of magnesium in forced swim test in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, 88:158–164. 2007.
- PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, 266(5604):730-732. 1977.
- PRADHAN, A.D.; MANSON, J.E.; RIFAI, N.; BURING, J.E.; RIDKER, P.M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, 286:327–334. 2001.
- QIU, H.M.; YANG, J.X.; JIANG, X.H.; FEI, H.Z.; LIU, D.; HU, X.Y.; ZHOU, Q.X. Upregulating serotonin transporter expression and downregulating monoamine oxidase-A and indoleamine 2, 3-dioxygenase expression involved in the antidepressant effect of sodium valproate in a rat model. **Neuroreport**, 25(17):1338-43. 2014.
- RAMANATHAN, M.; JAISWAL, A.K.; BHATTACHARYA, S.K. Differential effects of Diazepam on anxiety in streptozotocin induced diabetic and non-diabetic rats. **Psychopharmacol**, 135:361-67. 1998.
- RAZMJOU, S.; LITTELJOHN, D.; RUDYK, C.; SYED, S.; CLARKE, M.; PENTZ, R.; DWYER, Z.; HAYLEY, S. The interactive effects of ketamine and magnesium upon depressive-like pathology. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, 12:2049–2056. 2016.
- REBOLLEDO-SOLLEIRO, D.; ONTIVEROS, L.F.; BROCCOLI, A.L.; HANSSON, A.C.; ROCHA-ARRIETA, L.L.; AGUILAR-ROBLERO, R.; CRESPO-RAMÍREZ, M.; FUXE, K.; DE LA MORA, M.P. Dopamine D1 receptor activity is involved in the increased anxiety levels observed in STZ-induced diabetes in rats. **Behavioural Brain Research**, manuscript accepted. 2016.
- SALES, C.H.; PEDROSA, L.F.C.; LIMA, J.G.; LEMOS, T.M.A.M.; COLLI, C. Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes. **Clinical Nutrition**, 30:359-364. 2011.
- SANTAMARÍA, A.; GALVÁN-ARZATE, S.; LISÝ, V.; ALI, S.F.; DUHART, H.M.; OSORIO-RICO, L. Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. **NeuroReport**, 12(4): 871–4. 2001.
- SEREFKO, A.; SZOPA, A.; WLAŹ, P.; NOWAK, G.; RADZIWOŃ-ZALESKA, M.; SKALSKI, M.; POLESZAK, E. Magnesium in depression. **Pharmacological Reports**, 65:547-554. 2013.
- SHIEKHATTAR, R.; ASTON-JONES, G. NMDA-receptor-mediated sensory responses of brain noradrenergic neurons are suppressed by in vivo concentrations of extracellular magnesium. **Synapse**, 10:103–109. 1992.
- SOLTANI, N.; KESHAVARZ, M.; SOHANAKI, H.; DEHPOUR, A.R.; ZAHEDI ASL, S. Oral MgSO<sub>4</sub> administration prevents vascular complications in STZ-diabetic rats. **Life Sci**, 76:1455–1464. 2005a.
- SOLTANI, N.; KESHAVARZ, M.; MINAI, B.; MIRERSHADI, F.; ZAHEDI ASL, S.; DEHPOUR, A.R. Effect of administration of oral MgSO<sub>4</sub> on plasma glucose and pathological changes in the aorta and pancreas of diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, 32:604–610. 2005b.
- SOLTANI, N.; KESHAVARZ, M.; SOHANAKI, H.; ZAHEDI-ASL, S.; DEHPOUR, A.R. Relaxatory effect of magnesium on mesenteric vascular beds differs from normal and streptozotocin induced diabetic rats. **Eur J Pharmacol**, 508:177–181. 2005c.
- SOLTANI, N.; KESHAVARZ, M.; DEHPOUR, A.R. Effect of oral magnesium sulfate administration on blood pressure and lipid profile in streptozotocin diabetic rat. **European Journal of Pharmacology**, 560(2–3):201–205. 2007.
- SOUZA, L.C.; JESSE, C.R.; ANTUNES, M.S.; RUFF, J.R.; ESPINOSA, D.O.; GOMES, N.S.; DONATO, F.; GIACOMELLI, R.; BOEIRA, S.P. Indoleamine-2,3-dioxygenase mediates neurobehavioral alterations induced by an intracerebroventricular injection of amyloid-β1-42 peptide in mice. **Brain Behav Immun.**, [Epub ahead of print]. 2016.
- SZKULDESKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, 50:536-546. 2001.
- TAKAYA, J.; HIGASHINO, H.; KOBAYASHI, Y. Intracellular magnesium and insulin resistance. **Magnes Res**, 17:126-136. 2004.
- TALBOT, F.; NOUWEN, A. A review of the relationship between depression and diabetes in adults: is there a link? **Diabetes Care**, 23(10):1556–1562. 2000.
- TESFAYE, S.; BOULTON, A.J.; DICKENSON, A.H. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. **Diabetes Care**, 36(9):2456-65. 2013.
- THORRÉ, K.; CHAOUOFF, F.; SARRE, S.; MEEUSEN, R.; EBINGER, G.; MICHOTTE, Y. Differential effects of restraint stress on hippocampal 5-HT metabolism and extracellular levels of 5-HT in streptozotocin-diabetic rats. **Brain Res**, 772: 209-216. 1997.
- VICENTE, M.A.; ZANGROSSI, H. Involvement of 5-HT<sub>2C</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. **Neuropharmacology**, 79:127–135. 2014.

VINK, R.; MCINTOSH, T.K.; DEMEDIUK, P.; ET AL. Decline in intracellular free Mg<sup>2+</sup> is associated with irreversible tissue injury after brain trauma. **J Biol Chem**, 263:757–761. 1988.

WANG, S.H.; SUN, Z.L.; GUO, Y.J.; YUAN, Y.; YANG, B.Q. Diabetes impairs hippocampal function via advanced glycation end product mediated new neuron generation in animals with diabetes-related depression. **Toxicol Sci**, 111:72-79. 2009.

WAYHS, C.A.; MANFREDINI, V.; SITTA, A.; DEON, M.; RIBAS, G.; VANZIN, C.; BIANCINI, G.; FERRI, M.; NIN, M.; BARROS, H.M.; VARGAS, C.R. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect. **Metab Brain Dis**, 25(3):297-304. 2010.

WAYHS, C.A.; MESCKA, C.P.; VANZIN, C.S.; RIBAS, G.S.; GUERREIRO, G.; NIN, M.S.; MANFREDINI, V.; BARROS, H.M.; VARGAS, C.R. Brain effect of insulin and clonazepam in diabetic rats under depressive-like behavior. **Metab Brain Dis**, 28(4):563-570. 2013.

WEGLIICKI, W.B.; STAFFORD, R.E.; FREEDMAN, A.M.; CASSIDY, M.M.; PHILIPS, T.M. Modulation of cytokines and myocardial lesions by vitamin E and chloroquine in an Mg-deficient rat model. **Am J Physiol**, 264:C723–C726. 1993.

WHITTLE, N.; LI, L.; CHEN, W.Q.; YANG, J.W.; SARTORI, S.B.; LUBEC, G.; SINGEWALD, N. Changes in brain protein expression are linked to magnesium restriction-induced depression-like behavior. **Amino Acids**, 40:1231–1248. 2011.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, 27(5):1047- 53. 2004.

WLAZ, P.; SEREFKO, A.; SZOPA, A.; POLESZAK, E. The effect of an acute and 7-day administration of magnesium chloride on magnesium concentration in the serum, erythrocytes, and brain of rats. **Pharmacological Reports**, 2015.

ZANOVELI, J.M.; NOGUEIRA, R.L.; ZAGROSSI JR, H. Enhanced reactivity of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: Evidence from the elevated T-maze. **Neuropharmacology**, 54(4):1188-1195. 2007.

ZANOVELI, J.M.; DE MORAIS, H.; DA SILVA DIAS, I.C.; SCHREIBER, A.K.; DE SOUZA, C.P.; DA CUNHA, J.M. Depression associated with diabetes: from pathophysiology to treatment. **Curr Diabetes Rev**, [Epub ahead of print]. 2015.