

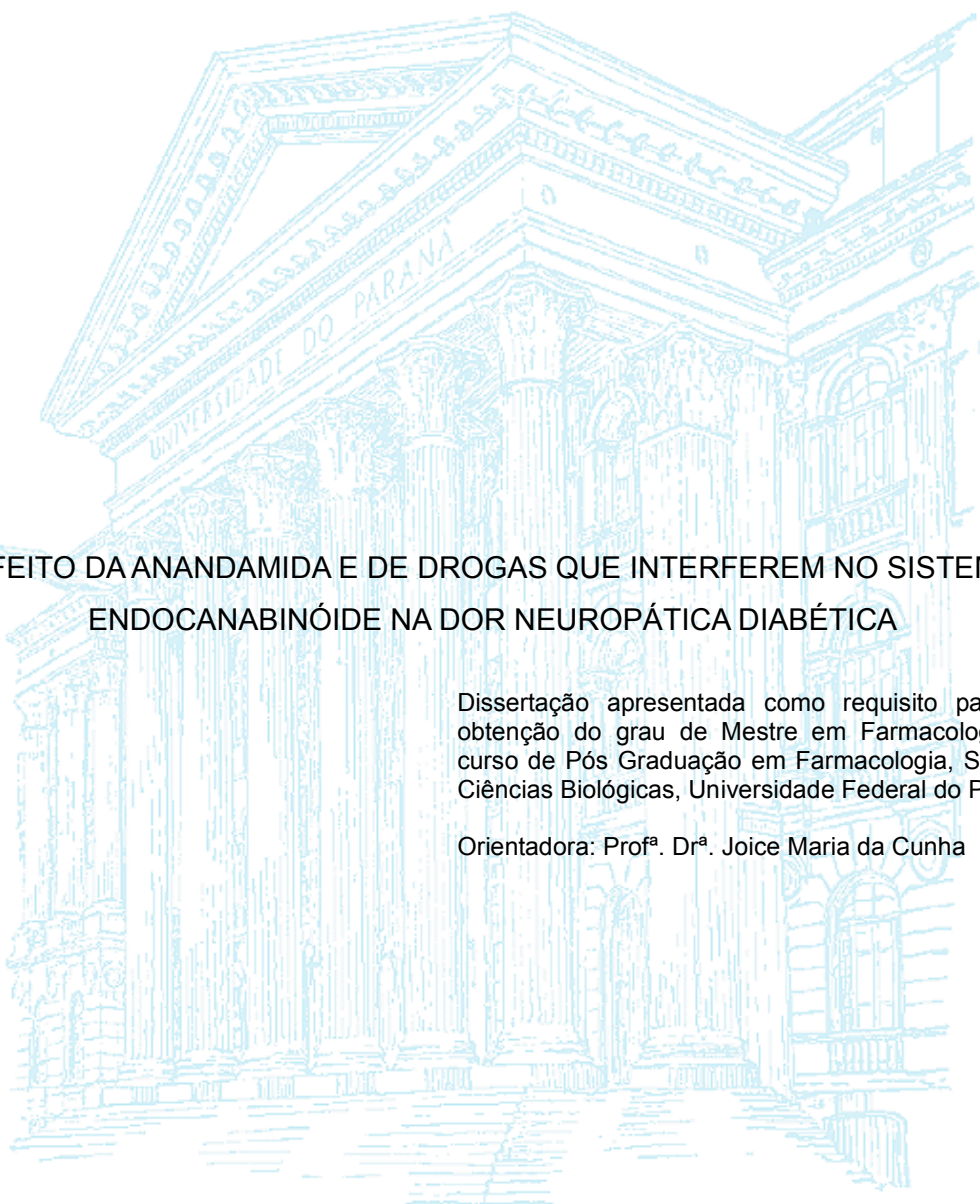
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNE KAROLINE SCHREIBER

EFEITO DA ANANDAMIDA E DE DROGAS QUE INTERFEREM NO SISTEMA
ENDOCANABINÓIDE NA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

CURITIBA
2012

ANNE KAROLINE SCHREIBER



EFEITO DA ANANDAMIDA E DE DROGAS QUE INTERFEREM NO SISTEMA
ENDOCANABINÓIDE NA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, no
curso de Pós Graduação em Farmacologia, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.


Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Joice Maria da Cunha

CURITIBA
2012

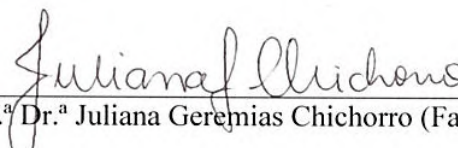


1 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

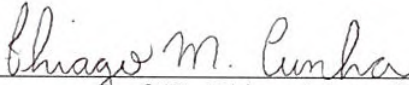
2 Ao vigésimo primeiro dia do mês de março do ano de dois mil e doze, às treze
3 horas e trinta minutos, no Anfiteatro nº 09 do Setor de Ciências Biológicas da
4 Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de
5 Mestrado de autoria da pós-graduanda em Farmacologia ANNE KAROLINE
6 SCHREIBER intitulada: “EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS PERIFÉRICOS DA
7 ANANDAMIDA E DE DROGAS QUE INTERFEREM NO SISTEMA
8 ENDOCANABINÓIDE NO TESTE DA FORMALINA EM RATOS NORMAIS E
9 DIABÉTICOS”, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha e composta pelos
10 professores: Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a
11 Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Farmacologia - UFPR) e Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha
12 (FMRB – USP). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e
13 cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida durante quinze
14 minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada
15 uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer:
16 APROVADA. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-
17 Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho
18 deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Nada
19 mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a
20 presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Banca
21 Examinadora, em Curitiba, 21 de março de 2012.



Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof.^a Dr.^a Juliana Geremias Chichorro (Farmacologia - UFPR)



Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha (USP)

NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação é apresentada em formato alternativo – artigo para publicação – de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, constando de uma revisão de literatura, objetivos do trabalho e um artigo científico abordando os experimentos realizados, com resultados e discussão, além da conclusão. O foi formatado conforme as normas propostas pelo periódico *Neuropharmacology*, ao qual o artigo foi submetido.

AGRADECIMENTOS

Seria necessário agradecer a tantas pessoas por eu ter conseguido chegar neste momento, que para mim se torna fácil perceber que nunca estamos sozinhos, aonde quer que vamos. Pode ser que só daqui alguns anos eu perceba a intensidade com que muita gente à minha volta interferiu em minha formação, não somente como profissional, mas como amiga, como mulher e como pessoa.

Gostaria de agradecer muito pela presença junto a mim de todas as pessoas importantes em minha vida, pelo apoio que se demonstrou tolerante e amável durante esta jornada. Sem minha família eu não seria ninguém.

Ao Fer, pelo amor e companheirismo sem tamanho.

Gostaria de agradecer pela possibilidade de passar por mais esta etapa, por todo o aprendizado, pelas lições que pude aprender, e também por aquelas que só se revelam com o tempo. Pelo afeto, pelas conversas francas, pelos merecidos puxões de orelha e por toda a ajuda que sempre esteve presente nas horas de necessidade, agradeço à Prof.^a Joice.

Este trabalho é resultado do esforço e dedicação de muitas e muitas pessoas que já passaram pelo laboratório, dos que ainda permanecem conosco, e também daqueles que me ajudaram indiretamente. Muito obrigada aos “sobreviventes” às intermináveis sessões de formalina e aos colegas de laboratório. Sem vocês... Este trabalho não teria sido concluído de forma alguma!

Ao Biotério da UFPR, foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia, pela oportunidade.

À Fundação Araucária e à Capes pelo suporte financeiro.

A Deus, acima de tudo, pelos momentos em que continuou me ouvindo baixinho, por não ter me abandonado nunca, mas mais por ter proporcionado somente os desafios que eu podia vencer.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena / Acreditar no sonho que se
tem / Ou que seus planos nunca vão dar certo / Ou que você nunca vai ser
alguém...”

(Legião Urbana – Mais uma vez)

RESUMO

A dor neuropática é uma grave e debilitante complicação do diabetes. Um dos problemas do tratamento desta complicação é a refratariedade aos tratamentos vigentes, tornando-os paliativos e sintomáticos. Além disso, os diversos efeitos colaterais os tornam altamente restritos. Nesse sentido, estudos vêm buscando o melhor entendimento da fisiopatologia da dor neuropática diabética (DND) e a proposição de novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, drogas que atuam no sistema endocanabinóide aparecem como promissoras para o tratamento de dores crônicas, como a DND. Assim, o presente estudo tem como objetivo investigar o potencial antinociceptivo desta classe de drogas na hiperalgesia química induzida por formalina quando injetadas perifericamente na região dorsal da pata ipsilateral (via subcutânea) de ratos normoglicêmicos (Ngl) ou com diabetes quimicamente induzido por estreptozotocina (STZ). Foi observado que animais diabéticos (Dbt) exibiram maior número de sacudidas na pata (*flinches*) em resposta à injeção de formalina (0,5%; 50 μ L) durante a primeira (neurogênica) e segunda (inflamatória) fases do teste quando comparados às respostas nociceptivas exibidas pelos animais Ngl, indicando a presença de hiperalgesia química em animais diabéticos. A administração local de AM404 (inibidor da recaptação de anandamida-AEA), AEA (agonista misto endógeno) ou ACEA (agonista seletivo para receptores canabinóides do tipo CB1) reduziu significativamente o número de *flinches* em ambas as fases do teste da formalina em animais Ngl e Dbt. Em ambos os grupos experimentais (Ngl e Dbt), o efeito antinociceptivo da AEA foi prevenido pelo pré-tratamento local com antagonistas seletivos de receptores canabinóides do tipo CB1 (AM251) ou CB2 (AM630), sendo o AM251 capaz de prevenir o efeito da AEA em ambas as fases do teste, enquanto que o AM630 foi capaz de prevenir o efeito do tratamento somente na segunda fase do teste. Adicionalmente, o efeito do ACEA foi significativamente prevenido pelo tratamento prévio local com AM251 nos animais Ngl e Dbt. Por fim, nos animais Dbt, o efeito antinociceptivo do AM404 foi prevenido pelo tratamento local com AM251 ou AM630, assim como observado quando do tratamento com AEA. No entanto, nos animais Ngl, o tratamento com AM251 foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do AM404 somente na primeira fase do teste enquanto que o tratamento com AM630 não alterou o efeito do AM404 em nenhuma das fases. Em conjunto, os resultados demonstram propriedades antinociceptivas de drogas que atuam via sistema endocanabinóide em modelo de neuropatia dolorosa diabética quando administradas perifericamente. Os receptores canabinóides do tipo CB1 parecem mediar o efeito da AEA, do ACEA e do AM404 nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina, enquanto que os receptores do tipo CB2 são importantes para o efeito antinociceptivo da AEA e do AM404 na fase inflamatória. Considerando a não responsividade dos animais diabéticos aos opióides, a observação de que a administração local de drogas que ativam os receptores canabinóides seja capaz de reverter o quadro de hiperalgesia química nesses animais parece promissor.

Palavras chave: diabetes, anandamida, AM404, ACEA, teste da formalina, receptores CB1, receptores CB2, estreptozotocina, rato.

ABSTRACT

Diabetes is often associated with painful neuropathy. Since the mechanism underlying diabetic neuropathic pain remains poorly understood, the current treatments are palliative and symptomatic, mostly restricted by dose-limiting side effects. It has been proposed that agents that affect the endocannabinoid system are promising drugs for chronic pain treatment. Antinociceptive effect of cannabinoids has already been related previously in peripheral or spinal nerve injury models of neuropathic pain, but very little has been investigated in animal models of painful diabetic neuropathy. Thus, the current study aims to investigate the potential antinociceptive effect of drugs that alter endocannabinoid system injected subcutaneously into the dorsal surface of the ipsilateral hind paw in chemical hyperalgesia induced by formalin in both normoglycemic and streptozotocin-diabetic rats. Diabetic rats exhibited exaggerated flinching behaviors during first and second phases of the formalin test, indicating the presence of hyperalgesia. Treatment with AM404, an anandamide (AEA) re-uptake inhibitor, AEA (an endogenous agonist of CB1 and CB2 receptors) or ACEA (a highly selective CB1 receptor agonist) induced a significant antinociception in both phases of formalin test in normoglycemic (Ngl) and diabetic (Dbt) rats. In both Ngl and Dbt rats, the antinociceptive effect of ACEA was prevented by pretreatment with AM251, a CB1 receptor antagonist while the antinociceptive effect of AEA was significantly prevented by pretreatment with AM251 or AM630, a CB2 receptor antagonist. In Ngl rats, the antinociceptive effect of AM404 was significantly prevented by AM251 only during first phase of the formalin test while in Dbt rats, this effect was blocked by pretreatment with AM251 (both phases) and AM630 (second phase). Taken together, these results demonstrated broad-spectrum antinociceptive properties of cannabinoids in a model of painful diabetic neuropathy when administered peripherally. Peripheral activation of both CB1 and CB2 cannabinoid receptors seems to mediate the antinociceptive effect of exogenous or endogenous anandamide, probably CB1 receptors expressed on primary afferent nociceptors and CB2 receptors presented on inflammatory cells as mast cells.

Keywords: diabetes, anandamide, AM404, ACEA, formalin test, CB1 and CB2 receptors, streptozotocin, rat.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Prevalência mundial de pessoas com diabetes.....	14
FIGURA 2 - Cascatas intracelulares mediadas pela ativação de receptores canabinóides do tipo CB1 e CB2.....	26

ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1 - Flinching time course and sum of flinches counted per phase after paw formalin (0.5%, 50 μ L) injection in normoglycemic and diabetic rats.....	57
FIGURE 2 - Sum of flinches per phase after paw formalin in normoglycemic and diabetic rats that were pre-treated with AM404 (50, 75 and 150 μ g/paw).....	58
FIGURE 3- Effect of CB1 receptor inverse agonist/antagonist AM251 (150 μ g/paw) on the antinociceptive effect of AM404 (50 μ g/paw) in normoglycemic and diabetic groups submitted to the paw formalin injection.....	59
FIGURE 4- Effect of CB2 receptor antagonist AM630 (25 μ g/paw) on the antinociceptive effect of AM404 (50 μ g/paw) in normoglycemic and diabetic groups submitted to the paw formalin injection.....	60
FIGURE 5 - Sum of flinches per phase after paw formalin in normoglycemic and diabetic rats that were pre-treated with anandamide (AEA; 0.03, 0.1, 0.3 and 1 μ g/paw).....	61
FIGURE 6 - Effect of CB1 receptor inverse agonist/antagonist AM251 (150 μ g/paw) on the antinociceptive effect of AEA (0.1 μ g/paw) in normoglycemic and diabetic	

groups submitted to the paw formalin injection.....	62
FIGURE 7 - Effect of CB2 receptor antagonist AM630 (25 µg/paw) on the antinociceptive effect of AEA (0.1 µg/paw) in normoglycemic and diabetic groups submitted to the paw formalin injection.....	63
FIGURE 8 - Sum of flinches per phase after paw formalin in normoglycemic and diabetic rats that were pre-treated with ACEA (10, 30 and 100 µg/paw).....	64
FIGURE 9 - Effect of CB1 receptor inverse agonist/antagonist AM251 (150 µg/paw) on the antinociceptive effect of ACEA (30 µg/paw) in normoglycemic and diabetic groups submitted to the paw formalin injection.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG - 2-araquidonilglicerol
ACEA - Araquidonil-2'-cloroetilamida
AEA – Araquidonil Etanolamida (Anandamida)
AM251–N-(Piperidina-1-yl)-5-(4-iodofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazole-3-carboxamida
AM404– N-(4-Hidroxifenil)-5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*-eicosatetraenamida
AM630 - 6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1*H*-indol-3-il](4-metoxifenil)metanona
AMPc – Adenosina Monofosfato Cíclico
CB1 – Receptor Canabinóide do tipo 1
CB2 – Receptor Canabinóide do tipo 2
CFA – Adjuvante Completo de Freund
COX – Enzima Ciclooxygenase
CREB – Proteína Ligante ao Elemento de Resposta do AMPc
DM I – Diabetes *mellitus* tipo I
DM II – Diabetes *mellitus* tipo II
DN – Dor Neuropática
G_{o/i} – Proteína G inibitória
HbA1c – Hemoglobina glicada
HLA – Sistema Antígeno Leucocitário Humano
MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
methAEA - Metanandamida
NGF – Fator de Crescimento de Nervos
OEA – Oleiletanolamida
PEA – Palmitoiletanolamida
PLC-β – Fosfolipase C- β
PKA – Proteína Quinase A
SNC – Sistema Nervoso Central
THC – Tetraidrocanabinol
TNF α – Fator de Necrose Tumoral α
TRPV1 – Receptores de Potencial Transitório Vanilóide 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 DIABETES.....	12
1.1.1 Incidência e Prevalência.....	13
1.1.2 Diabetes <i>mellitus</i> tipo I (DM I) e Diabetes <i>mellitus</i> tipo II (DM II).....	13
1.1.2.1 Sintomas e Complicações do DM I.....	16
1.2 NEUROPATIA DIABÉTICA.....	17
1.2.1 Classificação.....	18
1.2.2 Incidência e Diagnóstico	19
1.2.3 Sinais e Sintomas.....	19
1.3 DOR E DOR NEUROPÁTICA.....	20
1.3.1 Tratamento Farmacológico da Dor Neuropática.....	22
1.4 CANABINÓIDES.....	24
1.4.1 Sistema Endocanabinóide.....	25
1.4.1.1 Receptores Canabinóides.....	25
1.4.1.2 Ligantes Endógenos.....	28
1.5 CANABINÓIDES, ENDOCANABINÓIDES E DOR.....	29
1.6 DIABETES QUIMICAMENTE INDUZIDO por ESTREPTOZOTOCINA.....	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3 ARTIGO CIENTÍFICO	34
3.1 INTRODUCTION.....	34
3.2 MATERIALS AND METHODS.....	35
3.2.1 Drugs and solutions.....	35
3.2.2 Animals.....	35
3.2.3 Induction of diabetes.....	36
3.2.4 Nociceptive testing (chemical hyperalgesia).....	36
3.2.5 Experimental procedures.....	36
3.2.6 Statistical Analyses.....	37
3.3 RESULTS.....	37

3.3.1 Exaggerated formalin-evoked flinching behavior in diabetic rats.....	37
3.3.2 Effect of AM404 on flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats.....	38
3.3.3 Effect of treatment with CB1 and CB2 receptor antagonists on the antinociceptive effect of AM404 over flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats.....	38
3.3.4 Effect of anandamide (AEA) on flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats.....	39
3.3.5 Effect of CB1 and CB2 receptor antagonists on the antinociceptive effect of AEA over flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats.....	39
3.3.6 Effect of ACEA on flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats.....	40
3.3.7 Effect of CB1 receptor inverse agonist/antagonist on the antinociceptive effect of ACEA over flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats.....	40
3.4 DISCUSSION.....	40
3.5 ACKNOWLEDGMENTS.....	48
3.6 REFERENCES.....	48
3.7 FIGURE LEGENDS.....	55
3.8 FIGURES.....	57
3.9 HIGHLIGHTS.....	66
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES

É o conjunto heterogêneo de desordens que afetam o metabolismo, possuindo como ponto comum a hiperglicemia, resultado da ausência ou baixa produção de insulina, ação comprometida desta ou ambos. Atualmente, a classificação não leva mais em conta a forma de tratamento da doença, mas sim sua etiologia, de modo que os termos insulino dependente e insulino independente não são mais adequados (DIRETRIZES SBD, 2009). Sendo assim, a Organização Mundial de Saúde e a Associação Americana de Diabetes sugerem a seguinte classificação: Diabetes *mellitus* (DM) tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos (ALBERTI; ZIMMET, 1999; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009).

Resumidamente, o DM I é resultado da destruição das células β pancreáticas, levando à deficiência na produção de insulina. Tal destruição é na maioria dos casos provocada pelo sistema imune (forma autoimune; ERLICH *et al.*, 2008), embora possam não haver marcadores de autoimunidade (forma idiopática) (DIRETRIZES SBD, 2009). O DM II é a forma mais comum, caracterizado pela deficiência na secreção e/ou ação da insulina. Geralmente, os pacientes com esta forma da síndrome apresentam sobrepeso ou obesidade, com idade igual ou superior a 40 anos. O tratamento com insulina não é essencial, mas pode ser necessário para o bom controle metabólico (DIRETRIZES SBD, 2009). O diabetes gestacional remete a qualquer grau de intolerância à glucose, descoberta ou iniciada durante o período de gestação. Afeta 1 a 14% das gestantes e está relacionado à morbidade e mortalidade perinatais (LAWRENCE *et al.*, 2008). Outras formas de diabetes menos comuns são aquelas cuja etiologia pode ser identificada, representadas por um quadro bastante amplo de doenças e disfunções basais que podem levar ao diabetes (DIRETRIZES SBD, 2009).

1.1.1 Incidência e Prevalência

Atualmente, acredita-se que a prevalência mundial do diabetes seja de 366 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos, ou seja, 8,3% da população, número este que vem aumentando ano a ano. Projeções feitas para o ano de 2030 apontam que mais de 550 milhões de pessoas serão diabéticas, ou quase 10% da população adulta, se nenhuma medida for tomada para conter o avanço da doença agora. A mortalidade da doença alcançou 4,6 milhões de pessoas somente no ano de 2011, valor este que tende a aumentar se as expectativas forem concretizadas. Em nosso país, estima-se que sejam 12,4 milhões de casos, colocando o Brasil na quarta posição dentre os dez países com maior prevalência mundial. Até o ano de 2030, há projeções que o Brasil deva ocupar a terceira colocação, com aumento em 7,2 milhões de casos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION ATLAS, 2011).

Conforme pode ser observado na figura 1, percebe-se que os casos estão concentrados em países nórdicos, mas um fato curioso é que cerca de 80% das mortes ocorrem nos países com incidência média de doentes, como o Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). O grande aumento no número de casos vem ocorrendo especialmente em países em desenvolvimento (ROGLIC, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012), vinculado a fatores como: aumento da expectativa de vida das populações em geral e dos pacientes diabéticos (ALBERTI; ZIMMET, 2002), à maior urbanização, à crescente prevalência do sedentarismo e da obesidade (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION ATLAS, 2006).

1.1.2 Diabetes *mellitus* tipo I (DM I) e Diabetes *mellitus* tipo II (DM II)

Para o controle glicêmico em pacientes com DM I, são necessárias injeções diárias de insulina, caso contrário o desequilíbrio da glicemia pode levar ao óbito (NATHAN, 1993). Pessoas em qualquer idade podem ser acometidas pela DM I, embora em geral a doença se manifeste em crianças e adultos jovens (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION ATLAS, 2011).

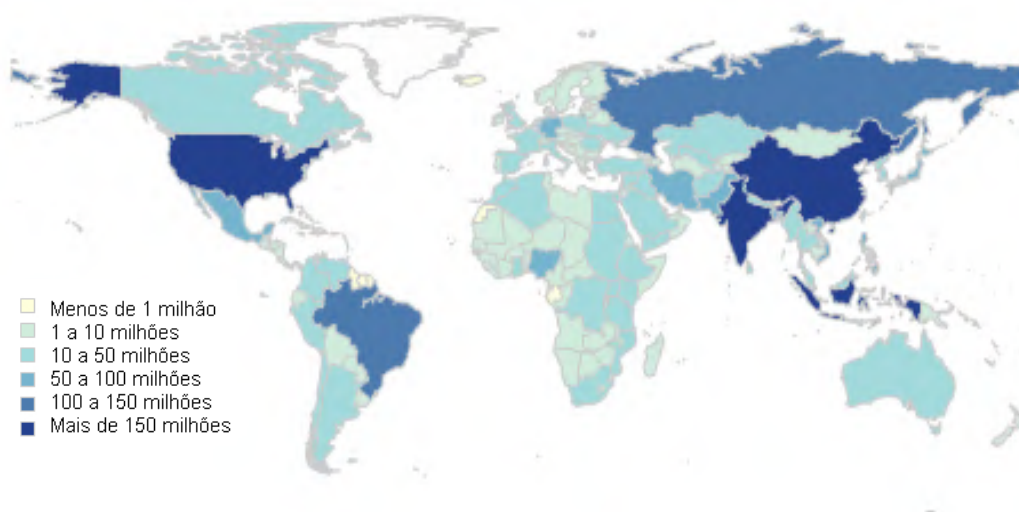


FIGURA 1 - Estimativa de prevalência mundial de pessoas com diabetes (adaptada do Diabetes Atlas, 4ª edição, International Diabetes Federation, 2011).

Atualmente, não se sabe ao certo o que torna as células β pancreáticas suscetíveis ao sistema de defesa do organismo na forma autoimune do diabetes, mas sabe-se que a enfermidade é resultado de predisposição genética associada a fatores ambientais (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION ATLAS, 2006; LAMBERT; BINGLEY, 2006; RABINOVITCH; SUAREZ-PINZON, 1998), dentre os quais podem ter importância: infecções virais durante a gestação, período curto de amamentação e exposição precoce ao leite bovino (LAMBERT; BINGLEY, 2006). Chama-se insulite a fase inicial da doença, caracterizada pela infiltração de proteínas do sistema complemento (NARENDRAN *et al.*, 2005) e células mononucleares (macrófagos e células CD8+) nas ilhotas, provocando sua destruição (LAMBERT; BINGLEY, 2006; NARENDRAN *et al.*, 2005).

A teoria mais aceita para o desenvolvimento do DM I de origem autoimune é que em estágios iniciais da vida, massas de células β sofram remodelamento e entram em apoptose. O *clearance* defeituoso por parte dos macrófagos neste momento seria responsável pela apresentação de autoantígenos provenientes das células β para células dendríticas (TRUDEAU *et al.*, 2000), dando início ao ataque autoimune. Tal hipótese pode ser corroborada pela presença de autoanticorpos no soro de pacientes até pouco tempo antes do aparecimento dos primeiros sinais

clínicos da doença (NARENDRAN *et al.*, 2005).

O DM II é a forma mais comum da síndrome, ocorrendo em cerca de 90% dos casos (DIRETRIZES SBD, 2009). Diferentemente do DM I, acomete em geral adultos, embora nos últimos anos venha acometendo igualmente crianças e adolescentes. Embora seja descrita a produção de insulina, a mesma parece ser insuficiente para as necessidades corpóreas. Ademais, a ação periférica deste hormônio pode estar comprometida, culminando no aumento da glicose sanguínea (IDF ATLAS, 2011). Em geral ambas as situações (redução na produção e resistência periférica à insulina) ocorrem simultaneamente, mas pode haver predominância de uma ou outra (DIRETRIZES SBD, 2009).

O estabelecimento do DM II é precedido por estágios denominados como “glicemia de jejum alterada” e “tolerância diminuída à glicose”, sendo então necessários vários anos para que a condição se torne evidente (DIRETRIZES SBD, 2009). O primeiro decorre de glicemia no intervalo entre 100 e 126 mg/dL após 8 horas sem ingestão de carboidratos. A tolerância diminuída à glicose é verificada quando, após duas horas de uma sobrecarga com 75 g de glicose, a glicemia situa-se entre 140 e 199 mg/dL (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF *DIABETES MELLITUS*, 2003). Estes estágios prévios podem contribuir para que o paciente permaneça não diagnosticado durante anos (IDF ATLAS, 2011).

Assim como o DM I, não se conhecem os fatores que desencadeiam esta forma de diabetes, embora vários fatores de risco sejam apontados, dentre eles: obesidade, sedentarismo, aumento da idade, hábitos alimentares não saudáveis, etnia, histórico familiar de diabetes e má nutrição durante período gestacional, afetando o bebê (IDF ATLAS, 2011). Como anteriormente citado, a insulina não é essencial, mas pode vir a se tornar necessária, uma vez que a perda da função das células β ocorre progressivamente (UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1995).

1.1.2.1 Sintomas e Complicações do DMI

A maioria dos casos de DM I apresenta um desenvolvimento repentino, com alguns sintomas típicos: glicemia acima do limite; utilização de lipídeos para suprir a demanda energética; formação de colesterol pelo fígado e nível de proteínas diminuído (hipoproteinemia). Os pacientes diabéticos em geral apresentam perda de peso repentina, cansaço, sede e micção constantes, cicatrização lenta, visão turva, fome aumentada e infecções constantes (IDF ATLAS, 2011).

A grande quantidade de glucose sanguínea, causada pela má absorção celular, acaba sendo excretada pela urina, pois os túbulos renais não conseguem recaptá-la. Ocorre também desidratação, devido à saída de água do interior das células, causada pela diferença de concentração entre o meio intra e extracelular. Além disso, os túbulos renais, incapazes de reabsorver a água, favorecem a perda de líquido. Como resultado, há aumento do volume de urina, desidratação intra e extracelular, sede e perda de K^+ , sendo esta última consequência da deficiência de insulina, responsável pela sua captação (CONSTANZO, 2007; GUYTON, HALL, 2006).

Embora a terapia utilizando insulina para regular a glicemia seja essencial nestes pacientes, não é possível fazer o controle perfeito de tal nível. Além das alterações metabólicas advindas da doença (FEITOSA *et al.*, 2008), existem também complicações teciduais de longo prazo, tais como retinopatias, neuropatias, nefropatias e complicações vasculares, presentes em ambas as formas de diabetes (NATHAN, 1993). Estes tecidos são extensivamente afetados pela hiperglicemia contínua ou ocasional por serem livremente permeáveis à glucose (GABBAY, 1973).

Assim, o diabetes poderia ser considerado como benigno se não fossem as complicações decorrentes, as quais estão intimamente ligadas à morbidade e mortalidade dos pacientes (VINIK, 2004). Neste contexto nos interessa particularmente a neuropatia de origem diabética.

1.2 NEUROPATIA DIABÉTICA

As neuropatias de origem diabética são um grupo de desordens complexas e heterogêneas quanto aos sintomas, progressão, padrão de envolvimento neurológico e mecanismos envolvidos (DYCK *et al.*, 1993), comum entre pacientes que ainda não estão no estado crônico da doença (HONG; WILEY, 2005). Caracterizam-se por dano difuso ou focal das fibras nervosas periféricas somáticas ou autonômicas (VINIK; MEHRABYAN, 2004).

A neuropatia é a complicação mais debilitante decorrente do diabetes (VINIK; MEHRABYAN, 2004), sendo responsável pela maior parte das internações e amputações nestes pacientes (HOLZER *et al.*, 1998). Pode ser silenciosa e permanecer não diagnosticada ou então apresentar sinais e sintomas clínicos não específicos, semelhantes aos apresentados em outras doenças (VINIK; MEHRABYAN, 2004).

A patofisiologia da neuropatia diabética não está totalmente elucidada (KRISHNAN; MATTHEW; KIERNAN, 2008), embora se acredite que seu desenvolvimento e progressão estejam primariamente associados à hiperglicemia, tanto em pacientes com DM I quanto DM II (DCCT RESEARCH GROUP, 1995; MARTIN *et al.*, 2006; SHAW; CUMMINGS, 2005). São citados como os fatores de risco mais importantes para a severidade desta complicação: problemas microvasculares, tempo de exposição à hiperglicemia, tipo e tempo de diabetes, nível glicêmico pós prandial e nível de hemoglobina glicada (DYCK *et al.*, 1999; UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1998).

Em modelos animais, o retardo da velocidade de condução nervosa motora e sensorial, característico da doença pode ser melhorado ou revertido nos estágios iniciais pela reposição de insulina, demonstrando a existência de correlação entre a neuropatia e a hiperglicemia (SIMA; BRISMAR, 1985). No entanto, em estudos clínicos, mesmo após o intenso controle glicêmico, somente em 30 a 40% dos casos há relatos de reversão do quadro (VINIK, 2004). Além disso, a possibilidade de hipoglicemia não permite que o controle da glicemia seja estritamente preciso, de modo que o metabolismo da glucose ainda permanece alterado (DOBRETISOV *et al.*, 2010).

Outros fatores associados ao desenvolvimento da neuropatia diabética

envolvem alterações metabólicas secundárias ao aumento da glucose sérica tais como aumento de metabolização da glucose pela via dos polióis, gerando frutose e sorbitol, podem levar à desregulação da proteína quinase C e da bomba de (Na^+K^+) -ATPase, comprometendo a atividade nervosa (GREENE; LATIMMER, 1983). Não obstante, a biodisponibilidade excessiva de glucose pode promover a oxidação e glicosilação não enzimática de biomoléculas (SIMA, 2000). Além disso, acredita-se que a diminuição do suporte trófico também seja importante no desenvolvimento da neuropatia diabética (BROWNLEE, 2001), uma vez que células endoteliais sofrem modificações quando expostas à hiperglicemia, havendo aumento de trombosmodulina, um marcador de lesão endotelial (WADA *et al.*, 2001). O fluxo sanguíneo pode ser prejudicado, então, quando tais lesões ocorrem (WADA; YAGIHASHI, 2005), culminando em demielinização, retração e encurtamento axonal, mudanças nos nódulos de Ranvier, resultando em mudanças no padrão de disparos das fibras (SIMA *et al.*, 1997). Tais alterações ocorrem tanto em pacientes com DM I como DM II (SHAW; CUMMINGS, 2005).

1.2.1 Classificação

Dependendo do tipo de fibra envolvida, as manifestações clínicas variam entre clínicas ou subclínicas (VINIK; MEHRABYAN, 2004). Assim, os principais grupos de distúrbios neurológicos decorrentes do diabetes *mellitus* são: 1) neuropatia subclínica, resultado de anormalidades em testes sensoriais quantitativos e eletrodiagnósticos, com queda na velocidade de condução nervosa ou amplitude diminuída; 2) neuropatia difusa clínica, com síndromes autonômicas e sensoriomotoras distais simétricas, em que há comprometimento da sensibilidade a estímulos tais como vibração e temperatura e 3) síndromes focais, em que o comprometimento do sistema autonômico dificulta a adaptação dos batimentos cardíacos em resposta à manobra de Valsava ou a uma profunda inspiração (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION; AMERICAN ACADEMY of NEUROLOGY, 1988).

A principal forma de neuropatia (80% dos casos) atinge os membros distais e é simétrica (de FREITAS *et al.*, 1992). Nesta forma de neuropatia, os sinais e sintomas se iniciam em membros como mãos e pés e tendem a piorar, afetando

membros mais proximais, demonstrando que as fibras mais longas são inicialmente comprometidas. Com o tempo, axônios mais curtos também são envolvidos, caracterizando esta forma de neuropatia como “comprimento-dependente” (DYCK *et al.*, 1993; SAID, 2007; YAGIHASHI, 1995).

1.2.2 Prevalência e Diagnóstico

O diabetes é a principal causa no mundo de neuropatias (SAID, 2007), sendo a complicação microvascular mais difícil de diagnosticar e tratar (VINIK, 2004), e a mais freqüente entre estes pacientes (YAGIHASHI *et al.*, 2007). A prevalência estimada pode variar substancialmente, dependendo do critério diagnóstico, indo de 45 (SHAW; ZIMMET, 1999) a 60% dos pacientes diabéticos (DYCK *et al.*, 1993). Além disso, as atuais estimativas são para que o número de diabéticos aumente nos próximos 20 anos, assim espera-se que a prevalência da neuropatia diabética acompanhe tal tendência (MILLAN, 1998). A mortalidade destes pacientes é elevada a índices entre 25 a 50% num período de 5 a 10 anos, a partir do início das manifestações autonômicas (LEVITT *et al.*, 1996), devido principalmente ao comprometimento da inervação autônoma cardíaca, o que pode levar à morte súbita (WADA; YAGIHASHI, 2005).

O diagnóstico do quadro é feito principalmente pela exclusão de outras patologias que afetam o sistema nervoso (VINIK; MEHRABYAN, 2004; BOULTON *et al.*, 2005), embora existam diversos exames diagnósticos, que incluem combinações de testes de sensibilidade à vibração e testes térmicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1995; VINIK, 2004).

1.2.3 Sinais e Sintomas

A polineuropatia diabética apresenta sinais e sintomas autonômicos e sensoriais (SAID, 2007), correlacionados às mudanças funcionais e estruturais dos nervos periféricos (SIMA; SUGIMOTO, 1999; YAGIHASHI, 2007). Dentre os sinais autônomos, são comuns taquicardia quando o paciente está em repouso; perda da regulação fisiológica da pressão arterial; hipotensão postural; gastroparesia, a qual

dificulta o controle glicêmico devido à paralisação dos alimentos no estômago; atonia da bexiga, que pode ser complicada por infecções devido ao volume residual de urina retido; disfunções eréteis, as quais podem ser agravadas pelas complicações vasculares e pela idade em homens diabéticos, além de respostas pupilares alteradas, dentre as quais a miose e diminuição aos reflexos luminosos (SAID, 2007).

Em relação aos sintomas sensoriais, estes podem ser divididos em positivos e negativos (SCHESTATSKY; NASCIMENTO, 2009; WOOLF; MANNION, 1999; YAGIHASHI, 2007): Quando há predominância de sintomas negativos, a doença torna-se silenciosa, caracterizada por traumas ou lesões indolores (SAID, 2007). O paciente passa a não sentir estímulos não nocivos, como vibração e toque suave, nem estímulos nocivos, demonstrando comprometimento progressivo de fibras de pequeno e grande calibre (SCHESTATSKY; NASCIMENTO, 2009). Assim, é possível dizer que há equivalência entre a perda neuronal e a ausência de sensibilidade (YAGIHASHI, 2007).

Sintomas positivos como dor, disestesias e parestesias são os primeiros a surgir durante o desenvolvimento da doença (BOULTON *et al.*, 2005; WOOLF; MANNION, 1999), resultado dos disparos ectópicos das fibras, em especial de pequeno calibre termonociceptivas (DAVIES *et al.*, 2006). Tais sintomas ocorrem quando as fibras encontram-se em processo de degeneração ou tentativa de regeneração (YAGIHASHI, 2007) e podem ocorrer em resposta a estímulos externos ou espontaneamente, na ausência de estímulo (SCHESTATSKY; NASCIMENTO, 2009). Em geral tornam-se piores à noite (BOULTON *et al.*, 2005), chegando até mesmo a comprometer o sono (MILLAN, 1999).

Por ser um dos sintomas mais debilitantes e comuns da neuropatia associada ao diabetes, o presente estudo tem especial interesse nas alterações na percepção dolorosa que acompanham essa patologia.

1.3 DOR e DOR NEUROPÁTICA

A dor é definida segundo a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, a qual está associada a lesões teciduais reais ou potenciais ou descrita em termos de tais

lesões” (MERSKEY; BODGUK, 1994). Mais especificamente, a dor é um resultado subjetivo da nocicepção, processo neural de codificação e processamento de estímulos nocivos que podem ser de diferentes naturezas (térmica, mecânica ou química). Tais estímulos ativam uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamadas nociceptores (BASBAUM *et al.*, 2009), as quais diferem quanto ao calibre, velocidade de condução e propriedades de resposta ao estímulo nocivo. Assim, são relacionados dois tipos principais de nociceptores, as fibras C polimodais, de pequeno calibre, velocidade de condução lenta, ativadas por estímulos mecânicos, térmicos e químicos e fibras A δ , de médio calibre, velocidade de condução mais rápida, as quais são ativadas preferencialmente por estímulos térmicos e mecânicos. Assim, a via nociceptiva, responsável pela transdução e transmissão do estímulo doloroso, é formada pelas fibras C e A δ que levam a informação da periferia até a medula, e também pelos tratos ascendentes que transmitem a informação da medula ao córtex, passando por regiões do tronco e o tálamo, onde a dor é processada e ganha características como intensidade, localização e qualidade (SCHESTASKY; NASCIMENTO, 2009).

A capacidade de sentir dor possui um aspecto protetor muito importante, advertindo quanto à presença de um perigo real ou iminente, evocando respostas comportamentais e reflexas para que um possível dano tecidual seja mínimo. Quando a lesão ocorre, surgem mudanças na excitabilidade de neurônios periféricos e centrais, gerando um quadro reversível de hipersensibilidade na área lesionada (hipersensibilidade primária) e no tecido adjacente (hipersensibilidade secundária) (WOOLF; MANNION, 1999). Além disto, diferentemente de outras percepções sensoriais, não há adaptação dos nociceptores ao estímulo doloroso, sendo que mesmo estímulos pouco dolorosos passam a ser interpretados de forma exacerbada quando persistem por tempo prolongado (BASBAUM; BUSHNELL, 2009).

Sendo assim, após lesão periférica, a mudança no limiar de excitabilidade neuronal e a ausência de adaptação ao estímulo podem promover o surgimento de fenômenos como hiperalgesia, definida pela percepção exacerbada frente a um estímulo normalmente nocivo, e alodinia, em que estímulos normalmente não nocivos são percebidos como dolorosos (IASP, 2011). Novamente, a função principal destes estados é proteger a área lesionada e auxiliar a recuperação do indivíduo. Entretanto, em condições patológicas, como nas dores crônicas, incluindo as de origem neuropática, a alodinia e a hiperalgesia podem ocorrer sem motivo aparente,

havendo perda da relação entre o estímulo e a sensação dolorosa (BASBAUM; BUSHNELL, 2009). Desta forma, esses tipos de dor não possuem valor adaptativo aparente e por isso, necessitam de tratamento (HUNT; MANTYH, 2001; MILLAN, 1999; WOOLF; MANNION, 1999). Especialmente pelo fato de comprometer significativamente a qualidade de vida dos pacientes e por serem refratárias ou pouco responsivas a terapêutica vigente, as dores de origem neuropática vem recebendo maior atenção nos últimos anos (KIMURA; KONTANI, 2009; RAHN, HOHMANN, 2007; SCHESTASKY; NASCIMENTO, 2009).

A dor neuropática associada ao diabetes (DND) é uma complicação que acomete cerca de um terço dos pacientes com neuropatia diabética (JENSEN *et al.*, 2006; TESFAYE, 2009). É o sintoma mais debilitante e também a principal razão para a procura de auxílio médico (TESFAYE, 2003) sendo feito em muitos casos, por meio de sua manifestação, o diagnóstico da neuropatia (DOBRETSOV *et al.*, 2010). A DND é uma forma de dor crônica (RAHN; HOHMANN, 2009), consequência de lesão ou disfunção do sistema somatosensorial (IASP, 2011) em qualquer ponto desde os terminais nociceptivos na periferia até neurônios corticais, no cérebro, devido à ativação anormal dos mecanismos de nocicepção. A DND pode surgir a qualquer momento, e tende a perdurar durante anos, sem grandes alterações em sua modalidade ou severidade. Não obstante, não existe correlação entre a duração do diabetes, grau de prejuízo glicêmico ou severidade de outros sintomas da neuropatia diabética (SORENSEN; MOLYNEAUX; YUE, 2002), diferentemente do que ocorre para a neuropatia em si.

De acordo com trabalhos prévios, sua intensidade é classificada como intensa em 30% dos casos, moderada em 50% e suave em apenas 20% dos pacientes (DAVIES *et al.*, 2006; TÖLLE; XU; SADOSKY, 2006; WU *et al.*, 2007). Agravando este fato, grande parte destes pacientes não recebe tratamento específico além do indicado para o controle glicêmico, o qual não possui efeito analgésico (ARGOFF *et al.*, 2006).

1.3.1 Tratamento Farmacológico da Dor Neuropática

O controle satisfatório da DND é um dos maiores desafios para quem sofre de diabetes (VINIK *et al.*, 2000). Em uma pesquisa no Reino Unido, 12,5% dos

pacientes com dor neuropática nunca haviam relatado seus sintomas ao médico, enquanto quase 40% nunca haviam recebido tratamento analgésico (DAOUSI *et al.*, 2003). Assim é possível relacionar a dificuldade no diagnóstico e tratamento desta condição.

Em geral a dor neuropática diabética não responde bem aos tratamentos para dor nociceptiva (ARGOFF *et al.*, 2006), como antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) e analgésicos opióides. Além disso, quando a dor é resultado do acometimento específico de determinado tipo de fibra (C ou A δ), distintas terapias são necessárias (VINIK *et al.*, 2000).

O controle farmacológico da dor neuropática diabética geralmente emprega diversas classes de drogas, tais como antidepressivos tricíclicos, fenotiazinas, AINEs, anticonvulsivantes e agentes tópicos como a capsaicina (THE CAPSAICIN STUDY GROUP, 1991), todas com eficácia limitada (BOULTON *et al.*, 2004). Dentre estes, os anticonvulsivantes, gabapentina e pregabalina são os medicamentos com maior nível de satisfação por parte dos pacientes (BOULTON *et al.*, 2004).

Apesar da diversidade de fármacos usados clinicamente, somente a duloxetina (inibidor da recaptção da serotonina e da noradrenalina) e a pregabalina são formalmente aprovados pelo FDA para o tratamento. Mesmo estes medicamentos não são totalmente efetivos e também causam diversos efeitos colaterais. Os efeitos adversos geralmente relatados com a medicação são sonolência, vertigens, náusea e constipação, embora dependendo da classe de medicamento utilizada outros efeitos como sudorese, boca seca, sedação e diminuição do apetite também possam ser relatados (para revisão: JENSEN *et al.*, 2006), além do surgimento de tolerância, quando utilizados opióides (KINGERY, 1997). Assim, há dificuldade em conciliar tratamentos que promovam efeito analgésico considerável e não causem tantos efeitos adversos (RAHN; HOHMANN, 2009; WOOLF; MANNION, 1999). Tratamentos não farmacológicos, como a terapia com laser de baixa intensidade e acupuntura vem sendo analisados, embora não tenham demonstrado efeito (BRIL *et al.*, 2011).

Finalmente, é descrito que mesmo após os diferentes tratamentos farmacológicos, menos de um terço dos pacientes alcança alívio da DND superior a 50% (JENSEN *et al.*, 2006). Assim, são necessárias alternativas para tais medicamentos (ARREOLA-ESPINO *et al.*, 2007). Neste contexto, os canabinóides podem representar uma alternativa para o tratamento da dor neuropática diabética.

1.4 CANABINÓIDES

Popularmente conhecida sob os nomes de maconha ou marijuana, a *Cannabis sativa* é uma planta cujos extratos eram amplamente utilizados em antigas civilizações, como a chinesa e indiana, em rituais religiosos e ou de modo recreativo, devido aos efeitos psicoativos, além de terem sido importantes na medicina popular destas e de outras culturas, indicados como anestésicos e analgésicos (PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006; para revisão: ZUARDI, 2006). O uso da *Cannabis* para as mais diferentes finalidades foi perpetuado por distintas populações, disseminando-se por todo o mundo através dos séculos, chegando o mundo ocidental em meados do século XIX. No início do século XX, tinturas e extratos da *Cannabis* chegaram a ser produzidos comercialmente para venda por empresas farmacêuticas, embora pouco tempo depois seu uso tenha decaído devido às questões farmacológicas como a dificuldade na obtenção de compostos estáveis e diferentes formas de preparo das tinturas, causando distintos efeitos nos pacientes, além de sanções impostas aos usuários (ZUARDI, 2006; WALKER; HUANG, 2002). Apesar disto, atualmente os canabinóides (derivados sintéticos ou naturais da *Cannabis*) vêm sendo apontados como alternativa para o tratamento de dores crônicas (PACHER; BÁTKAI; KUNOS, 2006), especialmente da dor neuropática (RAHN; HOHMANN, 2009). Isto se deve ao fato de que por meio de estudos clínicos as ações analgésicas da *Cannabis* vêm sendo redescobertas (COLLEN, 2012).

Tais estudos estão fundamentados no crescente conhecimento sobre o sistema endocanabinóide (RICE; FARQUHAR-SMITH; NAGY, 2002), no seu mecanismo de ação analgésico, o qual envolve vias centrais e periféricas (HOHMANN; HERKENHAM, 1999), além do fato da *Cannabis* ser uma droga relativamente segura, pois não existem relatos de óbitos associados ao abuso da erva (CARTER *et al.*, 2011).

Canabinóides naturais ou sintéticos atuam através da ativação de duas isoformas conhecidas de receptores canabinóides, causando vários efeitos nos tecidos alvo além da modulação da informação nociceptiva (PETROCELLIS; di MARZO, 2010). Entre as ações reguladas por estes receptores, podem ser citados efeitos tanto centrais como periféricos, como desenvolvimento neuronal, processos

neuromoduladores, metabolismo energético e sobre os sistemas reprodutor, cardiovascular e respiratório. Além disso, a ativação destes receptores por canabinóides modula atividades celulares tais como motilidade, adesão, apoptose (BOSIER *et al.*, 2010) e inibem o crescimento celular (ONAIVI; SUGIURA; di MARZO, 2006).

1.4.1 Sistema Endocanabinóide

O isolamento do principal composto psicoativo presente na maconha, chamado Δ^9 tetraidrocannabinol (Δ^9 THC), (GAONI; MECHOULAM, 1964) deu início às pesquisas que culminaram no descobrimento do sistema canabinóide endógeno (WALKER; HUANG, 2002). O sistema endocanabinóide começou a ser revelado a partir de 1990, com a descrição do primeiro receptor endógeno (CB1) (MATSUDA *et al.*, 1990), seguindo-se a isto a caracterização da anandamida (AEA), como o primeiro ligante endógeno (DEVANE *et al.*, 1992). Reconhecido como o maior sistema neuroquímico devido à grande densidade de seus receptores no SNC (HOHMANN, 2002), é composto também pelo receptor CB2, e pelos ligantes 2-araquidoniletanolamida (2-AG) (SUGIURA *et al.*, 1995), éter de noladina, virodamina e N-araquidonildopamina (NADA) (WALKER *et al.*, 2002), além da maquinaria de síntese e de degradação de seus componentes (BOSIER *et al.*, 2010; RAHN; HOHMANN, 2009). É um sistema ainda em construção, uma vez que outros receptores e ligantes são candidatos a integrá-lo (ANAND *et al.*, 2009).

1.4.2 Receptores Canabinóides

As duas principais isoformas de receptores canabinóides, CB1 e CB2, são expressas diferencialmente pelo organismo (BOSIER *et al.*, 2010) sendo o receptor CB1 expresso principalmente em tecidos neuronais, ao passo que CB2 está concentrado em células do sistema imune (BOSIER *et al.*, 2010; RAHN; HOHMANN, 2009), embora também possa ser encontrado em tecidos nervosos (ANAND *et al.*, 2008; ONAIVI *et al.*, 2006)

Ambos receptores são acoplados à proteína $G_{o/i}$, promovendo diminuição nos níveis intracelulares de AMPc (BOSIER *et al.*, 2010; RICE; FARQUHAR-SMITH;

NAGY, 2002). Com isto, ocorre mudança do padrão de expressão celular, uma vez que por meio desta via, há inibição da PKA (proteína quinase A), a qual fosforila as proteínas CREB (proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc) para iniciar a transcrição. A fosforilação de diversos tipos de quinases da família das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) também pode ser regulada pela ativação de ambas as isoformas do receptor (HOWLETT, 2005).

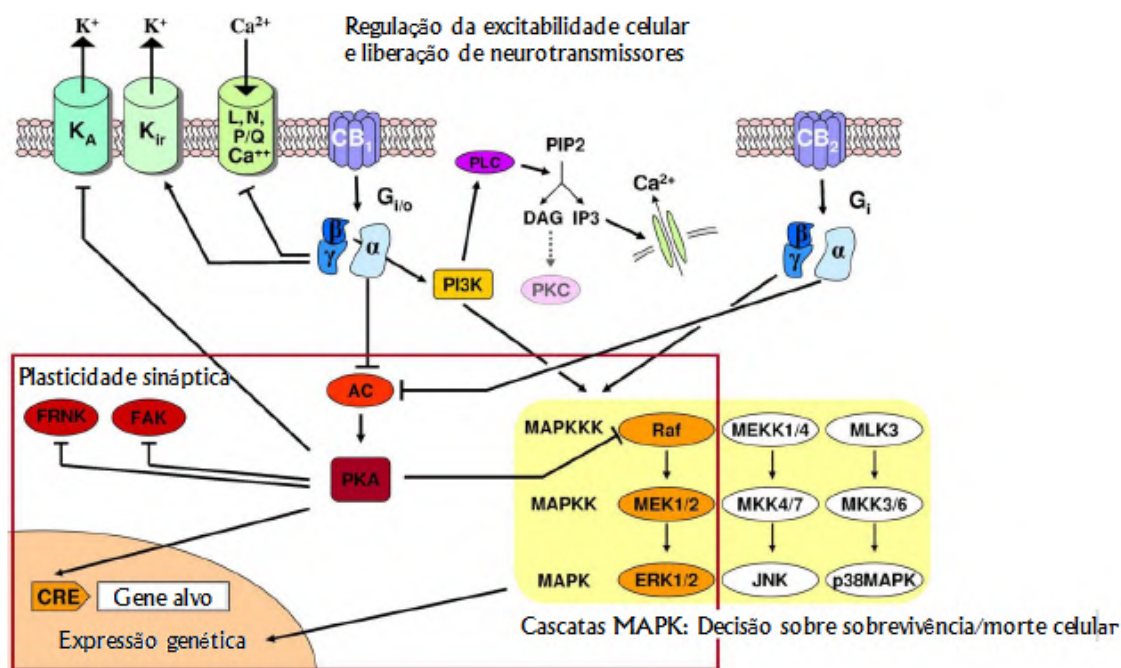


FIGURA 2: Cascatas intracelulares mediadas pela ativação de receptores CB1 e CB2. Ambos os receptores estão associados à proteínas $G_{i/o}$, promovendo redução nos níveis intracelulares de AMPc. Receptores CB1 estão também associados tanto à redução dos níveis intracelulares de cálcio pela inibição de canais do tipo L, N e P/Q, como aumento dos níveis de potássio, por meio da ativação de canais do tipo A e retificadores (Adaptado de Bosier *et al.*, 2010).

A densidade dos receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) é baixa em regiões do tronco relacionadas à frequência cardíaca e à respiração. Assim, esta distribuição explica a baixa toxicidade e a ausência de letalidade após intoxicação com maconha (RAHN; HOHMANN, 2009). Muitos dos efeitos psicotrópicos após o uso da maconha derivam da ativação central desta isoforma em regiões prosencefálicas (MONORY *et al.*, 2007; MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993; AGARWAL *et al.*, 2007), além de diversos efeitos como hipotermia, sedação, boca seca, fome e catalepsia (RAHN;

HOHMANN, 2009). Outros receptores ainda podem mediar alguns desses efeitos uma vez que animais nocaute para este receptor, tratados com AEA, apresentam atividades comportamentais semelhantes àsquelas produzidas pelo uso da droga em animais normais (BOSIER *et al.*, 2010).

Estes receptores canabinóides estão presentes em grande quantidade em sítios relacionados ao controle endógeno da informação nociceptiva, como na substância cinzenta periaquedutal (PAG) e bulbo rostroventromedial (RVM) (TSOU *et al.*, 1998). Na medula espinhal estão concentrados nas lâminas superficiais do corno dorsal (lâminas I e II_{interna}) e no funículo lateral (WALKER; HUANG, 2002; RICE; FARQUHAR-SMITH; NAGY, 2002). Na periferia, localizam-se no gânglio da raiz dorsal (DRG) (AHLUWALIA *et al.*, 2000) e nos terminais dos aferentes primários (WALKER; HOHMANN, 2005).

Os diversos efeitos celulares advindos da ativação de CB1 são mediados pela ativação preferencial de certos efetores pela proteína G (BOSIER *et al.*, 2010). Assim, são descritos ações modulatórias sobre canais iônicos, especialmente de Ca⁺⁺ e K⁺. A condutância ao íon cálcio pode ser suprimida através do fechamento de canais voltagem dependente do tipo L, N e P/Q. Canais de potássio do tipo A e retificadores são abertos, promovendo a saída do cátion. Assim, há hiperpolarização, não ocorrendo liberação de neurotransmissores. Pode haver também aumento dos níveis de cálcio intracelulares, por meio da ativação da fosfolipase C do tipo β (PLC- β) (BOSIER *et al.*, 2010).

Tem-se demonstrado recentemente que este receptor pode ser encontrado na forma de homo ou heterodímeros, resultando em configurações de ligação e sinalização diferenciadas daquelas apresentadas pelo monômero (BOSIER *et al.*, 2010; HUDSON; HEBERT; KELLY, 2009). Os receptores CB1 estão normalmente restritos às terminações nervosas, sugerindo possível envolvimento na modulação pré-sináptica da liberação de neurotransmissores (LOVINGER, 2008), atuando tanto sobre sinapses excitatórias como inibitórias, de forma cálcio independente (VAUGHAN *et al.*, 2000).

A segunda forma caracterizada de receptor canabinóide possui 44% de homologia em relação à CB1 (RICE; FARQUHAR-SMITH; NAGY, 2002). Estão pouco presentes no SNC, mais concentrados em tecidos imunes (RICE; FARQUHAR-SMITH; NAGY, 2002). Por isso especula-se a importância de tais receptores no efeito analgésico durante processos inflamatórios (WALKER; HUANG,

2002; RICE; FARQUHAR-SMITH; NAGY, 2002), uma vez que a ativação de tais receptores em mastócitos promove queda da atividade celular, e essa ação pode ser interessante sobre o controle da liberação de histamina e NGF (fator de crescimento neuronal) (MALAN *et al.*, 2001; RACZ *et al.*, 2008; RICE *in* BOUNTRA, *et al.*, 2002).

Sua ativação inibe a atividade da adenilato ciclase, mas diferentemente da isoforma CB1, parece não atuar sobre canais iônicos (RICE; FARQUHAR-SMITH; NAGY, 2002).

Evidências indicam a existência de receptores canabinóides ainda não identificados, chamados receptores não CB1/ não CB2. Tais evidências se baseiam na presença de ações farmacológicas residuais após a administração de antagonistas CB1 ou CB2 (RICE; FARQUHAR-SMITH; NAGY, 2002) ou após a administração de agonistas em animais nocaute (di MARZO *et al.*, 2000). Embora haja a sugestão de que certas proteínas G, tais como GPR55 (RYBERG *et al.*, 2007) e GPR119 (OVERTON *et al.*, 2006), possam atuar como receptores, ainda não há consenso sobre o assunto, uma vez que a ativação destas proteínas não promove os mesmos efeitos relacionados aos chamados receptores não CB1/não CB2 (HILEY; KRAUP, 2007).

Além disso, os canabinóides, devido à sua característica lipofílica, podem interagir com componentes de membrana, como proteínas e enzimas, uma vez que certas ações não seriam mediadas pela ativação de seus receptores (para revisão: MAKRYANNIS; RAPAKA, 1990).

1.4.2.1 Ligantes Endógenos

Dentre os vários endocanabinóides já descritos, a AEA e o 2-AG são os mais estudados, sendo AEA mais intensamente investigada quanto aos efeitos analgésicos (RICE; FARQUHAR-SMITH; NAGY, 2002). Ambos são agonistas pra receptores CB1 e CB2, embora possuam maior afinidade por CB1 (PERTWEE; ROSS, 2002). A AEA, além de se ligar a receptores canabinóides, pode ser um agonista também para receptores do tipo TRPV1(RICE; FARQUHAR-SMITH; NAGY, 2002).

São produzidos e liberados sob demanda de forma Ca^{++} dependente, não sendo estocados em vesículas. Sua formação ocorre através da ação de

fosfolipases específicas sobre fosfolídeos de membrana: uma fosfolipase D catalisa a formação de AEA e ácido fosfatídico, a partir da clivagem do NAPE (N-araquidonilfosfatidiletanolamida), enquanto que uma fosfolipase C gera 2-AG a partir de DAG (HOHMANN; SUPLITA, 2006).

Um sistema proteico de transporte é responsável pela retirada dos endocanabinóides da fenda sináptica, interrompendo assim sua ação sobre os receptores canabinóides (GIUFFRIDA; BELTRAMO; PIOMELLI, 2001). A atividade destes mediadores é rapidamente interrompida pela maquinaria de degradação intracelular (ANAND *et al.*, 2009), composta pelas enzimas FAAH (amida hidrolase de ácidos graxos) ou MGL (monoacil glicerol lipase), responsáveis pela hidrólise da AEA e 2-AG, respectivamente (RAHN; HOHMANN, 2002). Entretanto, devido à comunicação entre sistemas distintos, sabe-se que estes canabinóides podem também ser degradados pela ciclooxygenase 2 (RAHN; HOHMANN, 2002).

1.5 CANABINÓIDES, ENDOCANABINÓIDES E DOR

Os efeitos analgésico e antinociceptivo dos canabinóides tem sido extensivamente explorado em modelos animais de dor aguda (fásica ou tônica) e crônica (para revisão ver PERTWEE, 2001). Mais ainda, os efeitos antinociceptivos dos canabinóides tem sido descritos como comparáveis aos efeitos dos opióides não só quanto à sua potência como também quanto à eficácia, algumas vezes superior à desta famosa classe de analgésicos (CALIGNANO *et al.*, 1998; WALKER; HUANG, 2002). Ademais, os endocanabinóides parecem mediar o efeito analgésico de outras drogas (MALLET *et al.*, 2008).

Acredita-se que durante estados patológicos tais como certos tipos de inflamações e neuropatias, o nível plasmático de endocanabinóides como AEA e 2AG esteja aumentado (KAUFMANN *et al.*, 2009), o que pode indicar sua importância como moduladores antinociceptivos (CLAPPER *et al.*, 2010).

Dentre os diversos estudos, é de relevância para esse estudo observar que a administração periférica na pata de camundongos de AEA foi capaz de reduzir significativamente os comportamentos nociceptivos induzidos pela injeção de formalina durante a primeira fase do teste, ação esta mediada por receptores periféricos do tipo CB1 (CALIGNANO *et al.*, 1998). Em ratos, a administração

também periférica de AEA (doses na faixa de pmol) mostrou-se eficaz em prevenir ambas as fases da formalina, efeito este mediado pelos receptores CB1 e CB2 (GUINDON *et al.*, 2006). Esse efeito antinociceptivo da AEA parece depender da ligação da mesma a sítios periféricos, uma vez que a administração de AEA radiomarcada nas patas de ratos demonstrou-se restrita ao sítio de injeção (CALIGNANO *et al.*, 1998). Quando utilizada de forma sistêmica por Jaggar e colaboradores, (1998), a AEA em todas as doses utilizadas (5 a 25 mg/Kg) foi capaz de atenuar o escore de comportamentos nociceptivos durante apenas a segunda fase do teste da formalina. Em modelo de dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático, a AEA, administrada no pata ipsilateral à constrição, reduziu a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica (GUINDON; BEAULIEU, 2006). Por via sistêmica, a AEA, via ação sobre receptores do tipo CB1, também exerceu atividade antinociceptiva, reduzindo a hiperalgesia mecânica em animais submetidos à constrição do nervo ciático (HELYES *et al.*, 2003).

Drogas que interferem nos mecanismos de recaptção de AEA endógena, como o AM404, têm sido igualmente testadas em modelos experimentais de dor. Assim, a chamada “canabimimese indireta”, ou seja, a ativação do sistema endocanabinóide por meio de drogas que aumentem a biodisponibilidade de agonistas endógenos estritamente nos tecidos em que haja tal necessidade evitaria o surgimento de efeitos adversos e manteria a atividade analgésica desejada. O AM404 é uma droga que se encaixa neste perfil (ASHTON, 2008). Sendo assim, a administração sistêmica de AM404 foi capaz de promover a redução do número de comportamentos nociceptivos durante a primeira fase do teste da formalina (HASANEIN; SOLTANI, 2009; BORSANI *et al.*, 2007). Além disso, foi capaz de reduzir neurônios positivos para Fos (um marcador de ativação neuronal) nas lâminas superficiais do corno da raiz dorsal de ratos. Ambos os efeitos foram dependentes de CB1 e CB2 (BORSANI *et al.*, 2007). Adicionalmente, a administração sistêmica crônica (durante 7 dias) de AM404 foi capaz de reduzir a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica, de maneira dose dependente, em animais submetidos à constrição do nervo ciático. Esse efeito parece estar associado a redução da produção de óxido nítrico e citocinas como o TNF α , ambos envolvidos com o processo apoptótico presente no desenvolvimento de quadros de dor crônica (COSTA *et al.*, 2006).

O tratamento periférico com análogos estruturais da AEA, ACEA (agonista

seletivo para receptores do tipo CB1) ou methAEA (agonista misto CB1/CB2), promove efeitos antinociceptivos sobre a hiperalgesia e alodinia mecânica induzida pela administração de CFA em ratos, um modelo de dor inflamatória. Tais efeitos são mediados por receptores CB1, os quais após sua ativação, induzem o decréscimo no número de disparos das fibras A δ quando o estímulo mecânico é apresentado (POTENZIERI *et al.*, 2008). Não obstante, além das fibras A δ , as fibras C também tem seu funcionamento alterado quando estimuladas eletricamente, na presença de tratamento intratecal com ACEA. Tal resposta é mediada também pela ação do ACEA sobre receptores CB1, sugerindo-se que tal ativação iniba a liberação de glutamato em sinapses no corno dorsal (KELLY; CHAPMAN, 2001). Um outro trabalho indica que a utilização de ACEA de modo sistêmico diminui comportamentos nociceptivos como vocalização, atividade mediada por receptores CB1, além de reduzir o tempo dispendido com comportamentos nociceptivos em ambas as fases do teste da formalina (MALLET *et al.*, 2008).

Embora bem caracterizado o potencial antinociceptivo dos canabinóides e endocanabinóides em modelos de dor neuropática associada a lesão de nervos periféricos como exposto acima, pouco se tem explorado acerca deste efeito em modelos de dor neuropática associada ao diabetes, evidenciado pelo pequeno número de publicações envolvendo dor neuropática diabética e canabinóides. Neste sentido, demonstrou-se que o agonista misto sintético WIN55,212-2, quando administrado de forma periférica (30 μ g/pata) e sistêmica (3 e 10 mg/Kg) reduziu a alodinia mecânica em ratos diabéticos (DRÖGUL *et al.*, 2004; ULUGOL *et al.*, 2004). Adicionalmente, a administração de Δ^9 -THC por via oral foi mais ativo no teste de retirada de cauda em camundongos diabéticos quando comparado às respostas exibidas por camundongos normoglicêmicos (WILLIAMS *et al.*, 2008).

1.6 DIABETES QUIMICAMENTE INDUZIDO por ESTREPTOZOTOCINA

O diabetes pode ser induzido quimicamente em animais experimentais pela administração de estreptozotocina (STZ) ou aloxana (SZKUDELSKI, 2001), sendo a primeira seja empregada muito mais frequentemente (SIMA, 2000). Ambas produzem danos intracelulares por meio da geração de espécies reativas de oxigênio, embora cada uma promova tal efeito por vias distintas (SZKUDELSKI,

2001).

A STZ é um agente antimicrobiano, produzido pelo fungo *Streptomyces achromogenes*, que tem sido utilizada como quimioterápico alquilante. Em ratos adultos, a administração de STZ induz respostas de aumento da glicose e diminuição da produção de insulina compatíveis com o DMI. O padrão de destruição das células beta pancreáticas após a administração de STZ é característico de morte por necrose celular enquanto que nas respostas autoimunes associadas ao DM I, a morte das células beta é o resultado de processos apoptóticos, sem a liberação de insulina a partir do rompimento dos grânulos secretores. Adicionalmente, a STZ pode ser empregada na indução de DM II em ratos neonatos (PORTHA et al., 1974), podendo também ser administrada em dose única ou repetida, por diferentes vias de administração (SZKUDELSKI, 2001).

Alterações específicas nos níveis de glicose e insulina ocorrem após a administração de STZ, caracterizando a falha das células β : primeiramente há hiperglicemia, com queda nos níveis de insulina. Poucas horas após, segue-se o surgimento de hipoglicemia, devido à grande liberação de insulina por degranulação das vesículas secretoras de insulina. Por fim, o quadro hiperglicêmico se instala com a queda nos níveis de insulina sérica (WEST et al., 1996).

O mecanismo pelo qual a STZ danifica as células produtoras de insulina se deve pela sua absorção por meio de transportadores de glicose GLUT2, expressos na superfície das células beta pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001). A atividade intracelular da STZ culmina em alquilação de bases nitrogenadas que compõem o DNA, promovendo morte celular (ELSNER et al., 2000). Além disso, a STZ, após sua metabolização dentro da célula, torna-se um doador de óxido nítrico (NO), agentes este que pode ser um dos responsáveis pela toxicidade da mesma às células beta (KRÖNCKE et al., 1995). Outras espécies reativas como o ânion superóxido também são geradas, contribuindo para o efeito deletério sobre o material genético das células β (BEDOYA et al., 1996). Acredita-se que não somente o efeito direto sobre as bases nitrogenadas no DNA, mas também o NO e as espécies reativas de oxigênio promovam a destruição das células β de forma sinérgica (SZKUDELSKI, 2001).

Com base no exposto acima, o presente estudo tem como objetivo a investigação do potencial antinociceptivo da anandamida e de drogas que interferem no sistema endocanabinóide quando administradas periféricamente em modelo de

dor neuropática associada ao diabetes quimicamente induzido por estreptozotocina.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do tratamento com drogas que ativam o sistema endocanabinóide sobre comportamentos nociceptivos induzidos pela injeção de formalina em ratos normais ou com diabetes induzido quimicamente por estreptozotocina, caracterizando farmacologicamente os receptores canabinóides envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizando animais normoglicêmicos ou animais com diabetes quimicamente induzido por STZ, o presente estudo pretende investigar:

1) as respostas nociceptivas induzidas pela injeção de formalina, confirmando a presença de hiperalgesia química decorrente da neuropatia diabética;

2) o efeito do tratamento ipsilateral na região subcutânea da superfície dorsal da pata com AM404 (inibidor da recaptção da anandamida), anadamida (AEA; agonista endógeno misto CB1/CB2) e ACEA (agonista seletivo para receptores CB1) sobre a nocicepção induzida por formalina;

3) Investigar a participação dos receptores canabinóides periféricos do tipo CB1 e CB2 no efeito antinociceptivo das diferentes drogas que interferem no sistema canabinóide (AM404, AEA e ACEA) sobre a hiperalgesia química induzida por formalina.

1. Introduction

Pain is one of the most common symptoms in patients with diabetic neuropathy, but its prevalence is still uncertain and directly influenced by the diagnostic criteria used, ranging from 5 to 15% (Calcutt and Backonja, 2007). Diabetic neuropathic pain can occur with or without concurrent sensory loss, which is extremely debilitating and may be responsible for severe morbidity, decrease on quality of life and reduction in social interactions (Ahroni et al., 1994). Pain manifestations in diabetic patients may be spontaneous or occur in response to normally innocuous (allodynia) or noxious (hyperalgesia) stimuli. Pathogenesis of these sensory changes related to painful diabetic neuropathy remains unclear, and treatment options are currently limited to palliative drugs belonging to a variety of pharmacologic classes, i.e. opioids, tricyclic antidepressants, serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors, sodium channel blockers (Argoff et al., 2006) and antiepileptics (Hardy et al., 2007; Shakher and Stevens, 2011). Topical agents as lidocaine and capsaicin are also recommended (Argoff et al., 2006). There is evidence that even after different therapeutical approaches, only one third of patients with diabetic neuropathic pain get pain relief exceeding 50% (Jensen et al., 2006), remaining a challenge for health professionals.

Accordingly, the endocannabinoid system has been named as one of the most promising target of chronic pain pharmacotherapy (Di Marzo and Petrocellis, 2006) including neuropathic pain states (Ahmed et al., 2010; Guindon and Beaulieu, 2006; Hasanein and Soltani, 2009). The endocannabinoid system comprises endogenous cannabinoid receptor ligands such as N-arachidonoyl ethanolamide (anandamide; Devane et al., 1992) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG; Sugiura et al., 1995), both CB1 and CB2 cannabinoid receptors (Matsuda et al., 1990), enzymes that catalyze the endocannabinoids synthesis, N-acylphosphatidylethanolamide-specific phospholipase D (Di Marzo et al., 1994) and diacylglycerol lipase (Piomelli, 2003), enzymes responsible for degradation, fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase (Piomelli, 2003), and endocannabinoids reuptake transporters (for review see Guindon and Hohmann, 2009).

The analgesic and antinociceptive properties of cannabinoids have been extensively reported using animals models of acute, tonic, inflammatory, visceral and

neuropathic pain (for review see Guindon and Hohmann, 2009; Pertwee, 2001). However, studies aimed to investigate the effectiveness of cannabinoids in neuropathic pain states involved mostly models of mechanical injury to peripheral or spinal nerves (Bridges et al., 2001) and little is known about the effect of these compounds on diabetic neuropathic pain (Hasanein and Soltani, 2009; Toth et al., 2010; Ulugol et al., 2004), which is the aim of the present study. Considering the systemic effects observed after cannabinoids/endocannabinoids treatment, i.e. altered perception, motor disturbances, cardiorespiratory effects, and others (for review see Ashton, 2001), the present study aims to investigate the potential antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system (injected subcutaneously into the dorsal surface of the ipsilateral hind paw) on chemical hyperalgesia induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats.

2. Material and Methods

2.1 Drugs and solutions

Streptozotocin (STZ) from Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA and sodium citrate from Merck S.A. Indústrias Farmacêuticas (Brazil) were used. N-arachidonylethanolamide (anandamide, an endogenous CB1/CB2 cannabinoid agonist); arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA, a potent and highly selective CB1 receptor agonist); N-(4-hydroxyphenyl) arachidonylethanolamide (AM404, an inhibitor of anandamide reuptake); 1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamide trifluoroacetate (AM251, a CB1 receptor inverse agonist) and 6-iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl](4-methoxyphenyl)methanone (AM630, a CB2 receptor antagonist) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Anandamide (AEA) and ACEA were freshly diluted in 0.9% NaCl. AM251 was diluted in a solution of 4:1 of dimethylformamide and heated saline; AM630 was diluted in a solution 9:1 of saline and dimethylformamide, and 1% tween 80, 0.25% ethanol in saline was used to dissolve AM404.

2.2 Animals

Adult male Wistar rats, provided by the Federal University of Paraná colony, weighing

between 180 and 230 g were used. Animals were housed in plastic cages (41x32x16.5 cm) with five rats per cage and food and water available *ad libitum*. They were maintained in a temperature-controlled room ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) under 12h/12h light/dark cycle (lights on at 7 am). All the behavioral experiments were conducted during the light phase of the cycle (between 9 am and 4 pm). The study was conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication #8023, revised 1978) and approved by the local Ethics Committee (CEUA/BIO-UFPR; #423). All efforts were made to minimize the number of rats and their suffering.

2.3 Induction of Diabetes

Experimental diabetes was induced following an overnight fast by a single intraperitoneal (i.p.) injection of streptozotocin (STZ) at dose of 50 mg/Kg, freshly dissolved in citrate buffer (10 mM, pH 4.5). Hyperglycemia was confirmed 3 days after STZ administration by a strip operated reflectance meter in a blood sample obtained by tail prick and confirmed again at ending of the study. Non-fasting blood glucose levels of 250 mg/dL or greater were considered diabetes. All animals were observed daily and weighed regularly during the experiment.

2.4 Nociceptive testing (chemical hyperalgesia)

Chemical hyperalgesia was assessed as described elsewhere (Ramos et al., 2007). Briefly, rats were acclimated for at least 15 minutes to the testing environment by placing them in the formalin test apparatus (an inverted 280 mm wide 400 mm high glass funnel) with a mirror positioned at an angle of 45° to allow unhindered observation of the animals' paws. Each animal received a single formalin injection (0.5%, 50 μL) into the dorsum of the one hind paw after different treatments and was then placed in the formalin test apparatus. Defined flinches were scored immediately after the formalin injection and continued for the next 60 minutes, divided into periods of 5 minutes with phases defined as the following time bins: phase I, 1–10 min post injection; quiescent phase, 10–15 min post injection; and phase II, 15–60 min post injection. Comparisons of behavior during each phase were made by summing the flinches recorded at measurement points within the phase.

2.5 Experimental procedures

Rats were maintained untreated for the first 4 weeks after diabetes induction by STZ injection, at which time the occurrence of chemical hyperalgesia induced by formalin was confirmed. Control (normoglycemic) rats were tested in parallel. To evaluate the potential antinociceptive effect of peripheral treatment of cannabinoids on the chemical hyperalgesia induced by formalin in both experimental groups (normoglycemic and diabetic), AM404 (doses of 50, 75 and 150 μg), AEA (doses of 0.03, 0.1, 0.3 and 1 μg) or ACEA (doses of 10, 30 and 100 μg) were injected subcutaneously into the dorsal surface of the ipsilateral hind paw, in a volume of 50 μL , 20 min before the formalin injection (0.5%, 50 μL). To characterize the cannabinoid receptors involved in the antinociceptive effect of AM404, AEA over the chemical hyperalgesia induced by formalin, AM251 (150 μg) or AM630 (25 μg) was injected by the same route, in volume of 30 μL , 10 min before the AM404 or AEA (effective doses, in 30 μL). Twenty minutes later, rats were ipsilaterally stimulated with formalin injection (0.5%, 50 μL). The role of CB1 receptors in the antinociceptive effect of ACEA was tested using AM251 (150 μg in 30 μL , 10 min before ACEA). As previously described, 20 min after ACEA treatment, Ngl and Dbt animals received formalin ipsilaterally (0.5%, 50 μL). Control groups received the corresponding vehicle (at same volume) followed by formalin (0.5%, 50 μL). The doses and treatment schedules were based on previous studies (Guindon and Beaulieu, 2006; Guindon et al., 2007a; Guindon et al., 2007b; Kelly et al., 2003; Negrete et al., 2011; Quartilho et al., 2003; Reis et al., 2011) and pilot experiments in our laboratory. Although all experiments were carried out by an observer blind to drug treatments, the experimenter could not be blind to normoglycemic and diabetic groups.

2.6 Statistical Analyses

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) for groups of 6-10 animals. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test was used to determine differences among experimental groups and Student t-test when comparison was made between two experimental groups (figure 1, panel B). The level of significance was set at $p < 0.05$. All the tests were carried out using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1 Exaggerated formalin-evoked flinching behavior in diabetic rats.

Both diabetic and normoglycemic rats exposed to 0.5% formalin displayed a biphasic pattern of flinch behavior (Figure 1, panels A and B). As shown in Figure 1 (panel A), the diabetic group presents tendency of increased responses during all phases. However, the statistical difference was significant ($p < 0.05$) just during the period from 10 to 30 minutes. When analyzed as sum of flinches, diabetic rats showed a significant ($p < 0.05$) increase in the flinching frequency induced by formalin in first and second phases of the test when compared to normoglycemic rats (60 and 67%, respectively; Figure 1, panel B), indicating a clear chemical hyperalgesia in these animals. Based on these results, within the following studies, the effect of different treatments was analyzed and graphically represented in first and second phases of the formalin test.

3.2 Effect of AM404 on flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats

Initially, the peripheral effect of increasing doses of AM404, an anandamide reuptake inhibitor, was tested over chemical hyperalgesia induced by formalin in both normoglycemic and 4-weeks diabetic rats. As shown in the Figure 2 (panels A, B, C and D), the peripheral pretreatment with AM404 (50 $\mu\text{g/paw}$) significantly ($p < 0.05$) attenuated the flinching behavior during both first (1P) and second phase (2P) of formalin test in normoglycemic (1P=57%; 2P=64%) and diabetic rats (1P=40%; 2P=60%). The treatment of normoglycemic rats with higher doses (75 or 150 $\mu\text{g/paw}$) induces a significant ($p < 0.05$) antinociception only during the second phase of formalin test (67 and 36% respectively; Figure 2; panel B). Additionally, the peripheral administration of AM404 at dose of 75 $\mu\text{g/paw}$ induces a significant reduction ($p < 0.05$) of formalin-induced flinches during the first and second phases of test in diabetic rats (27 and 56%, respectively, Figure 2, panels C and D). Finally, when the highest dose of AM404 (150 $\mu\text{g/paw}$) was administered in Dbt rats, first and second phases were not altered (Figure 2, panels C and D). Control experiments were conducted with a single administration of AM404 (150 $\mu\text{g/paw}$) in normoglycemic and diabetic rats without formalin challenge. It was observed that intraplantar injection of AM404 did not induce any nociceptive responses (flinching or licking behaviors; data not shown).

3.3 Effect of treatment with AM251 and AM630 on the antinociceptive effect of AM404 over flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats

As shown in Figure 3, the antinociceptive effect of AM404 (50 µg/paw) was significantly ($p < 0.05$) prevented by pretreatment with CB1 receptor inverse agonist, AM251 (150 µg/paw) during the first phase of formalin test on normoglycemic rats (panel A) and during both phase I and phase II in diabetic rats (panels C and D). Additionally, the antinociceptive effect of AM404 (50 µg/paw) was also significantly prevented by a CB2 receptor antagonist, AM630 (25 µg/paw) only in the second phase ($p < 0.05$) of the formalin test in diabetic rats (Figure 4; panel D). When the tested doses of AM251 (150 µg/paw) or AM630 (25 µg/paw) were given alone to normoglycemic or diabetic rats, they had no effect on flinching behavior induced by 0.5% formalin (data not shown). Moreover, when AM251 or AM630 (same doses and route described above) was given alone, they did not evoke any flinch behavior (data not shown).

3.4 Effect of anandamide (AEA) on flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats

As demonstrated in Figure 5 (panels A, B, C and D), peripheral administration of AEA (0.1 µg/paw) significantly ($p < 0.05$) reduced first and second phases of formalin-induced nociception in normoglycemic (43 and 70%, respectively) and in diabetic rats (46 and 78%, respectively). Pre-treatment with higher doses of AEA (0.3 or 1 µg/paw) was able to significantly ($p < 0.05$) reduce the second phase of formalin-induced flinches only in normoglycemic rats (72 and 64%, respectively; Figure 5, panels A and B). An additional dose of AEA (0.03 µg/paw) was tested in the both groups and this treatment was able to reduce ($p < 0.05$) only the first phase of formalin-induced nociception in normoglycemic animals (45%, Figure 5, panel B). Pre-treatment with higher dose of AEA (3 µg/paw) on normoglycemic and diabetic groups did not produce any significant effect over the formalin-induced flinches in both phases (data not shown).

3.5 Effect of AM251 and AM630 on the antinociceptive effect of AEA over flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats

As shown in Figure 6 (panels A, B, C and D), the antinociceptive effect produced by

AEA (0.1 $\mu\text{g/paw}$) injection was blocked ($p<0.05$) during the phase 1 and phase 2 of the formalin test if both experimental groups (diabetic and normoglycemic rats) were pre-treated with a CB1 receptor inverse agonist, AM251 (150 $\mu\text{g/paw}$). Additionally, the antihyperalgesic effect of AEA (0.1 $\mu\text{g/paw}$) was also significantly ($p<0.05$) prevented by a CB2 receptor antagonist, AM630 (25 $\mu\text{g/paw}$) only in the second phase of the formalin test in normoglycemic and diabetic rats (Figure 7; panels B and D).

3.6 Effect of ACEA on flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats

Next, it was investigated the effect of peripheral treatment with highly selective CB1 receptor agonist ACEA on formalin-induced flinching behavior in normoglycemic and diabetic rats. As shown in figure 8 (panels A and B), the administration of increasing doses of ACEA (10, 30 or 100 $\mu\text{g/paw}$) significantly ($p<0.05$) reduces the flinching frequency induced by formalin in first (28, 48 and 63%, respectively) and second phases (61, 50 and 43%, respectively) of the test in the normoglycemic rats. In diabetic rats, the treatment with the higher doses of ACEA (30 or 100 $\mu\text{g/paw}$) induces similar pattern of antinociception, i.e. significant ($p<0.05$) reduction of formalin-evoked flinches in both first (61 and 87%, respectively) and second phase (30 and 29%, respectively; Figure 8, panels C and D). However, the treatment of diabetic rats with lower dose of ACEA (10 $\mu\text{g/paw}$) induces significant antinociception only during the second phase of formalin test (42%, $p<0.05$; Figure 8, panel D).

3.7 Effect of AM251 on the antinociceptive effect of ACEA over flinching behavior induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats

As shown in Figure 9 (panels A, B, C and D), the antinociceptive effect produced by ACEA (30 $\mu\text{g/paw}$) was significantly ($p<0.05$) prevented during the phase I and phase II of the formalin test if both experimental groups (normoglycemic and diabetic rats) were pre-treated with a CB1 receptor inverse agonist, AM251 (150 $\mu\text{g/paw}$).

4. Discussion

The key finding of the present study is that drugs that influence the endocannabinoid system when administered peripherally induced significant antinociceptive effects over chemical hyperalgesia in streptozotocin (STZ)-induced

diabetic rats, reinforcing the importance of a previous description about outside CNS located cannabinoid receptors as first targets to produce antinociception (Agarwal et al., 2007). As described in earlier investigations (Arreola-Espino et al., 2007; Corteix et al., 1998; Hasanein, 2011), the current study demonstrated that diabetic rats exhibit increased formalin-evoked flinching behavior compared to normoglycemic rats in both phases of formalin test (Figure 1), suggesting a hyperalgesic behavior in response to noxious stimuli that may model features of painful diabetic neuropathy. Reinforcing this, STZ-diabetic rats have also low or no responsiveness to opioid treatment such as morphine, another important aspect of neuropathic pain. Thus, it was observed in additional experiments that peripheral treatment of diabetic rats with morphine at usual dose of 10 μ g/paw (Torres-López et al., 2007) did not induce any change in flinching behaviors induced by formalin during first or second phases of the test [phase I: diabetic vehicle (DV = 115 ± 14.9 , n=7) and diabetic morphine (D MPH = 168.0 ± 25.3 , n=7); phase II: DV = 382.89 ± 43.4 , n=5 and D MPH = 339.0 ± 60.4 , n=7]. It is important to point out the same treatment in normoglycemic group was able to significantly prevent the second phase of formalin-evoked flinching behavior [phase I: normoglycemic vehicle (NV = 58.9 ± 9.1 , n=8) and normoglycemic morphine (N MPH = 35.3 ± 7.1 , n=7; p=0.067); phase II: NV = 176.9 ± 40.8 , n=8 and N MPH = 22 ± 7.2 , n=7; p=0.004].

The formalin test was introduced by Dubuisson and Dennis in 1977 and is commonly used to evaluate the capacity of drugs to reduce pain states (Tjølsen et al., 1992). Formalin injection into the rat hindpaw evokes long lasting nociceptive behaviors (Dubuisson and Dennis, 1977) with an array of stereotyped behaviors, including flinching (consisting of an elevation and shrinking back of the injected paw, Ashmawi et al., 2003) which occurs in a biphasic pattern (Borsani et al., 2007; Hasanein, 2011). There is an initial acute period (phase I, duration of approximately 10 min), and after a short period of remission (quiescent period), phase II begins and consists of a longer period (45 min) of sustained activity (Borsani et al., 2007). The initial response is associated with direct and acute activation of C fibers (Dickenson and Sullivan, 1987) and late phase is attributed to the release of local endogenous mediators responsible for sensitization of primary and spinal sensory neurons and subsequent activation of the nociceptors (Rosland et al., 1990), with a continuous firing of early activated fibers (Puig and Sorkin, 1996).

Previous studies have already shown that rats exhibited exaggerated flinching

after paw formalin injection from first week after diabetes induction and that this hyperalgesia increased with duration of diabetes, peaking after 4 weeks (Ramos et al., 2007). For this reason, in the present study rats were tested 4 weeks after hyperglycemia onset. Compared with normoglycemic rats, diabetic animals exhibited significant increase on flinch frequency in phase I and phase II of formalin test (Figure 1, panel B). It has been proposed that these amplified responses during different phases of formalin test were strictly correlated to the concentration of formalin used. Thus, it has already reported that diabetic rats exhibit exaggerated nociceptive behaviors notable only during quiescent period (Ceseña and Calcutt, 1999) or just during the second phase (Ramos et al., 2007) after higher concentration (5%) of formalin injection. In our study, we chose a lower concentration of formalin (0.5%) so we could investigate the peripheral effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system in both phases of the formalin test in normoglycemic and diabetic rats.

First, we investigated the potential antinociceptive effect of AM404, an endogenous endocannabinoid reuptake inhibitor, over the formalin-induced flinching behavior in normoglycemic and diabetic rats. It was observed that the peripheral injection of the lowest dose of AM404 (50 $\mu\text{g/paw}$) induced a significant antinociceptive effect in both first and second phase of formalin test in normoglycemic and diabetic rats (Figure 2). At higher doses (75 and 150 $\mu\text{g/paw}$), AM404 was able to reduce just the second phase of formalin-evoked flinches in normoglycemic rats. In contrast, diabetic rats treated with AM404 at dose of 75 $\mu\text{g/paw}$ had significant reduction on flinching during the first and second phase of formalin test. The antinociceptive effect of systemic treatment with AM404 has already been reported in models of acute, persistent, inflammatory (Borsani et al., 2007) and neuropathic pain induced by chronic constriction injury of sciatic nerve (La Rana et al., 2008). It has proposed advantages in relation of the use of agents that indirectly increase endocannabinoids levels as AM404 since the incidence of psychoactive effects of cannabinoids is reduced (Ashton, 2008). The antinociceptive effect of AM404 has been related to the impediment of endocannabinoid transport, responsible to reuptake AEA and 2-AG (Ashton, 2008), thus increasing endocannabinoid-mediated modulation of pain (Hillard and Campbell, 1997). AM404 is also able to decrease the number of *Fos*-positive neurons in superficial

layers on dorsal root ganglia after paw formalin injection (Borsani et al., 2007), a possible signal of negative modulation of nociceptive input and consequently, a reduction of nociceptive behaviors. Additionally, the AM404 ability of binding and activation of pro nociceptive transient receptor potential cation-channel subfamily V member 1 (TRPV1 receptors; Zygmunt et al., 2000) can explain the lack of antinociceptive effect after higher doses of AM404 injection (150 μ g/paw) of AM404.

Next, it was investigated the role of CB1 and CB2 receptors on the antinociceptive effect of AM404 in normoglycemic and diabetic rats. The pretreatment with a CB1 receptor inverse agonist AM251 was able to prevent the antinociceptive effect of AM404 during the first phase of formalin test in normoglycemic rats (Figure 3, panels A and B) and both phases of the test in diabetic rats (Figure 3, panels C and D). Subsequent experiments using AM630, a CB2 antagonist, showed that this receptor subtype did not mediate the antinociceptive effect of peripheral AM404 on normoglycemic animals (Figure 4, panels A and B). On the other hand, in the diabetic rats, this receptor subtype appears to be crucial to the antinociceptive effect of AM404 during inflammatory phase (phase II) of formalin-evoked flinching behavior. This discrepancy could be explained by the fact that some of AM404 effects seem not to be mediated only by cannabinoid receptors. Considering antinociception, previous study has already attributed part of AM404 effect to activation of opioidergic and serotonergic systems (Ruggieri et al., 2008). It seems plausible to hypothesize that the antinociceptive effect of AM404 in normoglycemic rats could be at least in part due to opioid and serotonin release and consequently not altered by cannabinoid receptors blockers. Since diabetic rats are opioid-resistant (Courteix et al., 1998) and exhibit low responsiveness to selective serotonin reuptake inhibitors (Anjaneyulu and Chopra, 2006), the antinociceptive effect of AM404 in this experimental group seems to be mediated by direct or indirect cannabinoid receptors activation. Further experimental investigations are needed to estimate the role of opioidergic, serotonergic or other systems in the antinociceptive effect of AM404 in both normal and diabetic states.

Subsequently, we evaluated the potential antinociceptive effect of increasing doses of anandamide (AEA), one of most well known endocannabinoid (Rice et al., 2002). AEA acts as mixed agonist for both CB1 and CB2 receptors (Bosier et al., 2010; Potenziari et al., 2009), with a slightly higher affinity for CB1 receptors (Potenziari et al., 2009) and can also bind to TRPV1 (Hong and Wiley, 2005). In the

current study, pre-treatment with AEA (0.1 µg/paw) promoted antinociception during first and second phase of formalin in both normoglycemic and diabetic rats (Figure 5, panels A-D). However, the pre-treatment with higher doses (0.3 and 1 µg/paw) inhibited just the late phase of formalin-evoked flinches in normoglycemic but not in diabetic rats (figure 3, panels B and D). A possible explanation for these results can be a non specific binding of AEA on pro-nociceptive TRPV1 receptors present on primary afferent nociceptors (Ross et al., 2001) since the diabetic state promote a reduction of CB1 receptors expression (Zhang et al., 2007) and up regulation of TRPV1 receptor ⁴⁴ s (Hong and Wiley, 2005). When administered directly into the rat paw, nanomolar doses of AEA were also able to evoke discharges in C fibers in a TRPV1-dependent way. However, it seems that only doses of 10 µg/paw or higher were sufficient to evoke nociceptive behaviors directly (Potenzieri et al., 2009). Despite of that, the antinociceptive effect of AEA appears to be restricted to local sites since previous study observed that [³H]-labeled AEA remained associated with the injected paw after similar peripheral treatment (Calignano et al., 1998).

The antinociceptive effect of AEA seems to be mediated by CB1 and CB2 receptors activation since its effect was significantly prevented by AM251 and AM630 (Figure 6 and 7, respectively). The modulation of initial and late phase of formalin-evoked flinch responses by AEA appear to be dependent of CB1 receptors while CB2 receptors seems to be important for the AEA antinociceptive effect on the late phase of formalin-evoked flinch behavior. Early studies have already implicated a major role of CB1 receptors, found mainly in neuronal tissues but also expressed in non neuronal ones (Matsuda et al., 1990; for review see Pertwee, 2001) on the nociceptive effect of AEA in neuropathic pain models (Bosier et al., 2010; Guindon and Beaulieu, 2006). Despite of that, recent studies suggested that CB2 receptors played also an important function in the antinociceptive effect of cannabinoid receptor mixed agonists in models of neuropathic pain, suggesting a differential role of endocannabinoid system depending on the sensory modality (Ahmed et al., 2010). CB2 receptors are mainly expressed in cells of immune system as mast cells (Rice et al., 2002), microglia (Núñez et al., 2004), in the gastrointestinal system and also in neuronal tissues (Anand et al., 2009). So, it was expected that this type of cannabinoid receptor was involved on the antinociceptive effect of cannabinoids in the inflammatory processes (Rice et al., 2002), as second phase of formalin test (Rosland et al., 1990). In addition, studies from literature have demonstrated the

effectiveness of selective CB2 agonist, when given at intraplantar route, in reducing the thermal hyperalgesia induced by carragenan (a model of inflammatory pain), suggesting local activation of CB2 receptors (Malan et al., 2001; Quartilho et al., 2003).

Afterward, the effect of peripheral pre-treatment with ACEA, a highly selective CB1 receptor agonist, was investigated on chemical hyperalgesia induced by formalin in normoglycemic and diabetic rats. ACEA is closely related to AEA (Ashton, 2008) and has presented encouraging results for treatment of seizures (Van der Stelt and Di Marzo, 2004), Alzheimer's disease (Haghani et al., 2011) and pain (Mallet et al., 2008), even when injected intraplantarly (Potenzieri et al., 2009), due to well known neuroprotective properties of cannabinoids (Haghani et al., 2011; Van der Stelt and Di Marzo, 2004). When administered spinally, ACEA was able to selectively inhibit discharges in C and A δ fibers in a CB1 receptor dependent mechanism, without affecting proprioception (Kelly and Chapman, 2001). In this current study, pretreatment with ACEA (30 or 100 μ g/paw) promoted a potent antinociceptive effect on first and second phases of formalin test on both normoglycemic and diabetic groups (Fig. 8, panel C). As expected, in our study the antinociceptive effect of ACEA was completely prevented by peripheral injection of CB1 receptor inverse agonist, AM251 in both phases of formalin test in normoglycemic and diabetic rats (Figure 9, panels A, B, C and D).

As current analgesic treatments for diabetic neuropathy are often considered ineffective (Jensen et al., 2006), and cannabinoids have been pointed out as emerging analgesic therapeutics (Lever and Rice, 2007) there is a growing interest in using these compounds for relieving neuropathic pain (Hohmann and Suplita, 2006), including neuropathic pain associated with diabetes. One important study demonstrated that local administration of WIN 55,212-2 (a mixed agonist of CB1 and CB2 receptors) in diabetic rats is able to reduce mechanical allodynia in these animals, suggesting local administration of cannabinoids as option for treatment of neuropathic pain in diabetic subjects (Ulugol et al., 2004). However, some studies using diabetic neuropathy model (Toth et al., 2010) and spinal nerve ligation (Bridges et al., 2001) showed that isolated administration of CB1 antagonist did not evoke expected pronociceptive behaviors and there is not a consensus about endocannabinoid tonus, existing different opinions among authors about basal activation of this system (Bridges et al., 2001; Pertwee, 2001). In this field, there are

interesting publications about beneficial effects of CB1 antagonism in diabetes-associated disorders. For example, rimonabant has been clinically tested to prevent the overweight associated with type II diabetes and also to decrease HbA_{1c} in diabetic patients (Scheen et al., 2006). In agreement with these findings, Comelli et al. (2010) and Liu et al. (2010) both found many beneficial effects on CB1 antagonism by rimonabant treatment in diabetic animals, including a reduction on TNF α levels in the spinal cord. Comelli and colleagues also described increased NGF production and a TRPV1- dependent antinociception with repeated rimonabant treatment, while the latter group found amelioration on blood flow and attenuation on nerve fiber density loss in diabetic mice skin. However, diversity of results found after CB1 antagonist administration could be explained by different methodologies used in each study, i.e. treatment schedule and doses chosen. These discrepancies show that despite growing knowledge on endocannabinoid system is still necessary further information about their functioning during pathologic states, as diabetes and their complications.

Additionally, the CB2 receptor agonism has been previously reported as an alternative for inflammatory pain treatment (Malan et al., 2001), since the classical CNS adverse effects of cannabinoids have been attributed to central CB1 receptors activation. However, in animal models of neuropathic pain, studies using CB2 receptor agonists have reported controversial results. Thus, while many studies have reported improvement in sensory alterations of pain (Toth et al., 2010), often associated with its expression in the central nervous system (Jhaveri et al., 2008; Yamamoto et al., 2008), others have exempted the participation of these receptors in the antinociceptive effect of cannabinoids in neuropathic pain (Brownjohn and Ashton, 2012).

Besides the beneficial effects of CB1 receptors agonist (ACEA) observed in the current study, many authors have been proposed important role of this receptor in the development of chronic dysfunctions associated with diabetes. Thus, it has been established that CB1 receptor activation induces reactive oxygen species production, facilitating local inflammatory processes (for review see: Horváth et al., 2012). Decreasing of β cell mass could also be associated to misbalance between endocannabinoids and insulin signalization on pancreas (Kim et al., 2011). While insulin promotes a positive feedback increasing β cell mass proliferation (Paris et al., 2003), it was indicated that activation of CB1 receptors in β cell promotes an inverse

signal. In diabetic nephropathy, it has been described an elevated concentration of CB1 receptors in renal tissue of diabetic rats, with increased albuminuria, as happens to human patients. Additionally, it has been observed a higher expression of CB1 receptors in cardiomyocytes, increased of myocardial AEA levels, advanced glycation end products accumulation and oxidative and nitrate stress in the cardiac muscle of diabetic mice (Rajesh et al., 2012). In this way, pharmacological inhibition or genetic disruption of CB1 receptors in diabetic mouse attenuated diabetes-induced cardiac dysfunction, presenting a beneficial profile in this disease (Rajesh et al., 2012). Finally, the CB1 receptor intracellular cascades activation, through MAPK and consequently, reactive species production and local inflammation, has been associated with diabetic retinopathy (El Remessy et al., 2011). This role was further established with genetic disruption or CB1 receptor blockade with rimonabant, being CB1 receptor inhibition benefic, avoiding vascular cell death, reducing local inflammation and relieving oxidative retinal stress in this study (El Remessy et al., 2011).

In summary, our results outlined above suggest that cannabinoids could exert antinociceptive effects in a model of painful diabetic neuropathy when administered peripherally. In contrast to opioids, drugs that affect endocannabinoid system (AM404, AEA and ACEA) showed a significant antinociceptive effect in diabetic animals, which is therapeutically promising. In addition, our results allow us to suggest that the antinociception observed in both phases of formalin test exerted after local exogenous or endogenous anandamide depends on both CB1 and CB2 receptors activation, possible CB1 receptors expressed on primary afferent nociceptors and CB2 receptors presented on inflammatory cells as mast cells. Further studies are necessary to elucidate how endocannabinoids modulate the nociceptive input peripherally.

Conflicts of interest

The authors do not have any conflict of interest in the conduct and reporting of this research.

Role of the funding source

The funding source for this work, Fundação Araucária did not play any role in study design; collection, analysis, and interpretation of data; writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication.

Acknowledgments

The authors would like to thank Mrs. Silvia Nardi Cordazzo Genari for technical support and Dr. Janaina Menezes Zanoveli for the assistance with the statistical analysis of data. This research was fully supported by Fundação Araucária (Protocol #17357). AKS is a recipient of CAPES graduate student fellowship. MN and CHAJ are recipients of undergraduate student fellowship from Federal University of Paraná/Tesouro Nacional.

References

- Agarwal, N., Pacher, P., Tegeder, I., Amaya, F., Constantin, C.E., Brenner, G.J., Rubino, T., Michalski, C.W., Marsicano, G., Monory, K., Mackie, K., Marian, C., Batkai, S., Parolaro, S., Fischer, M.J., Reeh, P., Kunos, G., Kress, M., Lutz, B., Woolf, C.J., Kuner, R., 2007. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* 10, 870 – 879.
- Ahmed, M.M., Rajpal, B.A.S., Sweeney, C., Gerovac, T.A., Allcock, B., McChesney, S., Patel, A.U., Tilghman, J.I., Miranpuri, G.S., Resnick, D.K., 2010. Cannabinoid subtype-2 receptors modulate the antihyperalgesic effect of WIN 55,212-2 in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Spine J* 10, 1049 – 1054.
- Ahroni, J.H., Boyko, E.J., Davignon, D.R., Pecoraro, R.E., 1994. The health and functional status of veterans with diabetes. *Diabetes Care* 17, 318-21.
- Anand, P., Whiteside, G., Fowler, C.J., Hohmann, A.G., 2009. Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. *Brain Res Rev* 60, 255 – 266.
- Anjaneyulu, M., Chopra, K., 2006. Possible involvement of cholinergic and opioid receptor mechanisms in fluoxetine mediated antinociception response in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 538, 80 – 84.
- Argoff, C.E., Backonja, M.M., Belgrade, M.J., Bennett, G.J., Clark, M.R., Cole, B.E., Fishbain, D.A., Irving, G.A., McCarberg, B.H., McLean, M.J., 2006. Consensus guidelines: treatment planning and options. *Diabetic peripheral neuropathic pain. Mayo Clin Pro.* 81, S12-25.

- Arreola-Espino, R., Urquiza-Marín, H., Ambriz-Tuiuti, M., Araiza-Saldaña, C.I., Caram-Salas, N.L., Rocha-González, H.I., Mixcoatl-Zecuatl, T., Granados-Soto, V., 2007. Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 577, 203 – 210.
- Ashmawi, H.A., Chamberg, F.S., Palmeira, C.C.A., Posso, I.P., 2003. The effects of pyrilamine and cimetidine on mRNA C-fos expression and nociceptive flinching behavior in rats. *Anesth Analg* 97, 541– 546.
- Ashton, C.H., 2001. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry* 178, 101 – 106.
- Ashton, J., 2008. Pro-Drugs for Indirect Cannabinoids as Therapeutic Agents. *Curr Drug Deliv* 5, 243- 247.
- Borsani, E., Labanca, M., Bianchi, R., Rodella, L. F., 2007. AM404 decreases Fos-immunoreactivity in the spinal cord in a model of inflammatory pain. *Brain Res* 1152, 87 – 94.
- Bosier, B., Muccioli, G. G., Hermans, E., Lambert, D. M., 2010. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and opportunities. *Biochem Pharmacol* 80, 1 – 12.
- Bridges, D., Ahmad, K., Rice, A.S., 2001. The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 133, 586 – 594.
- Brownjohn, P.W., Ashton, J.C., 2012. Spinal cannabinoid CB2 receptors as a target for neuropathic pain: an investigation using chronic constriction injury. *Neuroscience* 203, 180-193.
- Calcutt, N.A., Backonja, M.M., 2007. Pathogenesis of pain in peripheral diabetic neuropathy. *Curr Diab Rep* 7, 429 – 434.
- Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., Piomelli, D., 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394, 277–281.
- Ceseña, R.M., Calcutt, N.A., 1999. Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats. *Neurosci Lett* 262, 101 – 104.
- Comelli, F., Bettoni, I., Colombo, A., Fumagalli, P., Giagnoni, G., Costa, B., 2010. Rimonabant, a cannabinoid CB1 receptor antagonist attenuates mechanical hyperalgesia and counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 637, 62 - 69.
- Courteix, C., Bourget, P., Caussade, F., Bardin, M., Coudore, F., Fialip, J., Eschalier, A., 1998. Is the reduced efficacy of morphine in diabetic rats caused by alterations of opiate receptors or of morphine pharmacokinetics? *J Pharmacol Exp Ther* 285, 63 – 70.
- Devane, W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum, A., Etinger A., Mechoulam R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1046 – 1049.

Di Marzo V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., Piomelli, D., 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686 – 691.

Di Marzo, V., Petrocellis, L.D., 2006. Plant, synthetic and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med* 57, 553 – 574.

Dickenson, A. H., Sullivan, A.F., 1987. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 30, 349–360.

Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161 – 174.

El-Remessy, A.B., Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Horváth, B., Patel, V., Al-Gayyar, M.M., Pillai, B.A., Pacher, P., 2011. Cannabinoid 1 receptor activation contributes to vascular inflammation and cell death in a mouse model of diabetic retinopathy and human retinal cell line. *Diabetologia* 54, 1567 – 1578.

Guindon, J., Beaulieu, P., 2006. Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology*. 50, 814 – 823.

Guindon, J., Desroches, J., Beaulieu, P., 2007a. The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB 2 receptors. *Br J Pharmacol*. 150, 693 – 701.

Guindon, J., Hohmann, A.G., 2009. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8, 403 – 421.

Guindon, J., LoVerme, J., Piomelli, D., Beaulieu P., 2007b. The antinociceptive effects of local injections of propofol in rats are mediated in part by cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Anesth Analg* 104, 1563 – 1569.

Haghani, M., Janahmadi, M., Shabani, M., 2011. Protective effect of cannabinoid CB1 receptor activation against altered intrinsic repetitive firing properties induced by A β neurotoxicity. *Neurosci Lett* 507, 33 – 37.

Hardy, T., Sachson, R., Shen, S., Armbruster, M., Boulton, A.J., 2007. Does treatment with duloxetine for neuropathic pain impact glycemic control? *Diabetes Care* 30, 21–26.

Hasanein, P., 2011. Effects of histamine H3 receptors on chemical hyperalgesia in diabetic rats. *Neuropharmacology* 60, 886 – 891.

Hasanein, P., Soltani, N., 2009. Effects of the endocannabinoid transport inhibitors AM 404 and UCM707 on diabetic neuropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36, 1127 – 1131.

Hillard, C.J., Campbell, W.B., 1997. Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid. *J Lipid Res* 38, 2383 – 2398.

Hohmann, A.G., Suplita, R.L., 2006. Endocannabinoids mechanisms of pain modulation. *The AAPS Journal* 8, E693 – E708.

Horváth, B., Mukhopadhyay, P., Haskó, G., Pacher, P., 2012. The endocannabinoid system and plant-derived cannabinoids in diabetes and diabetic complications. *Am J Pathol* 180, 432 – 442.

Hong, S., Wiley, J.W., 2005. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 280, 618 – 627.

Jensen, T.S., Backonja, M.M., Jiménez, S.H., Tesfaye, S., Valensi, P., Ziegler D., 2006. New perspectives on the management of diabetic peripheral neuropathic pain. *Diab Vasc Dis Res* 3, 108-19.

Jhaveri, M.D., Elmes, S.J., Richardson, D., Barrett, D.A., Kendall, D.A., Mason, R., Chapman, V., 2008. Evidence for a novel functional role of cannabinoid CB(2) receptors in the thalamus of neuropathic rats. *Eur J Neurosci* 27, 1722-1730. Erratum in: *Eur J Neurosci* 27, 2482.

Kelly, S., Chapman, V., 2001. Selective cannabinoid CB1 receptor activation inhibits spinal nociceptive transmission in vivo. *J Neurophysiol* 86, 3061 – 3064.

Kelly, S., Jhaveri, M.D., Sagar, D.R., Kendall, D.A., Chapman, V., 2003. Activation of peripheral cannabinoid CB1 receptors inhibits mechanically evoked responses of spinal neurons in noninflamed rats and rats with hindpaw inflammation. *Eur J Neurosci* 18, 2239 – 2243.

Kim, W., Doyle, M.E., Liu, Z., Lao, Q., Shin, Y.K., Carlson, O.D., Kim, H.S., Thomas, S., Napora, J.K., Lee, E.K., Moaddel, R., Wang, Y., Maudsley, S., Martin, B., Kulkarni, R.N., Egan, J.M., 2011. Cannabinoids inhibit insulin receptor signaling in pancreatic β cells. *Diabetes* 60, 1198 – 1209.

La Rana, G., Russo, R., D'Agostino, G., Sasso, O., Raso, G.M., Iacono, A., Meli, R., Piomelli, D., Calignano, A., 2008. Am404, an anandamide transport inhibitor, reduces plasma extravasation in a model of neuropathic pain in rat: role for cannabinoid receptors. *Neuropharmacology* 54, 521 – 529.

Lever, I.J., Rice, A. S., 2007. Cannabinoids and pain. *Handb Exp Pharmacol* 177, 265 – 306.

Liu, W.J., Jin, H.Y., Park, J.H., Baek, H.S., Park, T.S., 2010. Effect of rimonabant, the cannabinoid CB1 receptor antagonist, on peripheral nerve in streptozotocin-induced diabetic rat. *Eur J Pharmacol* 637, 70 – 76.

Malan Jr., T.P., Ibrahim, M.M., Deng, H., Liu, Q., Mat, a H.P., Vanderah T., Porreca F., Makriyannis A., 2001. CB 2 cannabinoid receptor-mediated peripheral

antinociception. *Pain* 93, 239 – 245.

Mallet, C., Daulhac, L., Bonnefont, J., Ledent C., Etienne, M., Chapuy, E., Libert, F., Eschaliér, A., 2008. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain* 139, 190 – 200.

Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561 – 564.

Negrete, R., Hervera, A., Leáñez, S., Martín-Campos, J.M., Pol, O., 2011. The antinociceptive effects of JWH-015 in chronic inflammatory pain are produced by nitric oxide-cGMP-PKG-KATP pathway activation mediated by opioids. *Plos One* 6, 1 – 11.

Núñez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., González, S., Tolón, R.M., Romero, J., 2004. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53, 208 – 213.

Paris, M., Bernard-Kargar, C., Berthault, M.F., Bouwens, L., Ktorza, A., 2003. Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology* 144, 2717 – 2727.

Pertwee, R.G., 2001. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 63, 569 – 611.

Piomelli, D., 2003. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci* 4, 873 – 884.

Potenzieri, C., Brink, T.S., Donald, A., Simone, D.A., 2009. Excitation of cutaneous C nociceptors by intraplantar administration of anandamide. *Brain Res* 1268, 38-47.

Puig, S., Sorkin, L.S., 1996. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 64, 345 – 355.

Quartilho, A., Mata, H.P., Ibrahim, M.M., Vanderah, T.W., Porreca, F., Makriyannis, A., Malan, T.P., 2003. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB 2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* 99, 955-60.

Rajesh, M., Bátkai, S., Kechrid, M., Mukhopadhyay, P., Lee, W.S., Horváth, B., Holovac, E., Cinar, R., Liudet, L., Mackie, K., Haskó, G., Pacher, P., 2012. Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 61, 716 – 727.

Ramos, K.M., Jiang, Y., Svensson, C.I., Calcutt, N.A., 2007. Pathogenesis of spinally mediated hyperalgesia in diabetes. *Diabetes* 56, 1569 – 1576.

Reis, G.M.L., Ramos, M.A., Pacheco, D. F., Klein, A., Perez, A.C., Duarte, I.D.G., 2011. Endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide induces peripheral antinociception by activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Life Sci* 88, 653 – 657.

- Rice, A.S.C., Farquhar-Smith, W.P., Nagy, I., 2002. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66, 243 – 256.
- Rosland, J.H., Tjølsen, A., Maehle, B., Hole, K., 1990. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 42, 235–242.
- Ross, R.A., Gibson, T.M., Brockie, H.C., Leslie, M., Pashmi, G., Craib, S.J., Di Marzo, V., Pertwee, R.G., 2001. Structure–activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br J Pharmacol* 132, 631–640.
- Ruggieri, V., Vitale, G., Pini, L.A., Sandrini, M., 2008. Differential involvement of opioidergic and serotonergic systems in the antinociceptive activity of N-arachidonylphenolamine (AM404) in the rat: comparison with paracetamol. *Nauryn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377, 219 – 229.
- Scheen, A.J., Finer, N., Hollander, P., Jensen, M.D., Van Gaal, L.F., 2006. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type II diabetes: a randomized controlled study. *Lancet* 368, 1660–1672.
- Shakher, J., Stevens, M.J., 2011. Update on the management of diabetic polyneuropathies. *Diabetes Metab Syndr Obes* 4, 289 – 305.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 89 – 97.
- Tjølsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5 – 17.
- Torres-López, J.E., Juárez-Rojop, I.E., Granados-Soto, V., Diaz-Zagoya, J.C., Flores-Murrieta, F.J., Ortíz-López, J.U.S., Cruz-Vera J., 2007. Peripheral participation of cholecystokinin in the morphine-induced peripheral antinociceptive effect in non-diabetic and diabetic rats. *Neuropharmacology* 52, 788 – 795.
- Toth, C.C., Jedrzejewski, N.M., Ellis, C.L., Frey, W.H. 2nd., 2010. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. *Mol Pain* 17, 6 – 16.
- Ulugol, A., Karadag, H.C., Ipci, Y., Tamer, M., Dokmeci, I., 2004. The effect of WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, on tactile allodynia in diabetic rats. *Neurosci Lett* 371, 167 – 170.
- Van der Stelt, M., Di Marzo, V., 2004. Endovanilloids: Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* 271, 1827 – 1834.
- Zhang, F., Hong, S., Stone, V., Smith, P.J.W., 2007. Expression of Cannabinoid CB1 Receptors in Models of Diabetic Neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 323, 508 – 515.

Yamamoto, W., Mikami, T., Iwamura, H., 2008. Involvement of central cannabinoid CB2 receptor in reducing mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 583, 56-61.

Zygmunt, P.M., Chuang, H., Movahed, P., Andersson, D.A., Chuang, H., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., Högestätt, E.D., 2000. The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol.* 396, 39–42.

Figure legends

Figure 1. Flinching time course (Panel A) and sum of flinches counted per phase (first phase-IP; quiescent period-QP; second phase-IIP; Panel B) after paw formalin (0.5%, 50 μ L) injection in normoglycemic (left panels) and diabetic (right panels) rats. Data are mean \pm SEM (n= 10/group). *p<0.05 (Student's t test) in comparison with normoglycemic rats.

Figure 2. Sum of flinches per phase after paw formalin (0.5%, 50 μ L) in normoglycemic (panels A and B) and diabetic rats (panels C and D) pre-treated locally with AM404 (50, 75 and 150 μ g/paw, in 50 μ L). Data are mean \pm SEM (n= 6-10/group). *p<0.05 (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test) in comparison with vehicle-treated rats.

Figure 3. Effect of CB1 receptor inverse agonist AM251 (150 μ g/paw, in 30 μ L) on the antinociceptive effect of AM404 (50 μ g/paw, in 30 μ L) in normoglycemic (panels A and B) and diabetic (panels C and D) groups submitted to the paw formalin (0.5%, 50 μ L) injection. Data are mean \pm SEM (n= 5-10/group). *p<0.05 when compared with vehicle-treated rats and #p<0.05 when compared to AEA-treated group, as determined by One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test.

Figure 4. Effect of CB2 receptor antagonist AM630 (25 μ g/paw, in 30 μ L) on the antinociceptive effect of AM404 (50 μ g/paw, in 30 μ L) in normoglycemic (panels A and B) and diabetic (panels C and D) groups submitted to the paw formalin (0.5%, 50 μ L) injection. Data are mean \pm SEM (n= 6-10/group). *p<0.05 when compared with vehicle-treated rats and #p<0.05 when compared to AEA-treated group, as determined by One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test.

Figure 5. Sum of flinches per phase after paw formalin (0.5%, 50 μ L) in normoglycemic (panels A and B) and diabetic rats (panels C and D) that were pre-treated locally with anandamide (AEA; 0.03, 0.1, 0.3 and 1 μ g/paw, in 50 μ L). Data are mean \pm SEM (n= 6-10/group). *p<0.05 was determined by One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test in comparison with vehicle-treated rats.

Figure 6. Effect of CB1 receptor inverse agonist AM251 (150 µg/paw, in 30 µL) on the antinociceptive effect of anandamide (AEA, 0.1 µg paw, in 30 µL) in normoglycemic (panels A and B) and diabetic (panels C and D) groups submitted to the paw formalin (0.5%, 50 µL) injection. Data are mean ± SEM (n= 6-10/group). *p<0.05 when compared with vehicle-treated rats and # p<0.05 when compared to AEA-treated group, as determined by One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test.

Figure 7. Effect of CB2 receptor antagonist AM630 (25 µg/paw, in 30 µL) on the antinociceptive effect of anandamide (AEA, 0.1 µg paw, in 30 µL) in normoglycemic (panels A and B) and diabetic (panels C and D) groups submitted to the paw formalin (0.5%, 50 µL) injection. Data are mean ± SEM (n= 6-10/group). *p<0.05 when compared with vehicle-treated rats and #p<0.05 when compared to AEA-treated group, as determined by One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test.

Figure 8. Sum of flinches per phase after paw formalin (0.5%, 50 µL) in normoglycemic (panels A and B) and diabetic rats (panels C and D) that were pre-treated with ACEA (10, 30 and 100 µg/paw, in 50 µL). Data are mean ± SEM (n= 7-10/group). *p<0.05 (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test) in comparison with vehicle-treated rats.

Figure 9. Effect of CB1 receptor inverse agonist AM251 (150 µg/paw, in 30 µL) on the antinociceptive effect of ACEA (30 µg/paw, in in 30 µL) in normoglycemic and diabetic groups submitted to the paw formalin (0.5%, 50 µL) injection. Data are mean ± SEM (n= 7-10/group). *p<0.05 when compared with vehicle-treated rats and #p<0.05 when compared to ACEA-treated group, as determined by One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test.

Figure 1

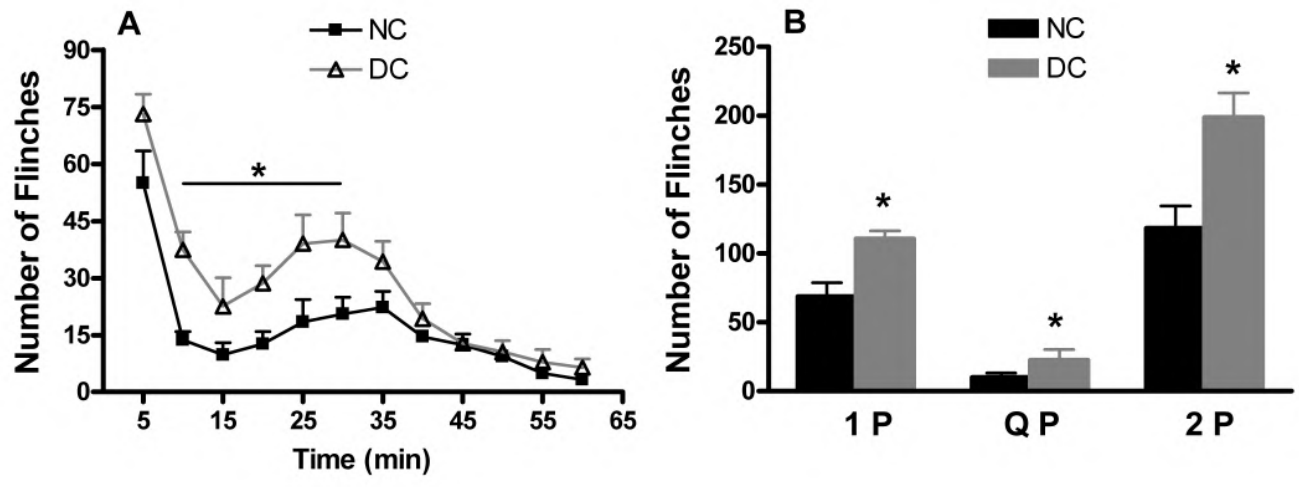


Figure 2

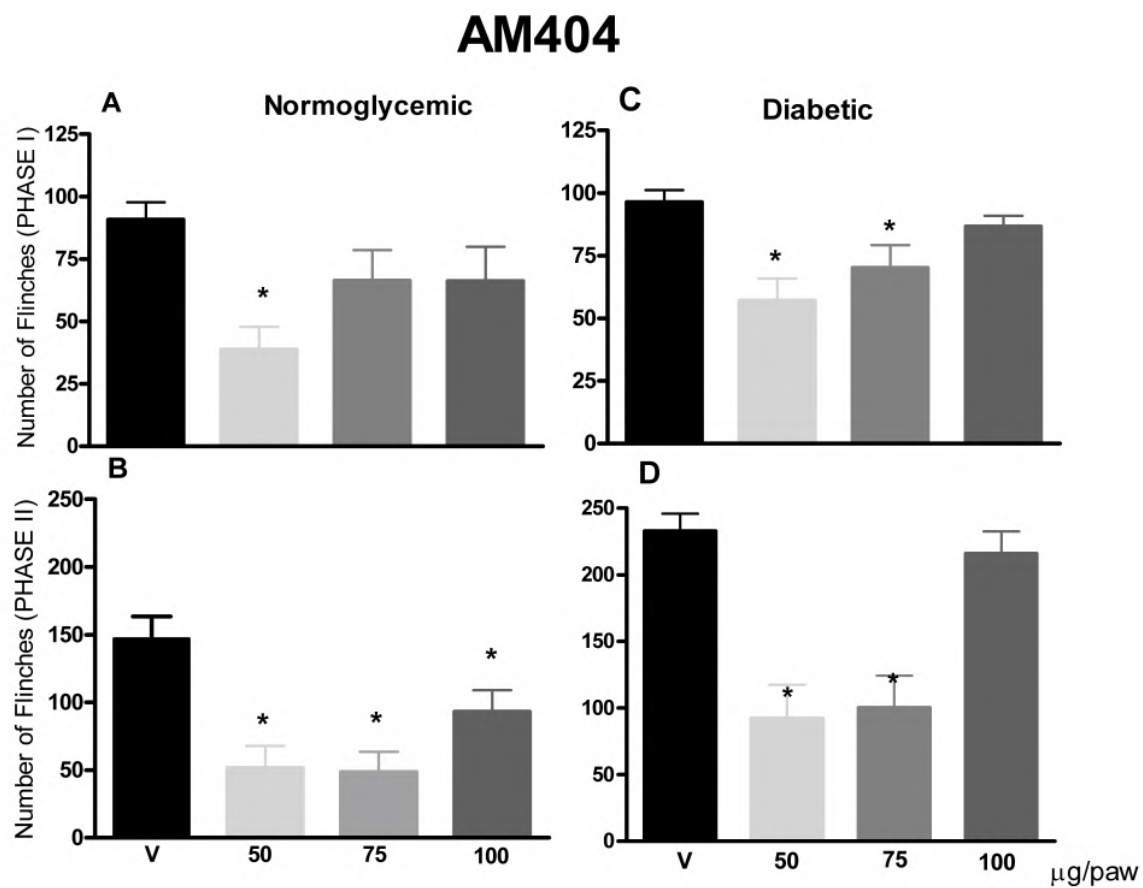


Figure 3

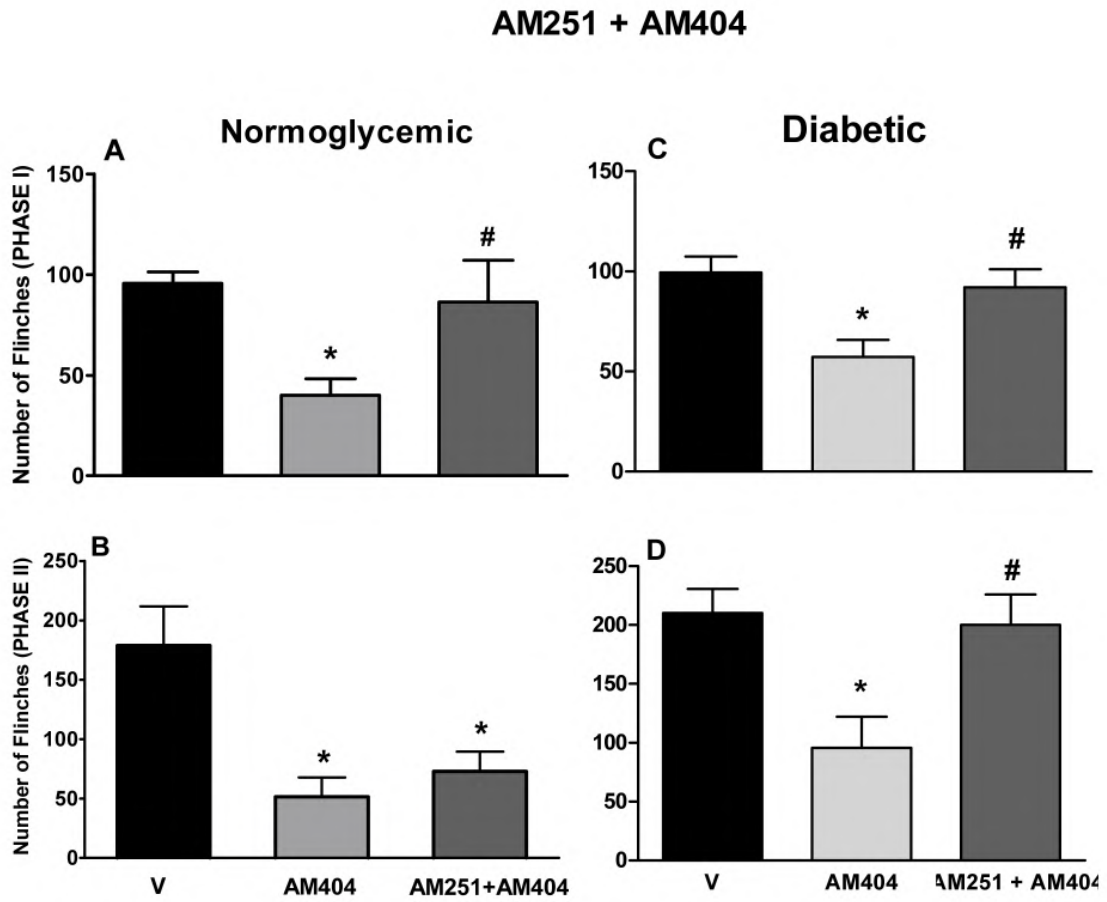


Figure 4

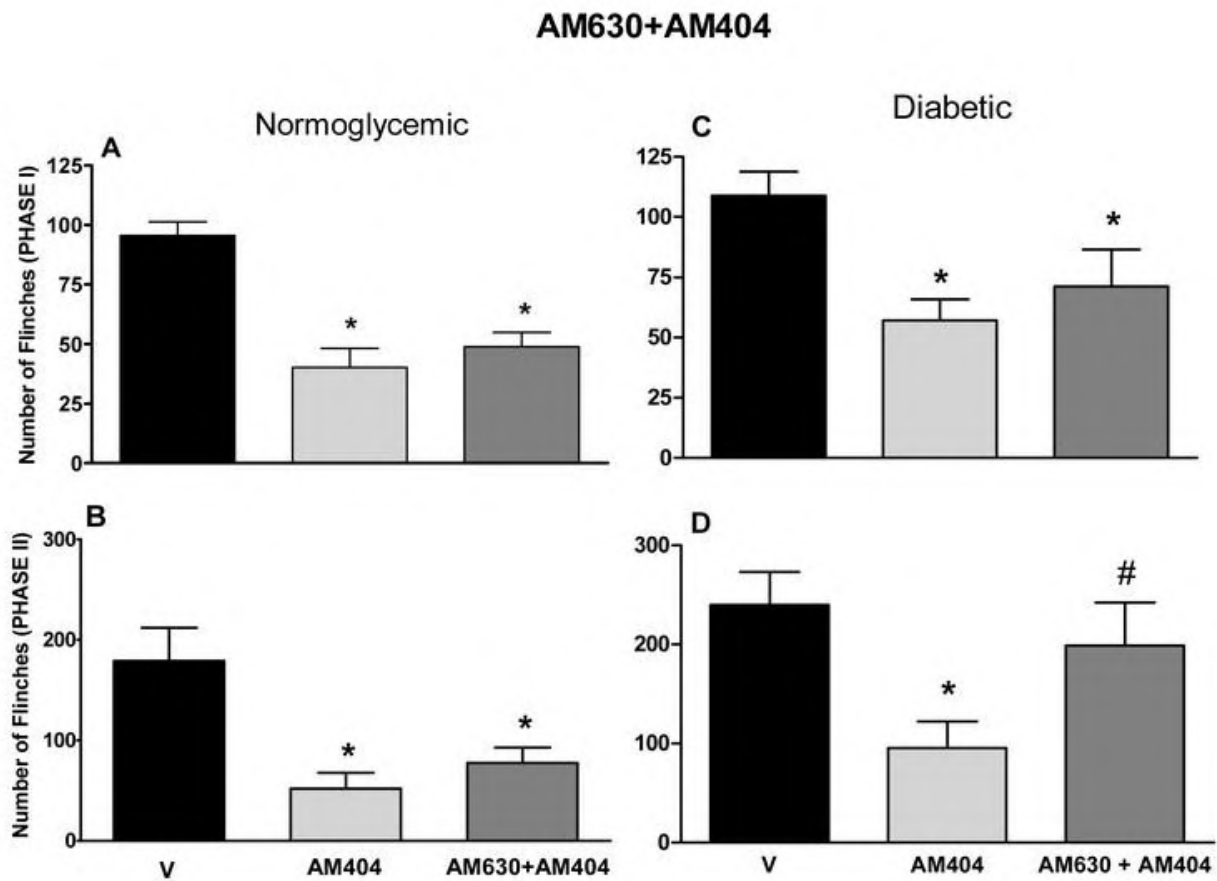


Figure 5

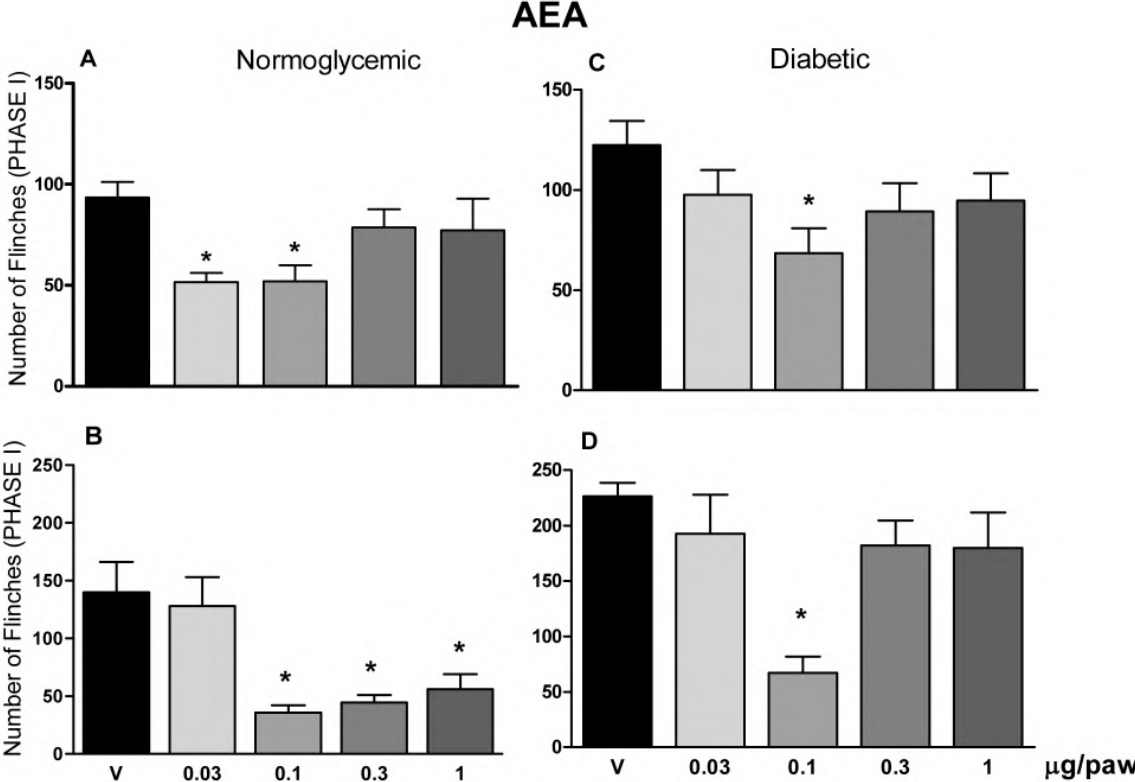


Figure 6

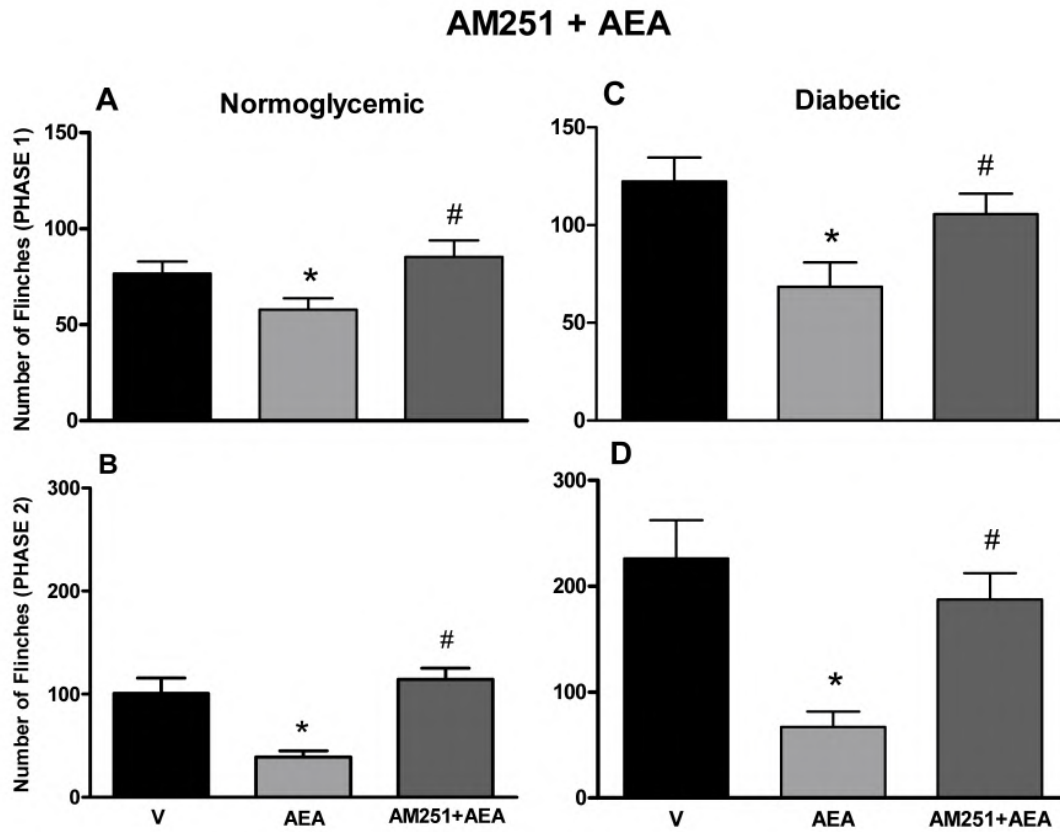


Figure 7

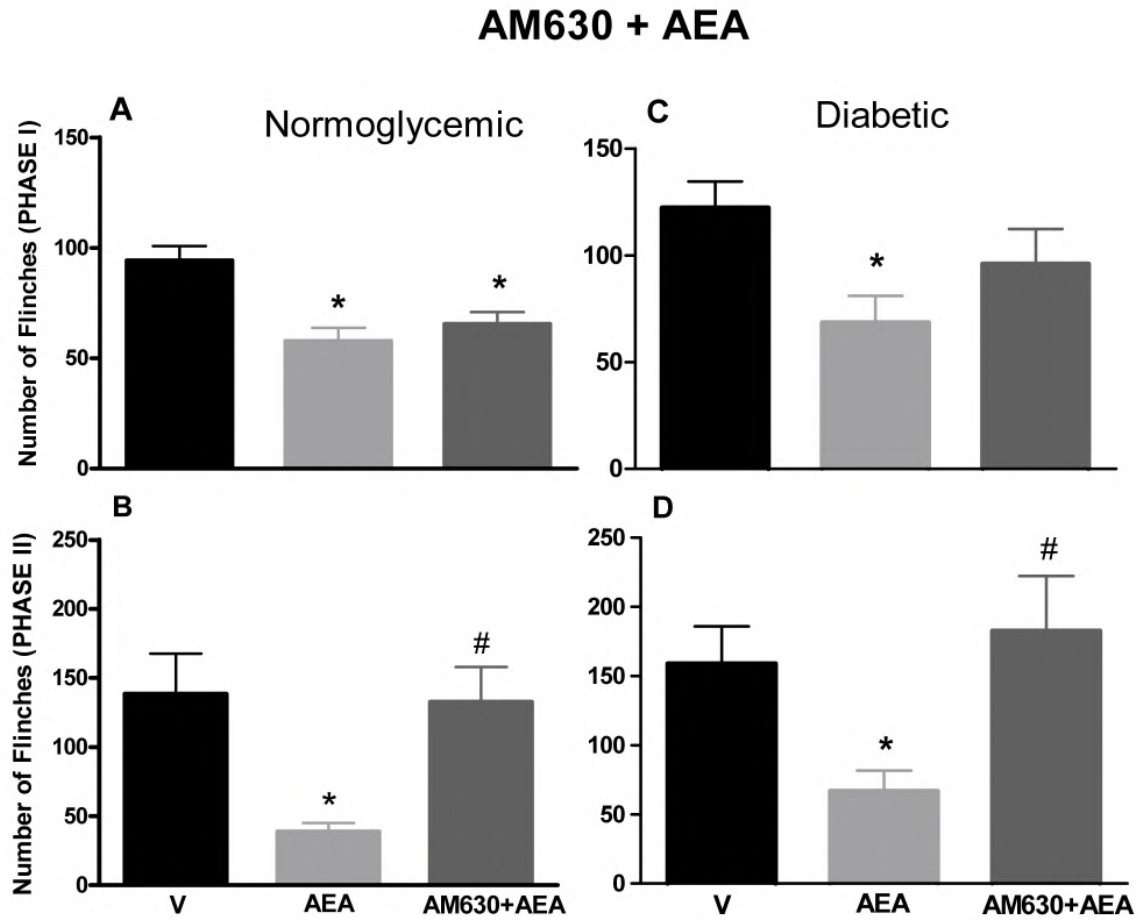


Figure 8

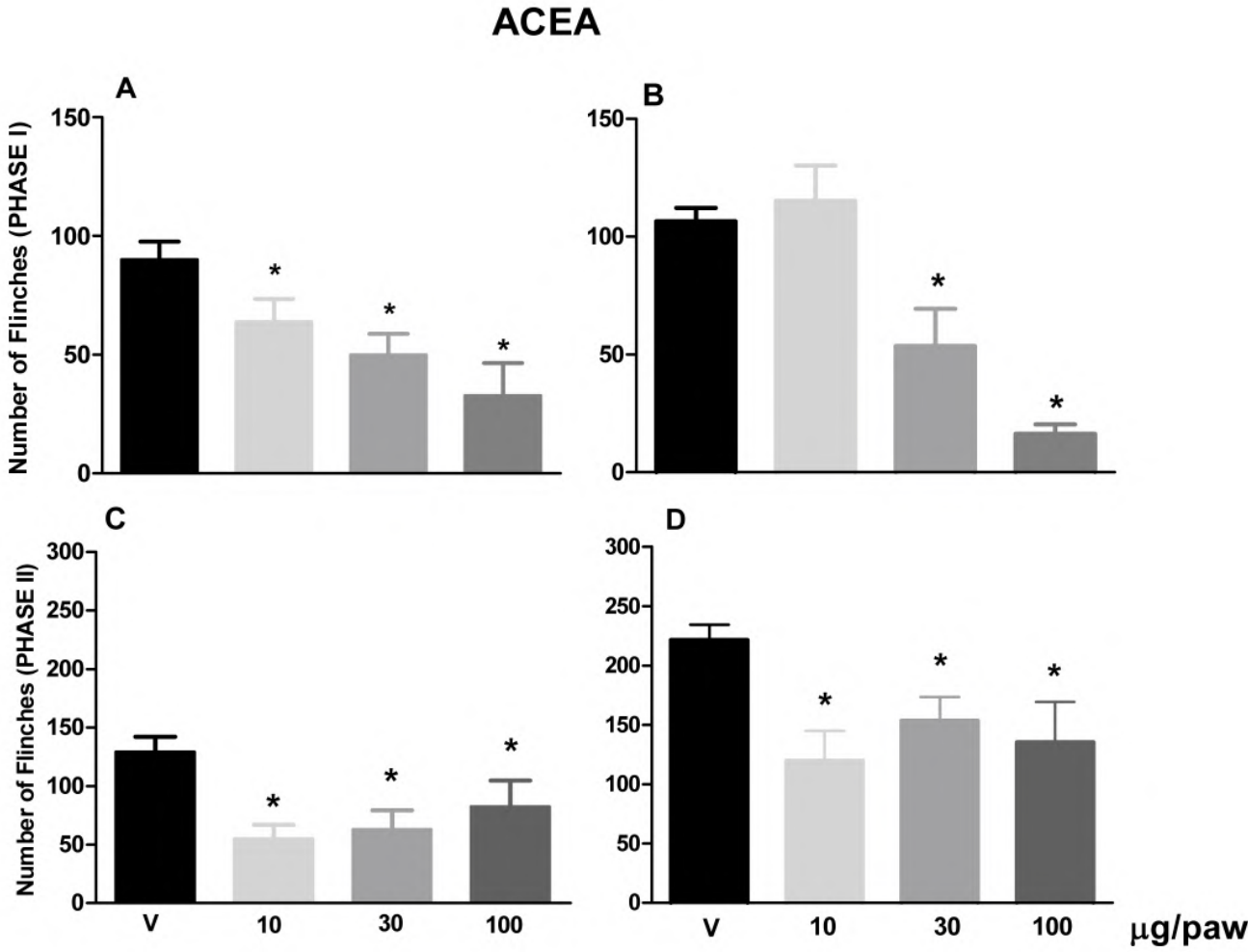
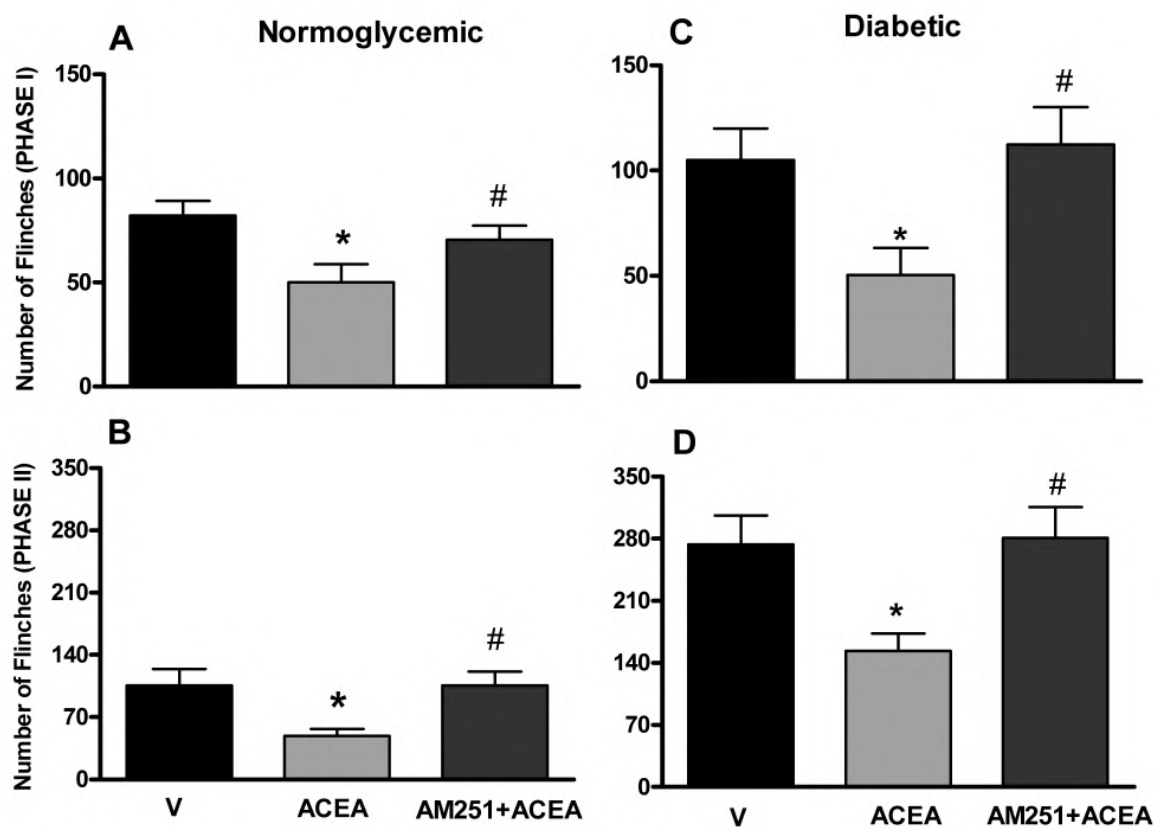


Figure 9

AM251 + ACEA

HIGHLIGHTS

- 1) Diabetic rats present greater and more sustained response to chemical hyperalgesia.
- 2) AEA in low dose promoted a long lasting antinociception on both groups.
- 3) Antinociceptive action of AEA was CB1 and CB2 mediated.
- 4) AM404 and ACEA also promoted a persistent antinociception.
- 5) Cannabinoids can act locally to reduce chemical hyperalgesia in diabetic rats.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

Animais diabéticos apresentam comportamentos nociceptivos exacerbados quando comparados aos animais normoglicêmicos em ambas as fases do teste da formalina, caracterizando a presença de hiperalgesia química;

A administração ipsilateral com inibidor da recaptção de endocanabinóides, anandamida ou agonista seletivo de receptores CB1 inibiu os comportamentos nociceptivos em ambas as fases do teste da formalina tanto em animais normoglicêmicos quanto diabéticos;

Os receptores canabinóides do tipo CB1 parecem mediar os efeitos antinociceptivos da anandamida e do ACEA em ambas as fases (neurogênica e inflamatória) do teste da formalina em ambos os grupos experimentais (normoglicêmicos e diabéticos);

Nos animais diabéticos, os receptores canabinóides do tipo CB2 parecem mediar os efeitos do AM404 e da AEA somente na segunda fase (inflamatória) do teste da formalina;

Em animais normoglicêmicos, o efeito antinociceptivo do AM404 sobre as respostas nociceptivas induzidas pela formalina parece depender tanto de receptores canabinóides do tipo CB1 como de receptores não CB1/não CB2, como os receptores de potencial transitório, hipótese esta a ser testada.

5. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, N.; PACHER, P.; TEGEDER, I.; AMAYA, F.; CONSTANTIN, C. E.; BRENNER, G. J.; RUBINO, T.; MICHALSKI, C. W.; MARSICANO, G.; MONORY, K.; MACKIE, K.; MARIAN, C.; BATKAI, S.; PAROLARO, S.; FISCHER, M. J.; REEH, P.; KUNOS, G.; KRESS, M.; LUTZ, B.; WOOLF, C.J.; KUNER, R. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. **Nature Neurosciences**. v. 10, n. 7, p. 870 – 879, 2010.
- AHLUWALIA, J.; URBAN, L.; CAPOGNA, M.; BEVAN, S.; NAGY, I. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. **Neuroscience**. v. 100, n. 4, p. 747 – 753, 2000.
- ALBERTI, K.G.; ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, n. 7, p. 359 – 353, 1998.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION; AMERICAN ACADEMY of NEUROLOGY, Consensus Statement. Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. American Diabetes Association American Academy of Neurology. **Diabetes Care**. v.11, n. 7, p. 592 – 597, 1988.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standardized measures in diabetic neuropathy (Consensus Statement). **Diabetes care**. v. 18, p. 59 – 81, 1995.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v. 32, (suppl. 1), p. S62 – S67, 2009.
- ANAND, P.; WHITESIDE, G.; FOWLER, C.J.; HOHMANN, A.G.; Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. **Brain Research Reviews**. v. 60, n. 1, p. 255 – 66, 2009.
- ARREOLA-ESPINO, R.; URQUIZA-MARÍN, H.; AMBRIZ-TUTUTI, M.; ARAIZA-SALDAÑA, C. I.; CARAM-SALAS, N. L.; ROCHA-GONZÁLEZ, H. I.; MIXCOATL-ZECUATL, T.; GRANADOS-SOTO, V. Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 577, n. 1 – 3, p. 203 – 210, 2007.
- ARGOFF, C.E.; BACKONJA, M.M.; BELGRADE, M.J.; BENNETT, G.J.; CLARK, M.R.; COLE, B.E.; FISHBAIN, D.A.; IRVING, G.A.; MCCARBERG, B.H.; MCLEAN, M.J. Consensus guidelines: treatment planning and options. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 81, 4 Supl. p. S12–S25, 2006.
- ASHTON, J. Pro-drugs for indirect cannabinoids as therapeutic agents. **Current Drug Delivery**. v. 5, n. 4, p. 243 – 247, 2008.
- BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, M. C. Science of Pain. **Elsevier**. 1ª edição, p. 1 – 13, 2009.

BEDOYA, F.J.; SOLANO, F.; LUCAS, M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. **Experientia**. v. 52, n. 4, p. 344-347, 1996.

BORSANI, E.; LABANCA, M.; BIANCHI, R.; RODELLA, L. F. AM404 decreases Fos-immunoreactivity in the spinal cord in a model of inflammatory pain. **Brain Research**. v. 1152, p. 87 – 94, 2007.

BOSIER, B.; MUCCIOLI, G. G.; HERMANS, E.; LAMBERT, D. M. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and opportunities. **Biochemical Pharmacology**. v. 80, n. 1, p. 1 – 12, 2010.

BOULTON, A. J. M., MALIK, R. A.; AREZZO, J. C.; SOSENKO, J. M. Diabetic somatic neuropathies. **Diabetes Care**. v. 27, n. 6, p. 1458 – 1486, 2004.

BOULTON, A. J. M.; VINIK, A. I.; AREZZO, J. C.; BRIL, V.; FELDMAN, E. L.; FREEMAN, R.; MALIK, R. A.; MASER, R. E.; SOSENKO, J. M.; ZIEGLER, D. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 28, n. 4, p. 956 – 962, 2005.

BRIL, V.; ENGLAND, J.; FRANKLIN, G. M.; BACKONJA, M. M.; COHEN, J.; DEL TORO, D.; FELDMAN, E.; IVERSON, D. J.; PERKINS, B.; RUSSELL, J. W.; ZOCHODNE D. Evidence-based guideline: Treatment of painful diabetic neuropathy report of the American Academy of Neurology, the American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. **PM & R: The Journal of Injury, Function and Rehabilitation**. v. 3, n. 4, p. 345 – 352, 2011.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. v. 414, n. 6865, p. 813 – 820, 2001.

CALIGNANO, A.; LA RANA, G.; GIUFFRIDA, A.; PIOMELLI, D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. **Nature**. v. 394, n. 6690, p. 277 – 281, 1998.

CARTER, G. T.; FLANAGAN, A. M.; EARLEYWINE, M.; ABRAMS, D. I.; AGGARWAL, S. K.; GRINSPOON, L. Cannabis in palliative medicine: improving care and reducing opioid-related morbidity. **The American Journal of Hospice and Palliative Care**. v. 28, n. 5, p. 297 – 303, 2011.

CLAPPER, J. R.; MORENO-SANZ, G.; RUSSO, R.; GUIJARRO, A.; VACONDIO, F.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; SANCHINI, S.; SCIOLINO, S.; SPRADLEY, J. M.; HOHMANN, A. G.; CALIGNANO, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; PIOMELLI, D. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. **Nature Neuroscience**. v. 13, n. 10, p. 1265 – 1270, 2010.

COLLEN, M. Prescribing *Cannabis* for harm reduction. **Harm Reduction Journal**. v. 9, n. 1, p. 1 – 12, 2012.

CONSTANZO, L. - Fisiologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 3^a ed, p. 422 – 429, 2007.

COSTA, B.; SINISCALCO, D.; TROVATO, A. E.; COMELLI, F.; SOTGIU, M. L.; COLLEONI, M.; MAIONE, S.; ROSSI, F.; GIAGNONI, G. AM404, an inhibitor of anandamide uptake, prevents pain behaviour and modulates cytokine and apoptotic pathways in a rat model of neuropathic pain. **British Journal of Pharmacology**. v. 148, n. 7, p. 1022 – 1032, 2006.

DAOUSI, C.; MACFARLANE, I. A.; WOODWARD, A.; NURMIKKO, T. J.; BUNDRED, P. E.; BENBOW, S. J. Chronic painful peripheral neuropathy in an urban community: a controlled comparison of people with and without diabetes. **Diabetic Medicine**. v. 21, n. 9, p. 976 – 982,

DAVIES, M.; BROPHY, S.; WILLIAMS, R.; TAYLOR, A. The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v. 29, n. 7, p. 1518 – 1522, 2006.

DCCT RESEARCH GROUP. The effect of intensive diabetes therapy on the development and progression of neuropathy. **Annals of Internal Medicine**. v.122, n. 8, p.561 – 568, 1995.

De FREITAS, M.R.G.; NASCIMENTO, O.J.M.; CHIMELLI, L. Diabetic neuropathy. I— epidemiology, classification, clinical and electrophysiological aspects. A study of 210 cases. **Revista Brasileira de Neurologia**. v. 28, p. 69 – 73, 1992.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G.; STEVENSON, L. A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**. v. 258, n. 5090, p. 1946 – 1949, 1992.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2009. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Itapevi**, 3ª ed., p. 9 – 20, 2009.

Di MARZO, V.; BREIVOGEL, C. S.; TAO, Q.; BRIDGEN, D. T.; RAZDAN, R. K.; ZIMMER, A. M.; ZIMMER, A.; MARTIN, B. R. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. **Journal of Neurochemistry**. v. 75, n. 6, p. 2434 – 2444, 2000.

DOBRETSOV, M.; BACKONJA, M.M.; ROMANOVSKY, D.; STIMERS, J.R. Animal models of diabetic neuropathic pain. **Neuromethods**. v. 49, p. 147 – 169, 2010.

DYCK, P.J.; KRATZ, K.M.; KARNES, J.L.; LITCHY, W.J.; KLEIN, R.; PACH, J.M.; WILSON, D.M.; O' BRIEN; P.C.; MELTON, L.Jr.; SERVICE, F.J. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. **Neurology**. v. 43, n. 4, p. 817 – 824, 1993.

DYCK, P.J.; DAVIES, J.L.; WILSON, D.M.; SERVICE, F.J.; MELTON, L.J.3RD.; O'BRIEN, P.C. Risk factors for severity of diabetic polyneuropathy: intensive longitudinal assessment of the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. **Diabetes Care**. v. 22, n. 9, p. 1479 – 1486, 1999.

ELSNER, M.; GULDBAKKE, B.; TIEDGE, M.; MUNDAY, R.; LENZEN, S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**. v. 43, n. 12, p.1528 - 1533, 2000.

ERLICH H., VALDES A.M., NOBLE J., CARLSON J.A., VARNEY M., CONCANNON P., MYCHALECKYJ J.C., TODD J.A., BONELLA P., FEAR A.L., LAVANT E., LOUEY A., MOONSAMY P.; TYPE 1DIABETES GENETICS CONSORTIUM. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetesgenetics consortium families. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p.1084 – 1092, 2008.

FEITOSA, A. C. R.; MARANHÃO, R. C.; FEITOSA FILHO, G. S.; WAJCHENBERG, B.L. Transferência de lípidos para a lipoproteína de alta densidade (HDL) em mulheres com diabetes melito tipo 1. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica**. v. 53, n. 1, p. 95 – 101, 2009.

GABBAY, K.H. The Sorbitol Pathway and the Complications of Diabetes. **The New England Journal of Medicine**. v. 288, n. 16, p. 831 – 836, 1973.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R.; Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of American Chemical Society**. v. 86, p. 646 – 647, 1964.

GIUFFRIDA, A.; BELTRAMO, M.; PIOMELLI, D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 298, n. 1, p. 7 – 14, 2001.

GREENE, D.A.; LATTIMER, S.A. Impaired rat sciatic nerve sodium-potassium adenosine triphosphatase in acute streptozocin diabetes and its correction by dietary myo-inositol supplementation. **The Journal of Clinical Investigation**. v.72, n. 3, p. 1058 – 1063, 1983.

GUINDON, J.; BEAULIEU, P. Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. **Neuropharmacology**. v. 50, n. 7, p. 814 – 823, 2006.

GUINDON, J.; LOVERME, J.; DE LÉAN, A.; PIOMELLI, D.; BEAULIEU, P. Synergistic antinociceptive effects of anandamide, an endocannabinoid, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peripheral tissue: A role for endogenous fatty-acid ethanolamides? **European Journal of Pharmacology**. v. 550, n. 1 – 3, p. 68 – 77, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. – Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Elsevier, 11ª ed, p. 961 – 976, 2006.

HASANEIN, P.; SOLTANI, N. Effects of the endocannabinoid transport inhibitors AM404 and UCM707 on diabetic neuropathy in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 36, n. 11, p. 1127 – 1131, 2009.

HELYES, Z.; NÉMETH, J.; THÁN, M.; BÖLCSKEI, K.; PINTÉR, E.; SZOLCSÁNYI, J. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. **Neuropharmacology**. v. 73, n. 18, p. 2345 – 2353, 2003.

HILEY, C. R.; KRAUP, S. S. GPR55 and the vascular receptors for cannabinoids. **The British Journal of Pharmacology**. v. 152, n. 5, p. 559 – 561, 2007.

HOHMANN, A. G. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 121, n. 1 – 2, p. 173 – 190, 2002.

HOHMANN, A. G.; HERKENHAM, M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. **Neuroscience**. v. 92, n. 4, p. 1171 – 1175, 1999.

HOHMANN, A. G.; SUPLITA, R. L. Endocannabinoids mechanisms of pain modulation. **The AAPS Journal**. v. 8, n. 4, p. E693 – E708, 2006.

HOLZER, S.E; CAMEROTA, A.; MARTENS, L.; CUERDON, T.; CRYSTAL-PETERS, J.; ZAGARI, M. Costs and duration of care for lower extremity ulcers in patients with diabetes. **Clinical Therapeutics**. v. 20, n. 1, p. 169 – 181, 1998.

HONG, S.; WILEY, J.H. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 1, p. 618 – 627, 2005.

HOWLETT, A. C. Cannabinoid receptor signaling. **Handbook of Experimental Pharmacology**. v. 35, p. 607 - 634, 2005.

HUDSON, B. D.; HEBERT, T. E.; KELLY, M. E. Ligand and heterodimer directed signaling of the CB1 cannabinoid receptor. **Molecular Pharmacology**. v. 77, n. 1, p. 1 – 9, 2009.

HUNSKAAR, R.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v. 30, n. 1, p. 103 – 114, 1987.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nature Reviews**. v. 2, n. 2, p. 83 – 91, 2001.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR STUDY of PAIN, disponível em: <http://www.iasp-pain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResourceLinks/PainDefinitions/default.htm>. Acesso em 04 Jun 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION ATLAS, 2011, disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em 15 Jan 2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION ATLAS, 2006, disponível em: <http://www.idf.org/diabetesvoice/articles/new-data-fresh-perspectives-diabetes-atlas-third-edition>. Acesso em 08 Jun 2010.

JAGGAR, S. I.; HASNIE, F. S.; SELLATURAY, S.; RICE, A. S. C. The antihyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. **Pain**. v. 76, n. 1 – 2, p. 189 – 199.

JENSEN, T.S.; BACKONJA, M.M.; JIMÉNEZ, S.H.; TESFAYE, S.; VALENSI, P.; ZIEGLER, D. New perspectives on the management of diabetic peripheral neuropathic pain. **Diabetes and Vascular Disease Research**. v. 3, n. 2, p. 108 – 125, 2006.

KAUFMANN, I.; HAUER, D.; HUGE, V.; VOGESER, M.; CAMPOLONGO, P.; CHOUKER, A.; THIEL, M.; SCHELLING, G. Enhanced anandamide plasma levels in patients with complex regional pain syndrome following traumatic injury: a preliminary report. **European Surgical Research**. v. 43, n. 4, p. 325 – 329, 2009.

KELLY, S.; CHAPMAN, V. Selective cannabinoid CB1 receptor activation inhibits spinal nociceptive transmission in vivo. **The American Physiological Society**. v. 86, n. 6, p. 3061 – 3064, 2001.

KIMURA, S.; KONTANI, H. Demonstration of antiallodynic effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on established diabetic neuropathic pain in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 110, n. 2, p. 213 – 217, 2009

KINGERY, W. S. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. **Pain**. v. 73, n. 2, p. 123 – 139, 1997.

KRISHNAN, A.V.; LIN, C.S.Y.; KIERNAN, M.C. Activity-dependent excitability changes suggest Na^+/K^+ pump dysfunction in diabetic neuropathy. **Brain**. v. 131, p. 1209 – 1216, 2008.

KRÖNCKE, K.D.; FEHSEL, K.; SOMMER, A.; RODRIGUEZ, M.L.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**. v. 376, n. 3, p. 179-185, 1995.

LAMBERT, P.; BINGLEY, P.J. What is type 1 diabetes? **Medicine**. v. 34, v. 2, p. 47 – 51, 2006.

LAWRENCE, J. M.; CONTRERAS, R.; CHEN, W.; SACKS, D. A. Trends in the prevalence of preexisting diabetes and gestational diabetes mellitus among a racially/ethnically diverse population of pregnant women, 1999-2005. **Diabetes Care**, v. 31, n. 5, p. 899 – 904, 2008.

LEVITT, N.S.; STANSBERRY, K.B.; WYCHANCK, S.; VINIK, A.I. Natural progression of autonomic neuropathy and autonomic function tests in a cohort of IDDM. **Diabetes Care**. v. 19, n. 7, p. 751 – 754, 1996.

LEWIS, C.; BARBIERS, A.R. Streptozotocin, a new antibiotic. *In vitro* and *in vivo* evaluation. **Antibiotics Annual**. v. 7, p. 247–254, 1959.

LOVINGER, D. M. Presynaptic modulation by endocannabinoids. **Handbook of Experimental Pharmacology**. n. 184, p. 435 – 477, 2008.

MAKRIYANNIS, A.; RAPAKA, R. S. The molecular basis of cannabinoid activity. **Life Sciences**. v. 47, n. 24, p. 2173 - 2184, 1990.

MALAN, T. P. JR.; IBRAHIM, M. M.; DENG, H.; LIU, Q.; MATA, H. P.; VANDERAH, T.; PORRECA, F.; MAKRIYANNIS, A. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. **Pain**. v. 93, n. 3, p. 239 – 245, 2001.

MALLET, C.; DAULHAC, L.; BONNEFONT, J.; LEDENT, C.; ETIENNE, M.; CHAPUY, E.; LIBERT, F.; ESCHALIER, A. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. **Pain**. v. 139, n. 1, p. 190 – 200, 2008.

MARTIN, C.L.; ALBERS, J.; HERMAN, W.H.; CLEARY, P.; WABERSKI, B.; GREENE, D.A.; STEVENS, M.J.; FELDMAN E.L.; DCCT/EDIC RESEARCHGROUP. Neuropathy among the Diabetes Control and Complications Trial Cohort 8 years after trial completion. **Diabetes Care**. v. 29, n. 2, p. 340 – 344, 2006.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**. v. 346, n. 6284, p. 561 – 564, 1990.

MERKSEY, H.; BODGUK, N. Classification of chronic pain. **IASP Press**. 2ª edição, p. 209 – 241, 1994.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. v. 57, n. 1, p. 1 – 164, 1998.

MONORY, K.; BLAUDZUN, H.; MASSA, F.; KAISER, N.; LEMBERGER, T.; SCHÜTZ, G.; WOTJAK, C. T.; LUTZ, B.; MARSICANO, G. Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Δ 9-tetrahydrocannabinol in mice. **PLoS Biology**. v. 5, n. 10, p. 2354 - 2368, 2007.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**. v. 365, n. 6441, p. 61 - 65, 1993.

NARENDRAN, P.; ESTELLA, E.; FOURLANOS, S. Immunology type 1 diabetes. **QJM: Journal Medicine**, v. 98, n. 1, p. 547-556, 2005.

NATHAN, D.M. Long-term complications of diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**. v. 328, n. 23, p. 1676 – 1685, 1993.

ONAIWI, E. S.; SUGIURA, T.; di MARZO, V. Endocannabinoids – The brain and body's marijuana and beyond. **Taylor and Francis**. 1ª edição, p. 11 – 34, 2006.

OVERTON, H. A.; BABSS, A. J.; DOEL, S. M.; FYFE, M. C.; GARDNER, L. S.; GRIFIN, G.; JACKSON, H. C.; RASAMISON, C. M.; TANG-CHRISTENSEN, M.; WIDDOWSON, P. S.; WILLIAMS, G. M.; REYNET, C. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. **Cell Metabolism**. v. 3, n. 3, p. 167 – 175, 2006.

PACHER, P.; BATKAI, S.; KUNOS, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**. v. 58, n. 3, p. 389 – 462, 2006.

PETROCELLIS, L.; Di MARZO, V.; Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**. v. 5, n. 1, p. 103 – 121, 2010.

PERTWEE, R. G.; ROSS, R. A. Cannabinoid receptors and their ligands. **Prostaglandins Leukot and Essential Fatty Acids**. v. 66, n. 2 – 3, p. 101 – 121, 2002.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid receptors and pain. **Progress in Neurobiology**. v. 63, n. 5, p. 569 – 611, 2001.

PORTHA, B.; LEVACHER, C.; PICON, L.; ROSSELIN, G. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. **Diabetes**. v. 23, p. 889-895, 1974.

POTENZIERI, C.; BRINK, T. S.; PACHARINSAK, C.; SIMONE, D. A. Cannabinoid modulation of cutaneous A δ nociceptors during inflammation. **Journal of Neurophysiology**. v. 100, n. 5, p. 2794 – 2806, 2008.

RABINOVICH, A.; SUAREZ-PINZON, W.L. Cytokines and Their Roles in Pancreatic Islet β –Cell Destruction and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Biochemical Pharmacology**. v. 55, n. 8, p. 1139 – 1149, 1998.

RACZ, I.; NADAL, X.; ALFERINK, J.; BAÑOS, J. E.; REHNELT, J.; MARTÍN, M.; PINTADO, B.; GUTIERREZ-ADAN, A.; SANGUINO, E.; MANZANARES, J.; ZIMMER, A.; MALDONADO, R. Crucial role of CB(2) cannabinoid receptor in the regulation of central immune responses during neuropathic pain. **Journal of Neurosciences**. v. 28, n. 46, p. 12125 – 12135, 2008.

RAHN, E.J.; HOHMANN, A.G. Cannabinoids as pharmacotherapies for neuropathic pain: from the bench to the bedside. **Neurotherapeutics**. v. 6, n. 4, p. 713 – 737, 2009.

RICE, A. S. C. Local neuro-immune interactions in visceral hyperalgesia: bradykinin, neurotrophins and cannabinoids. In: BOUNTRA, C.; SCHMIDT W.; MUNGLANI, R. Pain: Current Understanding, Emerging Therapies and Novel Approaches to Drug Discovery. New York: **Marcel Dekker**, 2002.

RICE, A. C. S.; FARQUHAR-SMITH, W. P.; NAGY, I. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 66, n. 2 – 3, p. 243 – 256, 2002.

ROGLIC G. Diabetes in women: The global perspective. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**. v. 104, p.S11 – S13, 2009.

RYBERG, E.; LARSSON, N.; SJOGREN, S.; HJORTH, S.; HERMANSSON, N. O.; LEONOVA. J.; ELEBRING, T.; NILSSON, K.; DRMOTA, T.; GREASLEY P. J. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. **The British Journal of Pharmacology**. v. 152, n. 7, p. 1092 – 10101, 2007.

SAID, G.; Diabetic neuropathies – a review. **Nature**. v. 3, p. 331 – 341, 2007.

SCHESTASKY, P.; NASCIMENTO, O.J.M. What do general neurologist need to know about neuropathic pain? **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v. 67, n. 3A, p. 741 – 749, 2009.

SHAW, J.E.; ZIMMET, P.Z. The epidemiology of diabetic neuropathy, **Diabetes Reviews**. v. 7, p. 245 – 252, 1999.

SHAW, K.M.; CUMMINGS, M.H. Diabetes: Chronic complications. **Wiley**, 2ª edição, p. 35 – 53, 2005.

SIMA, A.A.; BRISMAR, T. Reversible diabetic nerve dysfunction: structural correlates to electrophysiological abnormalities. **Annals of Neurology**. v. 19, n. 1, p. 21 – 29, 1985.

SIMA, A.A.; THOMAS, P.K.; ISHII, D.; VINIK, A. Diabetic Neuropathies. **Diabetologia**. v. 40, p. B74 – B77, 1997.

SIMA, A.A.; SUGIMOTO, K. Experimental diabetic neuropathy: an update, **Diabetologia**. v. 42, n. 7, p. 773 – 788, 1999.

SIMA, A.A.F. Chronic complications of diabetes – Animal models and chronic complications. **Taylor & Francis**. v. 1, p. 26, 2000.

SORENSEN, L.; MOLYNEAUX, L.; YUE, D.K. Insensate versus painful diabetic neuropathy: the effects of height, gender, ethnicity and glycaemic control. **Diabetes Research in Clinical Practice**. v. 57, n. 1, p. 45 – 51, 2002.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**. v.50, n. 6, p. 537 – 546, 2001.

SUGIURA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A.; NAKANE, S.; SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 215, n. 1, p. 89 – 97, 1995.

TESFAYE, S. Diabetic neuropathy: achieving best practice. **The British Journal of Diabetes and Vascular Disease**. v.3, p. 112 – 117, 2003.

TESFAYE, S. Advances in the management of diabetic peripheral neuropathy. **Current Opinion in Support and Palliative Care**. v.3, n. 2, p. 136 – 143, 2009.

THE CAPSAICIN STUDY GROUP. Treatment of painful diabetic neuropathy with topical capsaicin: a multicenter, double-blind, vehicle-controlled study. **Archives of Internal Medicine**. v. 151, n. 11, p. 2225 – 2229, 1991.

THE EXPERT COMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF *DIABETES MELLITUS*. Follow-up report on the diagnosis of *diabetes mellitus*. **Diabetes Care**. v. 26, p. 3160 – 3167, 2003.

TÖLLE, T.; XU, X.; SADOSKY, A. B. Painful diabetic neuropathy: a cross-sectional survey of health state impairment and treatment patterns. **Journal of Diabetes Complications**. v. 20, p. 26 – 33, 2006.

TRUDEAU, J.D.; DUTZ, J.P.; ARANY, E.; HILL, D.J.; FIELDUS, W.E.; FINEGOOD D.T. Neonatal β -cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? **Diabetes**. v. 49, n. 1, v. 1, p. 1 – 7, 2000.

TSOU, K.; BROWN, S.; SAÑUDO-PEÑA, M. C.; MACKIE, K.; WALKER, J. M. Immunohistochemical localization of cannabinoid CB 1 receptors in rat central nervous system. **Neuroscience**. v. 83, n. 2, p. 393 – 411, 1998.

ULUGOL, A.; KARADAG, H. C.; IPCI, Y.; TAMER, M.; DOKMECI, I. The effect of WIN 55,212-2, a cannabinoid agonist, on tactile allodynia in diabetic rats. **Neuroscience Letters**. v. 371, n. 2 – 3, p. 167 – 170, 2004.

UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. UK prospective diabetes study 16. Overview of 6 year's therapy of type II diabetes: a progressive review. **Diabetes**. v. 44, p. 1249 – 1258, 1995.

UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. **Lancet**. v. 352, p. 837 – 853, 1998.

VAUGHAN, C. W.; CONNOR, M.; BAGLEY, E. E.; CHRISTIE, M. J. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. **Molecular Pharmacology**. v. 57, n. 2, p. 288 – 295, 2000.

VINIK, A. I. Diabetic neuropathy: emerging data on a new therapeutic class. **Advanced Studies in Medicine**. v. 4, p. S421 – S427, 2004.

VINIK, A. I.; MEHRABYAN, A. Diabetic neuropathies. **The Medical Clinics of North America**. v. 88, n. 4, p. 847 – 899, 2004.

VINIK, A. I.; PARK, T. S.; STANSBERRY, K. B.; PITTENGER, G. L. Diabetic Neuropathies. **Diabetologia**. v. 43, n. 8, p. 957 – 973, 2000.

YAGIHASHI, S. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy, **Diabetes/Metabolism Review**. v. 11, n. 3, p.193–225, 1995.

YAGIHASHI, S.; YAMAGISHI, S.; WADA, R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: Correlation with clinical signs and symptoms. **Diabetes Research and Clinical Practice**. V. 77, p. S184 – S189, 2007.

ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 28, n. 2, p. 153 – 157, 2006.

WADA, R.; NISHIZAWA, Y.; YAGIHASHI, N.; TAKEUCHI, M.; ISHIKAWA, Y.; YASUMURA, K.; NAKANO, M.; YAGIHASHI, S. Effects of OPB-9195, antiglycation agent, on experimental diabetic neuropathy. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 31, n. 6, p. 513 – 520, 2001.

WADA, R.; YAGIHASHI, S. Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1043, 598 – 604, 2005.

WALKER, J. M.; HUANG, S. M. Endocannabinoids in pain modulation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 66, n. 2 – 3, p. 235 – 242, 2002.

WALKER, J. M.; KREY, J. F.; CHU, C. J.; HUANG, S. M. Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 121, n. 1 – 2, p. 159 – 172, 2002.

WALKER, J. M.; HOHMANN, A. G. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. **Handbook of Experimental Pharmacology**. n. 168, p. 509 – 554, 2006.

WEST, E.; SIMON, O.R.; MORRISON, E.Y. Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. **West Indian Medicine Journal**. v. 45, p. 60-62, 1996.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**. v. 353, n. 9168, p. 1959 – 1964, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/index.html>. Acessado em 19 Jan 2012.

WU, E.Q.; BORTON, J.; SAID, G.; LE, T.K.; MONZ, B.; ROSILIO, M.; AVOINET, S. Estimated prevalence of peripheral neuropathy and associated pain in adults with diabetes in France. **Current Medical Research and Opinion**. v. 23, n. 9, p. 2035 – 2042, 2007.