

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAIANY DARLLY BELLO REDIVO

EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA-3
SOBRE A ALODINIA MECÂNICA E COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO
ASSOCIADOS AO DIABETES EXPERIMENTAL

CURITIBA

2015

DAIANY DARLLY BELLO REDIVO

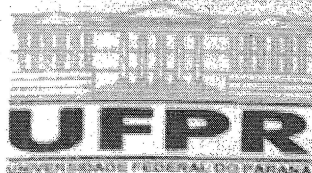
EFEITO DO TRATAMENTO COM ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA-3
SOBRE A ALODINIA MECÂNICA E COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO
ASSOCIADOS AO DIABETES EXPERIMENTAL

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.

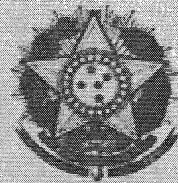
Orientadora: Profa. Dra. Joice M. da Cunha
Co-orientadora: Profa. Dra. Janaina M. Zanoveli

CURITIBA

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 790

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

PROCESSO: 23075.015519/2014-28

APROVADO: 22/05/2014 – R.O. 04/2014

TÍTULO: Efeito do ácido graxo polinsaturado ômega 3 na dor neuropática e depressão associadas ao diabetes

PIBIDORES: Joice Maria da Cunha, Daiany Darlly Bello Redivo, Anne Schreiber, Janaina Menezes Zanovelli

ÁREA: Farmacologia

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ


Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0


PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **DAIANY DARILLY BELLO REDIVO**, intitulada: "**Efeito do tratamento com ácido graxo polinsaturado ômega-3 sobre a alodinia mecânica e comportamento do tipo-depressivo associados ao diabetes experimental.**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO, completando-se assim todos os requisitos previstos nas normas desta Instituição para a obtenção do Grau de **Mestre em FARMACOLOGIA**.

Curitiba, 09 de Julho de 2015.


Prof ANETE CURTE FERRAZ


Prof JOICE MARIA DA CUNHA


Prof RAFAELA FRANCO CLAUDINO

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 artigo foi formatado de acordo com as normas propostas por periódicos internacionais.

AGRADECIMENTOS

A vida acadêmica como todos sabem não é fácil, é um caminho tortuoso o qual nos exige a cada dia mais força e firmeza em nossas decisões, no entanto, este foi o caminho que escolhi, o mundo acadêmico, o privilégio de ser professor e ter o dom de ensinar. Para chegar até aqui contei primeiramente com a benção divina, que me guiou a cada dia, iluminou minhas ideias e com toda certeza colocou cada uma das pessoas que citarei abaixo em minha vida.

Agradeço imensamente aos meus pais, que me acompanharam em cada dia desde o primeiro dia de aula até o dia de hoje, onde receberemos o tão sonhado título de MESTRE. Obrigada família amada, mãe, pai, irmã e avó por todo apoio, carinho, votos de sucesso, sem vocês eu não seria nem metade do que sou hoje. Gostaria de agradecer imensamente ao meu esposo, Cristiano Joaquim Foscarini, uma pessoa iluminada que Deus colocou em minha vida para completa-la e enche-la de amor, agradeço por todos os dias e noites que esteve comigo, por cada fim de semana de estudos os quais você me enchia de mimos e delícias culinárias. Agradeço por me apoiar, me ajudar em tomadas de decisão as quais estiveram sempre presentes, por me amar e cuidar com o zelo que o faz, e por ser, sem sombra de dúvidas, a pessoa mais importante da minha vida. TE AMO. Agradeço imensamente a minha orientadora, Joice M. da Cunha e minha co-orientadora Janaina M. Zanoveli, as quais sempre estiveram presentes para ouvir e dar sugestões, ideias, sábios conselhos e por me proporcionar a oportunidade de ingressar no mestrado e chegar até aqui, agradeço as orações feitas, cada palavra de afeto e cada bronca merecida, as quais foram fundamentais para o meu crescimento. Agradeço a todos os colegas de laboratório e de departamento, em especial às minhas queridas Rosanne Bortolazzo, Eliana Adami e especialmente, a minha querida amiga Anne Karoline Schreiber, que além de amiga foi minha mentora e me acompanhou em cada dia de experimento, sempre fazendo o possível e o impossível para me ajudar. Agradecimento em especial à CAPES pelo suporte financeiro, ao departamento de farmacologia pela oportunidade, e ao biotério da UFPR pelo apoio e repasse dos animais.

“When you've fighting for it all your life/ You've been working every day and night/
That's how a superhero learns to fly/ Every day, every hour/
Turn the PAIN into POWER”

(The Script - Superheroes)

RESUMO

A dor neuropática e a depressão são comorbidades muito comuns em pacientes diabéticos. Como os mecanismos patofisiológicos subjacentes ao diabetes são muito complexos e multifatoriais, os tratamentos disponíveis são apenas sintomáticos e geralmente comprometem o controle glicêmico. Assim, a procura por tratamentos mais efetivos é extremamente urgente. Neste sentido, avaliamos o efeito do tratamento crônico com óleo de peixe (OP), uma fonte de ácidos graxos poliinsaturados ω -3, na alodinia mecânica e no comportamento tipo-depressivo em ratos diabéticos induzidos quimicamente por estreptozotocina. Foi observado que os animais diabéticos (DBT), quando comparados aos animais normoglicêmicos (NGL), desenvolveram alodinia mecânica a partir da segunda semana após a indução do quadro diabético, com pico na quarta semana após a diabetização, o qual foi prevenido pelo tratamento com OP (doses de 0,5, 1 e 3 g/Kg). Além disso, animais do grupo DBT apresentaram comportamento do tipo-depressivo caracterizado pelo aumento da frequência de imobilidade e redução na frequência de natação e escalada no teste de nado forçado modificado (MFST) na segunda semana após a indução ao diabetes, comportamento que perdurou até a quarta semana após a diabetização. O tratamento com OP (apenas na dose de 3 g/Kg) reduziu a frequência de imobilidade e aumentou a frequência de natação, sem afetar a escalada em animais DBT. Não obstante, foi observado que animais DBT possuem menores níveis de BDNF tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal quando comparados aos animais controle, diminuição que foi prevenida pelo tratamento com OP. Assim, nosso estudo mostra que o tratamento com OP foi capaz de prevenir o desenvolvimento de alodinia mecânica e os comportamentos do tipo-depressivo em ratos diabéticos, o que pode estar relacionado com sua capacidade de restaurar os níveis de BDNF, visto que o BDNF vem se demonstrando importante na dor e depressão.

Palavras-chave: Estreptozotocina, dor, depressão, óleo de peixe, BDNF.

ABSTRACT

Neuropathic pain and depression are very common comorbidities in diabetic patients. As the pathophysiological mechanisms are very complex and multifactorial, current treatments are only symptomatic and often worsen the glucose control. Thus, the search for more effective treatments are extremely urgent. In this way, we aimed to investigate the effect of chronic treatment with fish oil (FO), a source of ω -3 polyunsaturated fatty acid, on mechanical allodynia and in depressive-like behaviors in streptozotocin-diabetic rats. It was observed that the diabetic (DBT) animals, when compared to normoglycemic (NGL) animals, developed a significant mechanical allodynia since the second week after diabetes induction, peaking at fourth week which is completely prevented by FO treatment (0.5, 1 or 3 g/Kg). Moreover, DBT animals showed an increase of immobility frequency and a decrease of swimming and climbing frequencies in modified forced swimming test (MFST) since the second week after diabetes induction, lasting up at the 4th week. FO treatment (only at dose of 3 g/Kg) significantly decreased the immobility frequency and increased the swimming frequency, but did not induce significant changes in the climbing frequency in DBT rats. Moreover, it was observed that DBT animals had significant lower levels of BDNF in both hippocampus and pre frontal cortex when compared to NGL rats, which is completely prevented by FO treatment. In conclusion, our study demonstrates that FO treatment was able to prevent the mechanical allodynia and the depressive-like behaviors in DBT rats, which seems to be related to its capacity of BDNF levels restoration.

Key words: streptozotocin, pain, depression, fish oil, BDNF.

LISTA DE FIGURAS ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1. Time course of experimental protocol	49
FIGURE 2. Effect of the treatment with fish oil (FO; 0.5, 1 g/kg or 3 g/kg) on the mechanical threshold in STZ-diabetic rats.	49
FIGURE 3. Effect of the treatment with fish oil (FO; 0.5, 1 g/kg or 3 g/kg) on frequency of immobility (panel A), swimming (panel B) or climbing (panel C) in STZ-diabetic rats.	50
FIGURE 4. Effect of the treatment with fish oil (FO; 3 g/kg) on the BDNF levels in hippocampus (panel A) or pre frontal cortex (panel B) of STZ-diabetic rats.	51

LISTA DE TABELAS ARTIGO CIENTÍFICO

TABLE 1: Effect of the treatment with fish oil (FO; 0.5, 1 or 3 g/Kg) on blood glucose levels in streptozotocin (STZ)-diabetic (DBT) rats	52
TABLE 2: Effect of the treatment with fish oil (FO; 0.5, 1 or 3 g/Kg) on body mass (in grams) in streptozotocin (STZ)- diabetic (DBT) rats	53
TABLE 3: Effect of the treatment with fish oil (FO; 0.5, 1 or 3 g/kg) on locomotor activity in streptozotocin (STZ)-diabetic (DBT) rats	54

LISTA DE ABREVIATURAS

IDF – International Diabetes Federation

DM1 – Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2 - Diabetes *mellitus* tipo 2

DMG - Diabetes *mellitus* gestacional

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

PNDS – Polineuropatia Simétrica Distal

IASP – International Association for the Study of Pain

SBED – Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor

SP – Substância P

CGRP – Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

DND – Dor Neuropática Diabética

APA – American Psychological Association

DSM-V - Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais 5.^a edição

HPA – Eixe Hipotálamo-pituitária-adrenal

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

EO – Estresse Oxidativo

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-2

TNF α - Fator de Necrose tumoral α

-CHO - Metil

-COOH – Carboxil

AGPI-n3 – Ácido Graxo Poli-insaturado Ômega 3

α -LNA – Ácido α -Linolenico

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

DHA – Ácido Docosahexaenóico

COX – Cicloxigenase

LOX – Lipoxigenase

AA – Ácido Araquidônico

AGPI-n6 – Ácido Graxo Poli-insaturado Ômega 6

GPR-40 – Receptor Acoplado a Proteína G - 40

FFAR-1 – Receptor para Ácidos Graxos Livres - 1

AMPc – AMP cíclico

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	16
1.1 Diabetes <i>mellitus</i>	16
1.2 Neuropatia, dor e dor neuropática	18
1.3 Tratamento da dor neuropática diabética	20
1.4 Depressão	21
1.5 Tratamento da depressão	23
1.6 Relação entre dor neuropática e depressão associadas ao diabetes	24
1.7 Ácido Graxo Poli-insaturado Ômega-3	24
2) OBEJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos específicos	28
3) ARTIGO CIENTÍFICO	28
3.1 Introduction	28
3.2 Material and Methods	30
3.2.1 Animals	30
3.2.2 Drugs	30
3.2.3 Diabetes induction	30
3.2.4. Mechanical allodynia measurement (Von Frey test)	31
3.2.5. Modified forced swimming test	31
3.2.6. Open field test	32
3.2.7. Tissue collection and sample preparation to BDNF analyses	32
3.2.8. Quantification of BDNF levels	32
3.2.9. Experimental protocol	33
3.2.10. Statistical Analysis	33
3.3 Results	34
3.3.1. Effect of the treatment with fish oil on the mechanical allodynia in STZ-diabetic animals	34
3.3.2. Effect of the treatment with fish oil on the blood glucose and body mass in STZ-diabetic animals	

3.3.3. Effect of the treatment with fish oil on the depressive-like behaviors in STZ-diabetic animals	35
3.3.4. Effect of the treatment with fish oil on the locomotor activity in STZ-diabetic animals	36
3.3.5. Effect of the treatment with fish oil on BDNF levels in hippocampus and in pre frontal cortex of diabetic animals	36
3.4 Discussion	36
3.5 Conflict of interest	41
3.6 Acknowledgements	41
3.7 References	41
3.8 Figure legends	48
3.9 Figures	49
3.10 Tables	52
3.11 Highlights	54
4) CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS	55

1) INTRODUÇÃO

1.1. DIABETES *mellitus*: histórico, tipos e prevalência.

Diabetes *mellitus* é uma síndrome crônica complexa, caracterizada pela deficiência da produção de hormônio peptídico insulina ou pela resistência dos tecidos periféricos à ação de tal hormônio, podendo ainda apresentar-se durante a gestação, caracterizando o diabetes gestacional (IDF, 2015).

As características clínicas do diabetes vêm sendo observadas há séculos, das quais a poliúria (aumento do fluxo urinário) foi a primeira manifestação, a qual está até os dias atuais sendo reconhecida como característica marcante da doença. A palavra “diabetes” foi utilizada pela primeira vez por Aretaeus, da Capadócia, dois séculos D.C, o qual descreveu a poliúria, sede e perda de peso. A associação do diabetes com a função pancreática foi proposta no ano de 1889 por Oskar Minkowski e Joseph von Mering, os quais observaram que, ao retirar o pâncreas de cachorros, os animais desenvolviam o quadro diabético, caracterizado por poliúria, sede, hiperglicemia e glicosúria (BILOUS; DONNELLY, 2010). A relação diabetes e o hormônio insulina, no entanto, precede estes achados, com descrição de aglomerados de células no pâncreas em 1869 por Paul Langerhans. As funções destes aglomerados de células pancreáticas foram definidas em 1893, por Edouard Laguesse, o qual sugeriu que o pâncreas se tratava de um tecido endócrino o qual era responsável pela produção de hormônios envolvidos na redução da glicose sérica e denominou esses aglomerados de “Ilhotas de Langerhans”. Adicionalmente, em 1921, um grupo de pesquisadores se reuniu e injetou um extrato feito a partir de pâncreas caninos em animais pancreatectomizados, os quais apresentaram posteriormente, controle da glicose sérica (BILOUS; DONNELLY, 2010). Clinicamente, Leonard Thompson de 14 anos, em 1922, foi o primeiro a receber insulina. No ano seguinte, a insulina passou a ser amplamente utilizada em toda a América do Norte e Europa, porém somente em 1955, a estrutura primária da mesma foi caracterizada por Frederick Sanger.

A primeira utilização clínica do termo diabetes foi feita por Himsworth (1936), sendo sugerida a existência de duas formas da doença: a primeira em que a insulina era deficiente, ocorrendo principalmente em jovens magros; e a outra forma apresentada pela resistência à ação da insulina por adultos com excesso de peso. Atualmente, a Federação Internacional do Diabetes sugere a existência de três principais formas da doença, o Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1), Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e Diabetes Mellitus gestacional (DMG).

Com relação ao DM1, o mesmo inicia-se tipicamente em crianças e jovens, sendo necessária a administração diária de insulina para a sobrevivência dos pacientes. Como resultado de ataque do sistema imune, há morte das células β pancreáticas, responsáveis pela produção e secreção de insulina, tornando tal administração indispensável, no entanto os mecanismos envolvidos na geração de tal reatividade contra as células β ainda não são totalmente elucidados (IDF, 2015).

Já o DM2, costumava ser chamado de diabetes não dependente de insulina, é a forma mais comum da doença, ocorrendo em cerca de 90% dos casos. É caracterizado por uma resistência ou deficiência de insulina podendo passar despercebido durante anos. O DM2 pode estar comumente relacionado à obesidade e aumento do peso levando a resistência à ação da insulina e consequentemente aumento dos níveis de glicose. Nesses casos a administração de insulina pode não ser necessária, ao menos inicialmente, sendo que a associação entre dieta adequada e exercícios físicos costuma ser eficaz (IDF, 2015).

O DMG é prevalente em uma a cada 25 mulheres no mundo (IDF, 2015), sendo caracterizado pela resistência à insulina durante o período gestacional, em geral passageiro, mas que aumenta a probabilidade de desenvolvimento de diabetes tipo 2 posteriormente na mãe e comprometimento do desenvolvimento fetal (SBD, 2015).

Atualmente, acredita-se que cerca de 387 milhões de pessoas sejam diabéticas, das quais 46,3% sejam não diagnosticadas (IDF, 2015). Estima-se que a população diabética será de aproximadamente 592 milhões de pessoas em 2035. No Brasil, cerca de 11 milhões de pessoas são portadoras de diabetes, sendo prevalente em 9% da população Brasileira (IDF, 2013).

Dentre as complicações e comorbidades relacionadas ao diabetes, e de importância para nosso estudo, a polineuropatia simétrica distal (PNDS) é a complicação mais prevalente (Tesfaye, Boulton, Dickenson, 2013), sendo a dor neuropática diabética sua manifestação mais relatada (Ahroni et al., 1994; Harati et al., 1996). Similarmente, a depressão é o transtorno de humor que mais se manifesta em pacientes diabéticos, levando a morbidade severa (Lang; Borgwardt, 2013).

1.2. NEUROPATIA, DOR E DOR NEUROPÁTICA

As neuropatias, ou situações em que há alteração no processamento ou transmissão da informação nervosa, a nível central ou periférico, são as complicações mais comuns em diabéticos sendo a polineuropatia distal simétrica (PNSD) a forma mais prevalente. Acomete cerca de 90% dos pacientes, especialmente pernas e pés e caracterizando-se pela perda progressiva e centrípeta das fibras nervosas motoras e sensoriais (Tesfaye, Boulton, Dickenson, 2013). Dentre estes pacientes que apresentam PNSD, de 10 a 46%, dependendo do critério diagnóstico, podem apresentar dor em decorrência do quadro de polineuropatia (Ahroni et al., 1994; Harati et al., 1996).

A dor, de modo geral, é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que é associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”. Considerada como o 5º sinal vital, além de ser um dos motivos mais relevantes para a busca de auxílio médico (SBED, 2015), a sensação dolorosa é considerada como protetora da integridade física do indivíduo, caracterizada por sua duração e intensidade que são coincidentes com as do estímulo a ser informado (Woolf; Mannion, 2009)

A sinalização da informação nociceptiva inicia-se pela estimulação de fibras nervosas presentes em diferentes tecidos, como pele, vísceras e músculos, chamadas de nociceptores após dano ou lesão tecidual. Estas células são classificadas como fibras C e A δ de acordo com o diâmetro, estrutura e velocidade

de condução da fibra. As fibras C são amielinizadas, enquanto as fibras A δ são finamente mielinizadas, sendo que ambas são denominadas como fibras nociceptivas (Belmonte, 1996, Handwerker, 1993).

Após dano ou lesão tecidual, as fibras A δ são responsáveis por uma fase primária da sensação dolorosa, devido à sua maior velocidade de condução, ao passo que as fibras C são responsáveis por uma segunda fase, mais profunda (Belmonte, 1996, Handwerker, 1993). Na ocorrência de dano tecidual há a liberação de substâncias como substância P (SP), glutamato e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) pelas fibras nervosas que sensibilizam neurônios na matéria cinzenta, no corno dorsal (Baranauskas; Nistri 1998). Na medula, a matéria cinzenta é dividida em dez lâminas (Besson; Chaouch, 1987), conhecidas como lâminas de Rexed, sendo as lâminas I, II, V e VI envolvidas na transmissão da informação nociceptiva (Molander; Grant, 1986).

As fibras C e A δ conduzem via tratos ascendentes essa informação da medula ao córtex, passando por regiões superiores importantes, como o tálamo, onde a dor é processada e recebe características como localização, qualidade e intensidade (Schestasky; Nascimento, 2009). Diferentemente das demais percepções sensoriais, os nociceptores de estímulos dolorosos não se adaptam com o passar do tempo, sendo que mesmo estímulos pouco dolorosos passam a ser entendidos com maior intensidade e podem persistir por longos períodos (Basbaum; Bushnell, 2009).

Os mecanismos relacionados à gênese das alterações sensoriais como alodinia (estímulos geralmente inócuos passam a ser entendidos como dor) e hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos nociceptivos) no diabetes não estão completamente elucidados, porém muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com este propósito. Há um consenso de que alterações em vias metabólicas, resultantes da hiperglicemia, parecem contribuir de forma mais relevante para a patogenicidade da doença (Calcutt et al., 1996; Lee, McCarty, 1992, 1990; Bertelsmann et al., 1987). Entretanto, estas alterações não podem ser apontadas como únicas causadoras de tais disfunções (alodinia e hiperalgesia), uma vez que a recuperação do quadro normoglicêmico, por meio da administração de insulina, não consegue

reverter completamente a dor crônica em decorrente do diabetes (Pop- Busui et al., 2009; Alberts et al., 2010). Dentre as alterações periféricas observadas na dor neuropática diabética podemos citar diminuição do calibre axonal e redução na velocidade de condução das fibras (para revisão veja: Calcutt et al., 1996), alteração na expressão e distribuição de canais de sódio e cálcio e aumento do fluxo de glicose. Com relação as alterações centrais, podemos citar sensibilização central, mudança no balanço facilitação/inibição da via descendente da dor e aumento da vascularização talâmica (Tesfaye; Boulton; Diekenson, 2013).

A dor neuropática é definida como dor causada por uma lesão ou doença do sistema somatosensorial, tendo como características a alodinia e a hiperalgesia (IASP, 2011). A dor neuropática diabética (DND) é caracterizada por dores musculares profundas, sensação de queimação persistente ou sensação de formigamento (Ziegler, 2008). Esta complicação está associada à morbidade severa, tendo também efeito negativo na qualidade de vida do indivíduo (Kulkantrakorn, Lorsuwansiri, 2013), bem como redução nas interações sociais e no sono, aumentando assim o índice de mortalidade (Ahroni et al., 1994).

1.3. TRATAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

Por se tratar de uma doença multifatorial, o tratamento da DND é especialmente difícil, devido sua refratariedade a diversas drogas (para revisão veja: Schreiber et al., 2015). Atualmente, somente as drogas pregabalina, duloxetina e tapentadol são aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento da DND, no entanto, drogas pertencentes a diferentes classes, como antidepressivos tricíclicos, antiepiléticos e combinações possam ser utilizados (Max et al., 1992) e até analgésicos tópicos, como a capsaicina (Peltrier; Goutman; Callaghan, 2014). De modo geral, os tratamentos acima citados ainda apresentam baixa adesão devido aos efeitos adversos e à baixa efetividade (para revisão veja: Schreiber et al., 2015), sendo que apenas um terço dos pacientes apresentam melhora com os tratamentos (Ney et al., 2013).

Dentre o tratamento com antiepiléticos a pregabalina tem mostrado bons resultados (para revisão veja: Schreiber et al., 2015), embora haja estudos sugerindo que sua eficácia é menor que a dos antidepressivos (Morello et al., 1999; Gilron, Max, 2005), outros estudos clínicos sugerem que a pregabalina e a gabapentina apresentam melhor efeito analgésico ao serem comparadas a antidepressivos tricíclicos e opióides (para revisão veja: Schreiber et al., 2015).

Estudos recentes indicam que, mesmo após essas abordagens terapêuticas, um número reduzido de pacientes consegue apresentar melhora, sendo que a maioria deles não responde ao tratamento com estes medicamentos (Tesfaye; Boulton; Dickenson, 2013; Jensen et al., 2006), permanecendo assim um desafio para os profissionais da saúde. A escassez de drogas realmente efetivas para a terapia da DND pode ser decorrente da complexidade da fisiopatologia do diabetes e os mecanismos envolvidos com a geração da DND, associados aos inúmeros efeitos colaterais apresentados pelo uso dos analgésicos utilizados, inviabilizando seu uso contínuo (para revisão veja: Schreiber et al., 2015). Dessa maneira, torna-se vital não somente o melhor entendimento das vias envolvidas, mas também a busca de novas alternativas terapêuticas.

1.4. DEPRESSÃO

Distúrbios metabólicos e obesidade geralmente são relacionados a problemas cardiovasculares, no entanto, a desregulação metabólica e alterações nos níveis séricos de glicose (aumento dos níveis) podem influenciar na função cerebral bem como pode estar relacionado a depressão (Hendrickx; McEwen; Ouderaa, 2005).

Autores sugerem que a depressão e o diabetes compartilham uma relação bidirecional visto que a depressão é o distúrbio de humor mais prevalente em pacientes diabéticos (Fisher et al., 2008; Renn et al. 2011) e comparado à população em geral, pacientes diabéticos possuem maior prevalência quanto ao desenvolvimento de transtornos do humor (Simon et. al., 1995; De Groot et. al., 2001), sendo que os sintomas depressivos manifestam-se em cerca de 12-29% dos homens e 23-30% das mulheres recém diagnosticados com diabetes (Lang;

Borgwardt, 2013). Em contrapartida, pacientes com sintomas depressivos instalados apresentam aumento dos níveis de glicose em jejum (Golden et al., 2009) e risco aumentado de desenvolver diabetes (Golden et al., 2008) em aproximadamente 60% (Nouwen; Lloyd; Pouwer, 2009).

A depressão, no geral, é um distúrbio psiquiátrico incapacitante que ocorre independente do gênero, idade e classe social. O diagnóstico da doença é feito segundo critérios estabelecidos pela Associação Psiquiátrica Americana (APA) na publicação da quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (DSM-V, APA, 2013). Baseia-se, portanto, na apresentação de sintomas como humor deprimido, perda de prazer em atividades, perda ou ganho de peso corporal, fadiga ou perda de energia, insônia ou agitação, falta de concentração, baixa autoestima, distúrbios do sono e aumento ou diminuição do apetite, dentre outros, geralmente persistentes por pelo menos duas semanas (DSM-V, APA, 2013).

Estas manifestações podem se tornar além de crônicas, recorrentes, levando em alguns casos a prejuízos importantes na capacidade do indivíduo de cuidar de suas responsabilidades diárias. Em alguns casos a depressão leva ao suicídio, uma fatalidade associada à perda de cerca de 850.000 vidas a cada ano no mundo todo (Lang; Borgwardt, 2013). Apesar de sua patologia não ser completamente entendida, sabe-se que existem vários fatores envolvidos como alterações na neurotransmissão de monoaminas, desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), diminuição do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) (Duman, 2004; Schmidt et al., 2011), neuroinflamação (Schmidt et al., 2011; Miller; Maletic; Raison, 2009), entre outros (Charney; Manji, 2004). Apesar de sua prevalência, a depressão ainda pode aumentar o risco de desenvolvimento de inúmeras patologias, entre elas problemas cardiovasculares (Van der Kooy et al., 2007), doença de Alzheimer (Green et al., 2003), epilepsia (Hesdorffer et al., 2000), câncer (Penninx et al., 1998) e diabetes (Nouwen; Lloyd; Pouwer, 2009).

A depressão em pacientes diabéticos é proposta como sendo o resultado de alterações no estilo de vida (restrição dietética, tratamento crônico, aumento em gastos financeiros, aumento em frequência de hospitalização) ou pode estar

relacionada às alterações fisiológicas como cegueira, impotência e perda cognitiva decorrente do diabetes (Wredling et. al., 1992). Tendo em vista os danos causados pela hiperglicemia, estudos apontam que o sistema nervoso central (SNC) não está livre dos danos oriundos do diabetes sendo a encefalopatia diabética a principal envolvida nessa desordem metabólica (Mijinhout et. al., 2006; para revisão veja: Korczak et al., 2011). Neste sentido, estudos do nosso grupo mostram que há um aumento de estresse oxidativo (EO) em áreas relacionadas com a depressão, como o hipocampo e córtex pré-frontal, o que pode estar relacionado com o comportamento do tipo-depressivo pronunciado em animais diabéticos quando comparados aos animais normoglicêmicos (De Moraes et. al., 2014).

Cabe ressaltar que na fisiopatologia da depressão, além do EO, caracterizado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio ou por redução dos níveis de antioxidantes, outros mecanismos parecem contribuir de forma importante. Dentre estes mecanismos destacam-se o aumento de citocinas pró-inflamatórias (interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), neurodegeneração, apoptose, redução da neurogênese, bem como da plasticidade neuronal. Embora estes mecanismos possam ser ativados independentemente, há um consenso de que haja forte relação entre eles, e que o EO possa ser o ponto de ligação entre eles (Maes et al., 2012).

1.5. TRATAMENTO DA DEPRESSÃO

O tratamento convencional da depressão com medicamentos antidepressivos e terapia cognitivo-comportamental mostra-se eficaz em 60-80% dos pacientes. No entanto, menos de 25% das pessoas afetadas têm acesso a um tratamento eficaz, além disso, a depressão resistente ao tratamento ocorre em até 40% dos pacientes. O uso dos antidepressivos leva a uma gama de efeitos colaterais indesejáveis, tais como sedação, diminuição da pressão sanguínea, aumento de peso, indigestão e disfunção sexual, resultando em baixa adesão dos pacientes, reaparecimento dos sintomas oriundos da depressão bem como aumentando o risco de suicídios nos

pacientes (Keller et al., 2002). Dentre as drogas utilizadas no tratamento da depressão em pacientes diabéticos destaca-se o uso de antidepressivos inibidores da recaptação da serotonina, como fluoxetina, escitalopram e sertralina, os quais são importantes nesse contexto por não interferirem no controle dos níveis de glicose (para revisão veja: Zanoveli et al., 2015).

1.6. RELAÇÃO ENTRE DOR NEUROPÁTICA E DEPRESSÃO ASSOCIADAS AO DIABETES

Estudos reforçam a hipótese de que a dor neuropática e a depressão associadas ao diabetes são decorrentes de inúmeros mecanismos fisiopatológicos comuns como o aumento do EO, processos inflamatórios (Cammeron; Cotter, 2008), processos neuroimunes (Quan et al., 2007) e processos neurodegenerativos (Russel et al., 2002, 1999). Nesse sentido autores sugerem que a dor crônica e a depressão também compartilham uma relação bidirecional visto que pacientes com dor crônica apresentam aumento na incidência de depressão quando comparado a população não-diabética (Sullivan et al., 1992), em contrapartida as chances de desenvolver dor crônica são aumentadas em pacientes com depressão (Von Korff; Simon, 1996). Nesse contexto os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI N3) parecem ser um promissor adjuvante no tratamento da dor neuropática e depressão associadas ao diabetes, visto que os AGPI N3 já apresentam efeitos benéficos na dor (Kremer, 2000; para revisão veja: De Caterina et. al., 2007) e depressão (Ferraz et al., 2011; Carabelli et al., 2014) em animais normoglicêmicos.

1.7. ÁCIDO GRAXO POLI-INSATURADO ÔMEGA 3

Os ácidos graxos são moléculas orgânicas formadas por cadeias de hidrocarbonetos que possuem um radical metil (-CHO) em uma extremidade e um

radical carboxil (-COOH) na extremidade oposta (CURI, 2002). Dividem-se em saturados e insaturados, sendo que os últimos podem ser mono ou poli-insaturados (para revisão veja: De Caterina et. al., 2007; Curi, 2002), ou seja, podem apresentar ou não dupla-ligações entre os átomos de carbono em suas cadeias alifáticas (Curi, 2002). Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI-n3) são aqueles que possuem a primeira insaturação na terceira posição a partir da extremidade metil (Drevon et al., 1993; Curi, 2002; Ko et. al., 2010). Os mesmos derivam do ácido α -linolênico (α -LNA), sendo os ácidos linolênico (C18:3), eicosapentaenóico (EPA; C20:5) e o docosahexaenóico (DHA; C22:6), os representantes mais importantes (para revisão veja: De Caterina et. al., 2007) sendo considerados nutrientes essenciais, uma vez que provêm exclusivamente da dieta. Esses mediadores possuem diversas atividades biológicas, tais como regulação da atividade plaquetária, são componentes essenciais das membranas biológicas, participam da comunicação celular e imunorreações, são importantes no desenvolvimento do sistema nervoso central durante a embriogênese e infância bem como no funcionamento ideal do mesmo (para revisão veja: De Caterina et. al., 2007; Curi, 2002). Assim, dietas pobres em ácidos graxos podem acarretar várias complicações relacionadas com a atividade neuronal, motora e visual (para revisão veja: De Caterina et. al., 2007).

Os AGPI-n3 podem ser gerados principalmente pela ação da fosfolipase-A2, e posteriormente metabolizados por ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases (LOX) em seus produtos de comunicação celular (eicosanoides anti-inflamatórios). A ingestão de óleo de peixe, rico em AGPI-n3, altera a fluidez da membrana graças à incorporação de DHA e EPA nos fosfolípidos de membrana, diminuindo a proporção de ácido araquidônico (AA) nela, levando a produção dos eicosanoides originários do EPA e DHA (para revisão veja: De Caterina et. al., 2007). Essa mudança também altera a atividade de proteínas inseridas na bicamada lipídica, além das interações hidrofóbicas locais. A sinalização intracelular também pode ser alterada pela ingestão de AGPI-n3, por meio da modulação da fluidez e composição de trechos específicos da membrana onde ocorre uma combinação de proteínas com glicoesfingolipídios, denominado "lipid rafts", e/ou por produção de segundos mensageiros (Lima et al. 2007). Ademais, estudos demonstram que a deficiência de

AGPI n3 altera a distribuição de esfingolípídios nas membranas celulares, os quais participam de forma importante da constituição da estrutura dos neurônios e da bainha de mielina. Portanto, em caso de deficiência de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) a estrutura da bainha de mielina pode ser comprometida (Curi et al., 2002).

Desta forma, ao integrar maior quantidade de AGPI-n3 na dieta, principalmente EPA e DHA, podem ocorrer mudanças na composição de membrana, a qual tem uma parte de seus fosfolípidos ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 (AGPI n6) parcialmente substituídos por AGPI-n3. Isto implica em mudanças no metabolismo dos derivados destes ácidos, como a redução da produção de leucotrienos e tromboxanos. Os AGPI-n3 também reduzem a pressão sanguínea e a reatividade de plaquetas e leucócitos, diminuem níveis de triglicérides plasmáticos e reduzem a aterogênese e trombose (para revisão veja: De Caterina et al., 2007), eventos comumente relatados em patologias associadas ao diabetes.

Ademais os mesmos têm sido amplamente descritos como neuroprotetores (Delattre et al., 2010), utilizados como adjuvantes no tratamento de transtornos de humor (Nemets et al., 2002; Stoll et al., 1999), possivelmente por apresentar benefícios a saúde mental (da Silva et al., 2008; Borsonelo; Galduroz, 2008) relacionados ao aumento da regulação do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) (Venna et al., 2009). No diabetes experimental, ratos tratados com óleo de peixe apresentaram melhora da velocidade de condução nervosa e de parâmetros histológicos característicos de degeneração, tais como desmielinização e degeneração axonal (Arnold; Kwai; Krishnan, 2013; Said, 2007; Gerbi et al., 1999). Muitas dessas propriedades neuroprotetoras tem sido associada a capacidade dos AGPI-n3 em atenuar os efeitos causados pelo EO (Hashimoto et al., 2002) além do aumento da regulação do BDNF (Venna et al., 2009).

Estudos clínicos e experimentais têm relatado que o aumento da ingestão de AGPI-n3 está associado com a redução da dor de artrite reumatóide (Kremer, 2000), dismenorréia (Deutch et al., 2000) e lesão músculo-esquelética (Joeriksen et al., 1996). Estudos recentes sugerem um possível mecanismo de ação dos AGPI-n3 modulando os níveis de BDNF (para revisão veja: Khan; Smith, 2015), onde os

mesmos revisam extensivamente a existência de um tipo especial de receptor acoplado a proteína G-40 (GPR40), também chamado de receptor para ácidos graxos livres-1 (FFAR1), os quais após a ligação dos AGPI ativam cascatas intracelulares culminando na ativação de elementos de ligação a proteínas responsivas ao AMPc levando ao aumento da transcrição do gene para BDNF, vale ressaltar que o GPR40 é altamente expresso no cérebro humano, em regiões como hipocampo e córtex cerebral (Nakamoto et al., 2011).

O BDNF é uma proteína básica de 12,4 kDa que desempenha um papel importante na neurogenese e no desenvolvimento e sobrevivência dos circuitos neuronais (Hellard et al., 2004; Lee et al., 2012), sendo proposto que a redução do BDNF em certas áreas do cérebro é um marcador biológico para a depressão (Duman; Heninger; Nestler, 1997). É importante salientar que, em relação a modulação da dor, o papel do BDNF na dor inflamatória parece ser claro, enquanto a correlação entre o BDNF e dor neuropática ainda é desconhecida (Merighi et al., 2008), possivelmente devido à multiplicidade de etiologias de dor neuropática. Autores divergem quanto a relação do BDNF com a dor neuropática diabética, visto que estes observaram que altas concentrações de BDNF parecem ter um efeito antinociceptivo predominante (Groth; Aanonsen, 2002; Guo et al., 2006), outros propuseram que doses baixas de BDNF podem suprimir a alodinia mecânica e as doses elevadas têm o efeito oposto (Miki et al., 2000; Lee-Klubi; Calcutt, 2014).

Embora haja muitos estudos relatando melhoras em diferentes parâmetros patofisiológicos característicos do diabetes após a suplementação com AGPI-n3, pouco se têm investigado acerca do efeito dos mesmos sobre a dor neuropática e a depressão associadas ao diabetes, o qual é merecedor de maior enfoque e estudos.

2) OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar o possível efeito do óleo de peixe na alodinia mecânica e no comportamento tipo-depressivo em animais com diabetes experimentalmente induzido por estreptozotocina.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o decurso temporal do estabelecimento da alodinia mecânica em animais diabéticos;
- Avaliar o comportamento do tipo-depressivo em animais diabéticos;
- Avaliar o possível efeito antinociceptivo e tipo-antidepressivo do Óleo de peixe em animais diabéticos;
- Avaliar os níveis de BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal de animais diabéticos, tratados ou não com óleo de peixe.

3) ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes

Daiany D. B. Redivo^a, Anne K. Schreiber^a, Eliana R. Adami^a, Deidiane E. Ribeiro^b, Samia R. L. Joca^b, Janaína M. Zanoveli^a, Joice M. Cunha^{a*}

^a Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 81540-990, Brazil and ^b Department of Pharmacology, College of Pharmaceutical Sciences, State University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14040-903, Brazil.

3.1 Introduction

Diabetes is a chronic clinical condition [1] that, according to *International Diabetes Federation*, affects importantly about 387 million people worldwide, a number expected to rise to about 590 million people in 2035 [2]. Among the diabetic complications, the diabetic sensorimotor polyneuropathy is the most common clinical

form of diabetic neuropathy, affecting around 90% of patients with diabetes [3,4]. Depending on diagnostic criteria, about 10% to 46% of the patients with diabetic neuropathy develop neuropathic pain along the disease [5,6]. Additionally, it has been described that diabetic patients have 15 to 20% higher chances to develop depression when compared to the general population [7,8].

Studies suggest also a bidirectional relationship among diabetes and depression, being the major depression the most prevalent mood disorder in diabetics [9,10]. On the other hand, patients with installed depressive symptoms present an increased in fasting blood glucose levels [11] and an increased risk of develop diabetes [12]. There is also a bidirectional correlation between chronic pain and depression, since patients with chronic pain have higher incidence of depression when compared with general population [13]. Similarly, the chances to develop chronic pain is higher in the presence of depressive symptoms [14].

The search for alternative therapies for the treatment of neuropathic pain [15] and depression associated with diabetes is required, since the conventional therapies present low adhesion [16], responsiveness [4] and may also alter blood glucose levels [17,18]. In this way, omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3-PUFA), as linolenic acid (LNA), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), have been suggested as adjuvant therapy of depression [19–21] and pain [22–24] and also for mood disorders [25,26], among others [for review see: 27]. Regarding the possible mechanism of action of ω -3-PUFA, especially in regard to its antidepressant-like effect, it has been associated with a hippocampal brain derived neurotrophic factor (BDNF) up-regulation [28,29] and also with other biological functions [for review see: 30].

Although the antinociceptive and the antidepressant effects of ω -3-PUFA have already been observed previously, to our knowledge the effectiveness of this treatment in depressive-like behaviors or in the neuropathic pain associated with diabetes has not been tested yet, which was the main goal of this study. More specifically, our aim was to investigate the effect of fish oil, a natural source of EPA and DHA, over the mechanical allodynia and depressive-like behaviors in a rat model of diabetes induced by streptozotocin (STZ), exploring whether alterations in BDNF levels may be implicated in its mechanism of action.

3.2 Material and Methods

3.2.1. Animals

Experiments were conducted in male Wistar rats (weighing 160-170 g, with approximately 42 days of age), provided by Federal University of Paraná colony. The animals were maintained in the vivarium of Department of Pharmacology, under controlled conditions of temperature and light/dark cycle of 12 hours, with free access to food and water. The animals were divided into 3 three experimental groups of 6 to 9 rats each (Normoglycemic vehicle (saline), Diabetic treated with vehicle (saline) and Diabetic treated with fish oil). Diabetic animals were kept in small numbers per cage, with shavings changed daily. All experiments were conducted in accordance with the rules and laws contained by the Ethics Committee for Research on Animals UFPR (CEUA/BIO-UFPR; #790). All efforts were made to minimize the number of rats and their suffering.

3.2.2. Drugs

The following drugs were used: fish oil (FO, kindly donate by Laboratório Herbarium Botânico S/A, Colombo, Parana, Brazil) composed of 12% EPA and 18% DHA, and streptozotocin (STZ, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA). The fish oil was administered orally (p.o.) at doses of 0.5, 1 or 3 g/Kg during 8 weeks. Streptozotocin was dissolved in citrate buffer (10 mM, pH 4.5) and administered intraperitoneally (i.p.) at a dose of 60 mg/Kg. The doses, routes and treatment schedules were established based on previous studies from our group [31,32] or other studies [33,34].

3.2.3. Diabetes induction

Type 1 diabetes was induced experimentally by a single intraperitoneal injection of 60 mg/Kg of streptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich) dissolved in citrate buffer (10 mM, pH 4.5), i.p, in rats previously fasted for 12 hours. Normoglycemic group, a control group run in parallel, received only citrate buffer (10 mM, pH 4.5, equivalent volume). Diabetes was confirmed three days after the injection of STZ

using samples of about 5 μ L of blood from the tail vein added to test strips impregnated with glucose oxidase (Accu-Check Active™, Roche). The animal was considered diabetic and kept in the study when glucose was equal or greater than 250 mg/dL. Body weight was determined weekly.

3.2.4. Mechanical allodynia measurement (electronic Von Frey test)

The mechanical allodynia was assessed using an electronic Von Frey (electronic anesthesiometer, IITC Life Science, CA, USA), as earlier described by [35]. Briefly, the device presents a disposable polypropylene tip (0.5 mm in diameter), fixed in a force transducer connected to a digital display, where is possible to verify the force (g) applied in the medial surface of animal hind paws. Plexiglass boxes placed in a wire mesh floor (thickness of 5 mm²) were used to acclimate rats during 15 min, or time enough to cease exploratory behaviors. Through the mesh spaces was applied linearly growing force until the occurrence of a withdrawal response and "shake/ licking" of the stimulated paw. The mechanical threshold of a single paw were calculated by the average value of three similar withdrawal responses while the average mechanical threshold of an animal were calculated as the average mechanical threshold of both hind paws. The presence of mechanical allodynia was obtained by the difference among average mechanical threshold observed prior to administration of STZ (baseline or zero time) in comparison of different time points after induction of diabetes or after fish oil administration.

3.2.5. Modified forced swimming test

In this procedure originally described by [36] and modified by [37], the animals were placed individually in plastic swimming cylinders (20 cm diameter x 50 cm containing 30 cm of water at a temperature of 24 \pm 1°C) for 15 minutes (pre-test). Twenty-four hours after the pre-test, the animals were submitted to a session of 5-minute forced swim (test session) which was recorded for subsequent evaluation of the frequency of immobility (except small movements needed to float), swimming and climbing every 5 seconds. This behavioral despair test characterize the depressive-like behavior as a reduction in the frequency responses of active

(swimming and climbing) and an increase in the frequency response of passive (immobile). Between an animal and another, clean water was restored after the cylinder be cleaned properly. After each session (pre-test and test), the animals were removed and subjected to drying with clean and dry cloths in a separate box before returning to their home cages.

3.2.6. Open field test

In order to assess the locomotor activity induced by the different treatments, the open field test was performed as describe to [38] in all groups. For this, the animals were placed in a rectangular arena and their behavior was filmed for later counting of the number of crossing exerted during 5 minutes, considered a measure of the locomotor activity. Then the animals returned to their cages and the apparatus was cleaned with alcohol 20% prior to testing in other animal. The data obtained after different treatments were compared with the respective controls (NGL or DBT treated with vehicle only).

3.2.7. Tissue collection and sample preparation to BDNF analyses

Animals on fourth week after experimental diabetes were euthanized and pre-frontal cortex and hippocampus was dissected on ice and immediately stored at -80°C. Seven days after, the samples was mechanically homogenized in microcentrifuge tubes in lysis buffer (20 mM tris HCl, 137 mM NaCl, 10% glycerol and 0.05 mM Na₃Vo₄) containing a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich, P2714, USA). Following homogenization, samples was centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes at 4°C. The supernatant was collected and stored at -80°C until use.

3.2.8. Quantification of BDNF levels

Quantitation of BDNF protein was performed by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) using a specific kit (Pro mega BDNF Emass Immunoassay System, G7610) containing 96 wells, following the manufacturer's instructions. Briefly, wells were coated with primary monoclonal antibody to BDNF overnight at 4°C. After blocking with a BSA solution the samples were added, followed by the secondary polyclonal antibody. After incubation with tertiary antibody conjugated to

HRP, colorimetric detection of peroxidase activity was obtained by addition of tetramethylbenzidine (TMB One). The enzymatic reaction was stopped with 1M hydrochloric acid and intensity of staining in each well was measured at 450 nm using a plate reader. A standard curve was generated using the values of the dilution series of a standard recombinant human BDNF and was used for determining the BDNF concentrations in the samples. The value in each sample was normalized by the total protein content which was determined by the Bradford method [39].

3.2.9. Experimental protocol

The experimental procedures are summarized in figure 1. Briefly, the animals were kept for two days in the laboratory vivarium for acclimation before starting the experimental proceedings. The treatment (vehicle or fish oil - 0.5, 1 or 3 g/Kg, p.o) started four weeks before the diabetes induction, and were maintained for additional four weeks after STZ administration, totaling 8 weeks of treatment. When pertinent, daily treatment with fish oil was performed after the behavioral tests to rule out the possibility of additional effects caused by acute treatment. The mechanical allodynia and body weight were evaluated weekly. The depressive-like behaviors and the locomotor performance in the open field test, in turn, were evaluated on the second and again in the fourth week after experimental diabetes induction by STZ administration. Blood glucose levels was evaluated after the Von Frey basal measurements (0 day), 3 days after STZ injection (to confirm the diabetes induction) and again before the animal euthanasia (to confirm the maintenance of diabetes and to study the effect of chronic treatment with fish oil in glucose levels).

3.2.10. Statistical Analysis

All data are represented as mean \pm standard error of mean (SEM) for 5-9 animals/group. One or two-way analysis of variance (ANOVA) with or without repeated measures was executed. When appropriated, the *post-hoc* analysis by Bonferroni or Newman-Keuls test was performed. The independent factors used were the experimental groups and/or time. The level of significance was set as $p < 0.05$. All the tests were carried out using the GraphPad Prism program (version 5, San Diego, CA, USA).

3.3 RESULTS

3.3.1. Effect of the treatment with fish oil on the mechanical allodynia in STZ-diabetic animals

As shown in the Figure 2 (panel A), two-way ANOVA with repeated measures showed effects on experimental groups [$F(4,128)=46.64$; $p<0.05$] and time (weeks) [$F(4,128)=31.74$; $p<0.05$] factors, besides an interaction between these two factors [$F(16,128)=31.36$; $p<0.05$]. *Post-hoc* of Bonferroni showed that, when compared to normoglycemic group, control diabetic animals (vehicle-treated) presented a significant decrease in mechanical threshold on second, third and fourth week after diabetes induction ($p<0.05$). Moreover, the treatment with FO (at all tested doses) was able to induce a significant antinociceptive effect in STZ-diabetic rats. More specifically, a significant antinociceptive effect was observed only in the fourth week for the dose of 0.5 g/Kg ($p<0.05$) and in the second, third and fourth week after the treatment with the dosis of 1 or 3 g/Kg; $p<0.05$).

The figure 2 (panel B) shows the area under curve (AUC) values for each group from one to four week after STZ injection. One-way ANOVA showed effect of the experimental groups [$F(4,36)=37.65$; $p<0.05$] factor. The *post-hoc* test of Newman-Keuls showed that diabetic animals treated with vehicle presented a significant reduction in the AUC when compared with normoglycemic treated with vehicle ($p<0.05$). All doses of FO were able to increase the AUC when compared to control diabetic group ($p<0.05$).

3.3.2. Effect of the treatment with fish oil on the blood glucose and body mass in STZ-diabetic animals

Control diabetic animals (treated with vehicle) presented an increase on blood glucose levels and a decrease on the body mass when compared to normoglycemic animals. The treatment with FO (at all tested doses) did not cause a significant changes on blood glucose (Table 1) levels neither on body mass gain (Table 2) in STZ-DBT rats when compared to DBT animals treated with VEH ($p>0.05$).

3.3.3. Effect of the treatment with fish oil on the depressive-like behaviors in STZ-diabetic animals

The figure 3 shows the effects of the FO treatment on frequency of active (swimming and climbing, panels B and C, respectively) and passive (immobility, panel A) responses in STZ-diabetic animals evaluated in the MFST.

Regarding to frequency of immobility (figure 3, panel A), two-way ANOVA showed effect on experimental groups [$F(4,31)=51.65$; $p<0.05$] and time (weeks) [$F(1,31)=11.33$; $p<0.05$] factors, besides interaction between these two factors [$F(4,31)=7.65$; $p<0.05$]. The Bonferroni test showed that the control diabetic animals (treated with vehicle) exhibited a significant increase in the immobility frequency when compared to normoglycemic group since the second week after STZ injection, remaining significantly increased at the fourth week ($p<0.05$). A significant decrease in the frequency of immobility was observed only in diabetic animals treated with the highest dose of FO (3 g/Kg; $p<0.05$).

In the analysis of the frequency of swimming (figure 3, panel B), two-way ANOVA showed a significant effect on the experimental groups [$F(4,31)=27.83$; $p<0.05$] factor, but not a significant effect on the factor time (weeks) [$F(1,31)=0.05$; $p>0.05$], neither interaction between the factors [$F(4,31)=1.53$; $p>0.05$]. The *post-hoc* analysis showed a significant difference between control diabetic animals and normoglycemic animals at both time points evaluated (second and fourth week; $p<0.05$). A significant increase in the frequency of swimming was observed only in diabetic animals treated with the highest tested dose of FO (3g/Kg; $p<0.05$).

For the frequency of climbing analysis (figure 3, panel C), two-way ANOVA showed a significant effect on experimental groups [$F(4,31)=19.37$; $p<0.05$] and time (weeks) [$F(1,31)=6.33$; $p<0.05$] factors, but not a significant effect on interaction between the factors [$F(4,31)=1.48$; $p>0.05$]. The Bonferroni *post-hoc* analysis showed a significant difference between control diabetic animals and normoglycemic animals at both second and fourth weeks after STZ ($p<0.05$), but no significant changes in the climbing frequency in diabetic animals treated with any of the tested doses of FO ($p>0.05$).

3.3.4. Effect of the treatment with fish oil on the locomotor activity in STZ-diabetic animals

The table 3 demonstrates the number of crossing of normoglycemic and diabetic rats in the open field test. Two-way ANOVA showed a significant effect on the experimental groups [$F(4,33)= 7.51;p<0.05$] factor, but not a significant effect on the factor time (weeks) [$F(1,33)= 0.09;p>0.05$], neither interaction between the factors [$F(4,33)= 0.06;p>0.05$]. The *post-hoc* of Bonferroni showed a significant difference between control diabetic animals and normoglycemic animals at both time points evaluated (second and fourth week; $p< 0.05$). A significant decrease in the number of crossings was observed in all diabetic animals, vehicle or FO-treated, independently of the tested doses ($p< 0.05$).

3.3.5. Effect of the treatment with fish oil on BDNF levels in hippocampus and in pre frontal cortex of diabetic animals.

Figure 4 shows the BDNF levels on hippocampus (panel A) and prefrontal cortex (panel B) in diabetic and normoglycemic animals. One-way ANOVA analyses showed a relative difference between groups on hippocampus [$F(2,29)= 9.21; p<0.05$] and on prefrontal cortex [$F(2,17)= 8.44; p<0.05$]. The Newman-Keuls *post-hoc* analysis demonstrated that diabetic animals presented a significant decrease of BDNF levels in both hippocampus and pre frontal cortex when compared to normoglycemic group ($p<0.05$), which is significantly prevented by the treatment with the effective dose of FO (3 g/Kg; $p<0.05$).

3.4. DISCUSSION

This study demonstrates that fish oil treatment was able to prevent the mechanical allodynia and the depressive-like behaviors in streptozotocin (STZ)-induced DBT rats. These effects seems to be related to its capacity of increasing the BDNF levels in hippocampus and pre-frontal cortex, important areas to pain modulation and depression.

The treatment with STZ has been extensively used as a model for induction of diabetes in animals. In this way, it is reported that STZ-treated animals exhibit broad metabolic changes, including an increase in plasma levels of glucose and reduction of body mass, as observed in this study. Importantly to this study, beyond these metabolic changes, STZ-treated animals exhibit sensory abnormalities described as neuropathic pain [31,40,41] and depressive-like behaviors [32,42]. In the present study, DBT rats presented a decrease of mechanical threshold, configuring mechanical allodynia and, concomitantly, an increase in the frequency of passive (immobility) and decrease in the frequency of active (swimming and climbing) behaviors during the modified forced swimming test.

Regarding locomotor activity, our results showed that at both time points (2nd and 4th week after STZ injection) DBT animals showed a reduction in the number of crossings in the open field test. Previous studies have already observed that on the second week after the STZ treatment, DBT rats presented a decrease in the locomotor activity [43]. However, in later time points (3 to 6 weeks), some studies also show that DBT rats have a reduction of the performance in the open field [44–46]. Interestingly, the reduction of number of crossing in DBT animals has been associated to a decrease of dopamine in the substantia nigra *pars compacta*, leading a failure in voluntary motor control [46]. The fish oil treatment did not alter the number of crossing in the open field test exhibited by DBT rats, suggesting that both antinociceptive and antidepressant-like effect of this treatment is not associated to any locomotor effect.

Regarding to the mechanical allodynia, our data corroborate previous studies showing that nociceptive responses have already been distinguished two weeks after diabetes induction, peaking at 4th week [31,40]. Considering the depressive-like behaviors, previous studies from our research group [32] and others [47,48] have already observed an increase of the immobility time during the forced swim test in DBT rats. However, studies are contradictory regarding the time after injection of STZ necessary for the development of depressive-like behaviors, i.e. while some authors point out the third week as the limit [49], others observed changes in these behaviors only at 4th week after STZ [32,47,48]. This apparently incongruity may be explained by the fact that in the present study, instead of the evaluation of time spent

in immobility during the FST, we quantified the frequency of depressive-like behaviors as proposed by [50]. These authors and others [37,51] validated this modified forced swim test (MFST) as an interesting test to establish correlations between behaviors and neurotransmitter systems. Thus, it was observed that while the immobility behavior is inhibited by nonspecific antidepressant drug treatment, the active behaviors are modulated differently by specific class of antidepressants drugs. For example, it was observed that the swimming behavior is increased by antidepressant drugs that selectively increase serotonin levels and drugs that selectively inhibit the reuptake of noradrenaline cause an increase only on the climbing behavior. Remarkably, a non-selective drug for these neurotransmitters is able to increase both active responses swimming and climbing. Hence and considering such an analogy, we can establish that diabetic animals seem to have a commitment of both neurotransmitters noradrenaline and serotonin. This fact is partially corroborated by a study from our research group [52] showing that the levels of serotonin are reduced in the hippocampus of STZ-DBT rats.

Since the treatment of both neuropathic pain and depression associated to diabetes represent a clinical challenge, the search for alternative pharmacotherapy is urgent. In this way, in the present study it was investigated the potential antinociceptive and antidepressant effects of fish oil, a source of ω -3 polyunsaturated fatty acids (ω 3-PUFA), including linolenic acid (LNA) and mainly, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) [33]. The ω 3-PUFA are considered essential nutrients, since it exclusively comes from the diet [for review see: 33], and has biological activities such as platelet stabilization [53] and are essential for cortical maturation, synaptogenesis and myelination [54].

The treatment with fish oil (at all tested doses) significantly prevented the mechanical allodynia development in DBT rats. The antinociceptive effect of fish oil or DHA/EPA metabolites has already been observed previously in animal models of inflammatory pain [22] and other classical pain models as acetic acid-induced writhing test [23,24], formalin test, hot plate and Hargreaves tests [24] when administered acutely by different routes of administration, such as orally [23], intratecally [22] or systemically [23]. Interestingly, [55] reported that patients with various types of neuropathic pain, subjected to daily treatment with fish oil had

reduction in the clinical score of pain, without significant adverse effects. This antinociceptive effect of fish oil seems not to be related to any improvement of blood glucose levels neither a general health improvement, indirectly measured by body mass evaluation (as observed in table 1 and 2).

Regarding to the antidepressant-like effect, it was observed that the fish oil treatment, only at the highest tested dose (3 g/Kg), induced a significant effect on depressive-like behaviors in DBT rats, i.e. a decrease of immobility and an increase of the swimming frequencies, without changes in the climbing frequency. This antidepressant-like effect of ω 3-PUFA has already been demonstrated previously in NGL rats [33,34,56,57] but in our knowledge, this is the first time in DBT rats. Similarly, as observed regarding the antinociceptive effect of fish oil, this antidepressant-like effect does not seem to be associated with improvement in blood glucose levels or body mass of DBT animals, leading us to explore other possible mechanisms of action. Previous studies have demonstrated that fish oil may induce an increase of serotonin and its metabolite in the hippocampus and pre frontal cortex and also regulate the serotonergic receptors in these brain areas [29]. In this way, a recent study [21] suggested that the antidepressant-like effect of fish oil in NGL rats is associated with an increase in the serotonin levels in addition to an increase in the responsiveness of the 5HT_{1A} receptors, since it was observed that the combination of fish oil with the 5HT_{1A} agonist receptors 8-OH-DPAT potentiated the antidepressant-like effect of fish oil. This fish oil mechanism of action seems plausible even for the DBT rats since as mentioned before, the DBT rats exhibited a reduction of serotonin levels in hippocampus [52] and the fish oil restored the swimming frequency in this experimental group, a behavior associated to serotonin levels (figure 3, panel B).

Therefore, it was also investigated whether the FO treatment can induce a significant change in brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels in hippocampus and pre frontal cortex, brain areas related to depression [29] and also pain modulation [58,59]. The BDNF is a 12.4 KDa basic protein which plays an important role in the neurogenesis and in neuronal circuits development and survival [60–62]. Importantly for this study, it has been proposed that the reduction of BDNF in certain brain areas is a biological marker for depression [63]. It is important to point out that regarding to pain modulation, the role of BDNF in inflammatory pain

seems to be clear, while the correlation between BDNF and neuropathic pain is still unknown [64], possibly due to the multiplicity of neuropathic pain etiologies. Furthermore, neuropathic pain preclinical outcomes, including diabetic neuropathic pain studies, are contradictory, i.e. while authors observed that high concentrations of BDNF seem to have a predominant antinociceptive effect [65,66], others proposed that low doses of BDNF can suppress mechanical allodynia and the high doses have the opposite effect [67,68]. In this way, our study attempted to provide additional data for understanding the role of BDNF in neuropathic pain of diabetic origin.

Interestingly, when compared to NGL group, our results the DBT rats have reduction of BDNF levels in both hippocampus and pre frontal cortex, which is prevented by the fish oil treatment (at effective dose for both mechanical allodynia and depressive-like behaviors). The capacity of fish oil to alter the BDNF levels in these brain areas has already been demonstrated in NGL rats by [29]. A possible mechanism by which ω -3 PUFA can modulate BDNF levels has been extensively reviewed recently by [69]. According to these authors, there is a special type of G-protein coupled receptor 40 (GPR40), also called free fatty acid receptor 1 (FFA1) which after binding to PUFAs, activates intracellular cascades that culminate in cAMP response element-binding protein (CREB) activation with consequent increase of BDNF gene transcription. Curiously, the GPR40 has been described as highly expressed in human brain, including hippocampus and cerebral cortex [23]. Corroborating to our findings, previous studies have already established a direct correlation between ω -3 PUFA consumption and BDNF levels in the serum [70] and in brain [71] while the ω -3 PUFA deprivation in rats has been associated to changes in BDNF expression in frontal cortex [72]. Thus, it is plausible to hypothesize that the both antinociceptive and antidepressant-like effect of fish oil treatment may be associated to the reestablishment of hippocampus and pre frontal cortex levels of BDNF.

Taken together, our data suggested that fish oil may represent a therapeutic alternative to complications and comorbidities associated to diabetes, mainly neuropathic pain and depression, which are among the most debilitating of diabetes and are responsible for severe morbidity. These effects seem to be related to a

reestablishment of control levels of BDNF levels in the hippocampus and prefrontal cortex of these animals.

3.5 Conflict of interest

The authors declare they have no conflicts of interest to disclose.

3.6 Acknowledgements

The authors would like to thank the Laboratório Herbarium Laboratório Botânico S/A for kindly donation of fish oil. This study was also supported by Pronex/Fundação Araucária (Edital 13/2011-UFPR/UEM; Protocol #24861). Daiany D. B. Redivo, Eliana R. Adami and Anne K. Schreiber are recipient of CAPES scholarship.

3.7 REFERENCES

- [1] Iyer S, Tanenberg RJ. Pharmacologic management of diabetic peripheral neuropathic pain. *Expert Opin Pharmacother* 2013;1–11.
- [2] Federation I diabetes. *IDF ATLAS*. 6th ed. 2013.
- [3] Ziegler D. Painful diabetic neuropathy: treatment and future aspects. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24:52–7.
- [4] Tesfaye S, Boulton AJM, Dickenson AH. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. *Diabetes Care* 2013;36:2456–65. doi:10.2337/dc12-1964.
- [5] Ahroni J, Boyko E, Davignon D, Pecoraro R. The health and functional status of veterans with diabetes. *Diabetes Care* 1994;17:318–21.
- [6] Harati Y. Diabetes and the nervous system. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996;25:325–59.

- [7] Lustman PJ, Griffith L., Gavard J., Clouse RE. Depression in adults with diabetes. *Diabetes Care* 1992;15:1631–9.
- [8] Morishita S. Clonazepam as a therapeutic adjunct to improve the management of depression : a brief review 2009:191–8. doi:10.1002/hup.
- [9] Fisher L1, Skaff MM, Mullan JT, Arian P, Glasgow R MU. NIH Public Access. *Diabet Med* 2008;25:1096–101. doi:10.1111/j.1464-5491.2008.02533.x.
- [10] Renn BN, Feliciano L, Segal DL. Clinical Psychology Review The bidirectional relationship of depression and diabetes : A systematic review. *Clin Psychol Rev* 2011;31:1239–46. doi:10.1016/j.cpr.2011.08.001.
- [11] Golden SH, Mezuk B. The association of depressive symptoms with prediabetes versus diagnosed diabetes: is ignorance really bliss? *Physician Sport Med* 2009;37:143–5.
- [12] Golden SH, Lazo M, Carnethon M, Bertoni AG, Schreiner PJ, Diez Roux A V, et al. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. *JAMA* 2008;299:2751–9. doi:10.1016/S1073-5437(09)79168-5.
- [13] Sullivan M, Reesor K, Mikail S, Fisher R. The treatment of depression in chronic low back pain: review and recommendations 1992;50:5–13.
- [14] Von Korff M, Simon G. The relationship between pain and depression. 1996;168:101–8.
- [15] Boyle J, Eriksson M, Gribble L, Gouni R. Impact on pain, polysomnographic sleep, daytime functioning, and quality of life 2012;35:2451–8. doi:10.2337/dc12-0656.
- [16] Lang UE, Borgwardt S. Molecular mechanisms of depression: Perspectives on new treatment strategies. *Cell Physiol Biochem* 2013;31:761–77. doi:10.1159/000350094.
- [17] Gomez R, Huber J. Acute effect of different antidepressants on glycemia in diabetic and non-diabetic rats 2001;34:57–64.
- [18] Lustman PJ, Clouse RE. Depression in diabetic patients The relationship between mood and glycemic control 2005;19:113–22. doi:10.1016/j.jdiacomp.2004.01.002.
- [19] Da Silva T, Munhoz R, Alvarez C, Naliwaiko K, Kiss A, Andreatini R, et al. Depression in Parkinson ' s disease : A double-blind , randomized , placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. *J Affect Disord* 2008;111:351–9. doi:10.1016/j.jad.2008.03.008.

- [20] Delattre AM, Kiss Á, Szawka RE, Anselmo-Franci J a., Bagatini PB, Xavier LL, et al. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 2010;66:256–64. doi:10.1016/j.neures.2009.11.006.
- [21] Carabelli B, Delattre AM, Pudell C, Mori MA, Suchecki D, Machado RB, et al. The Antidepressant-Like Effect of Fish Oil: Possible Role of Ventral Hippocampal 5-HT_{1A} Post-synaptic Receptor. *Mol Neurobiol* 2014. doi:10.1007/s12035-014-8849-8.
- [22] Morisseau C, Inceoglu B, Schmelzer K, Tsai H-J, Jinks SL, Hegedus CM, et al. Naturally occurring monoepoxides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are bioactive antihyperalgesic lipids. *J Lipid Res* 2010;51:3481–90. doi:10.1194/jlr.M006007.
- [23] Nakamoto K, Nishinaka T, Ambo A, Mankura M, Kasuya F, Tokuyama S. Possible involvement of μ -endorphin in docosahexaenoic acid-induced antinociception. *Eur J Pharmacol* 2011;666:100–4. doi:10.1016/j.ejphar.2011.05.047.
- [24] Nobre MEP, Correia AO, Borges MDB, Sampaio TMA, Chakraborty SA, Gonçalves DDO, et al. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid exert anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents at low doses. *Nutr Res* 2013;33:422–33. doi:10.1016/j.nutres.2013.02.011.
- [25] Stoll A, Severus W, Freeman M, Rueter S, Zboyan H, Diamond E, et al. Omega 3 Fatty Acids in Bipolar Disorder A Preliminary Double-blind Trial, Placebo-controlled 2015;56:407–12.
- [26] Nemets B, Stahl Z, Sc M, Belmaker RH. Addition of Omega-3 Fatty Acid to Maintenance Medication Treatment for Recurrent Unipolar Depressive Disorder n.d.:477–9.
- [27] Borsonelo EC, Galduróz JCF. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: Review and propositions. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 2008;78:237–45. doi:10.1016/j.plefa.2008.03.005.
- [28] Venna V, Deplanque D, Allet C, Belarbi K, Hamdane M, Bordet R. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus 2009;i. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.08.025.
- [29] Vines A, Delattre AM, Lima MMS, Rodrigues LS, Suchecki D, MacHado RB, et al. The role of 5-HT_{1A} receptors in fish oil-mediated increased BDNF expression in the rat hippocampus and cortex: A possible antidepressant mechanism. *Neuropharmacology* 2012;62:184–91. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.06.017.

- [30] Caterina R De, Madonna R, Bertolotto A, Schmidt EB. n-3 Fatty Acids in the Treatment of Diabetic Patients. *Biol Ration Clin Data* 2007. doi:10.2337/dc06-1332.R.D.C.
- [31] Schreiber AK, Neufeld M, Jesus CHA, Cunha JM. Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin- diabetic rats. *Neuropharmacology* 2012. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.08.009.
- [32] De Moraes H, de Souza CP, da Silva LM, Ferreira DM, Werner MF, Andreatini R, et al. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behav Brain Res* 2014;258:52–64. doi:10.1016/j.bbr.2013.10.011.
- [33] Ferraz AC, Delattre AM, Almendra RG, Sonagli M, Borges C, Araujo P, et al. Chronic ??-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behav Brain Res* 2011;219:116–22. doi:10.1016/j.bbr.2010.12.028.
- [34] Naliwaiko K, Araújo RLE, da Fonseca R V, Castilho JC, Andreatini R, Bellissimo MI, et al. Effects of fish oil on the central nervous system: a new potential antidepressant? *Nutr Neurosci* 2004;7:91–9. doi:10.1080/10284150410001704525.
- [35] Borghi SM, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro F a., Cardoso RDR, Martins-Pinge MC, Tatakihara RI, et al. Role of TNF- α /TNFR1 in intense acute swimming-induced delayed onset muscle soreness in mice. *Physiol Behav* 2014;128:277–87. doi:10.1016/j.physbeh.2014.01.023.
- [36] Porsolt RD. Animal model of depression. *Biomedicine* 1979;30:139–40.
- [37] Cryan JF, Markou a, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:238–45. doi:10.1016/S0165-6147(02)02017-5.
- [38] Candland DK, BA C. Development of fear in the rat as measured by behavior in the open field. *J Comp Physiol Psychol* 1962;54:593–6.
- [39] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [40] Nones C, Reis R, Jesus C, Veronez D, Cunha J, Chichorro J. Orofacial sensory changes after streptozotocin-induced diabetes in rats. *Brain Res* 2013;1501:56–67. doi:10.1016/j.brainres.2013.01.002.
- [41] Gao F, Zheng ZM. *Animal Models of Diabetic Neuropathic Pain* 2014:100–6.

- [42] Hirano S, Miyata S, Kamei J. Antidepressant-like effect of leptin in streptozotocin-induced diabetic mice 2007;86:27–31. doi:10.1016/j.pbb.2006.12.003.
- [43] Haider S, Ahmed S, Tabassum S. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats 2013:35–41. doi:10.1007/s13760-012-0121-2.
- [44] De Senna PN, Ilha J, Baptista PPA, Do Nascimento PS, Leite MC, Paim MF, et al. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab Brain Dis* 2011;26:269–79. doi:10.1007/s11011-011-9262-x.
- [45] Zangiabadi N, Asadi-Shekaari M, Sheibani V, Jafari M, Shabani M, Asadi AR, et al. Date fruit extract is a neuroprotective agent in diabetic peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats: A multimodal analysis. *Oxid Med Cell Longev* 2011;2011. doi:10.1155/2011/976948.
- [46] Bagatini PB, Xavier LL, Neves LT, Saur L, Barbosa S, Baptista PPA, et al. Resveratrol prevents akinesia and restores neuronal tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta of diabetic rats. *Brain Res* 2014;1592:101–12. doi:10.1016/j.brainres.2014.10.007.
- [47] Gomez R BH. Ethopharmacology of the Antidepressant Effect of Clonazepam in Diabetic Rats 2000;66:329–35.
- [48] Caletti G, Olguins DB, Pedrollo EF, Barros HMT, Gomez R. Antidepressant effect of taurine in diabetic rats. *Amino Acids* 2012;43:1525–33. doi:10.1007/s00726-012-1226-x.
- [49] Wayhs C, Manfredini V, Sitta A, Deon M, Ribas G, Vanzin C, et al. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect 2010;25:297–304. doi:10.1007/s11011-010-9211-0.
- [50] Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;121:66–72. doi:10.1007/BF02245592.
- [51] Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:775–90. doi:10.1038/nrd1825.
- [52] Dias ICS, de Moraes H, Carvalho MC, Cunha TM, Cunha JM, Zanoveli JM. Indoleamine 2,3-dioxygenase/kynurenine pathway as a potential pharmacological target to treat depression associated with diabetes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2015.

- [53] Thies F, Garry JMC, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, et al. Mechanisms of disease Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques : a randomised controlled trial 2003;361:477–85.
- [54] McNamara RK, Carlson SE. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: Potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 2006;75:329–49. doi:10.1016/j.plefa.2006.07.010.
- [55] Ko GD, Nowacki NB, Arseneau L, Eitel M, Hum A. Omega-3 fatty acids for neuropathic pain: case series. *Clin J Pain* 2010;26:168–72.
- [56] Lakhwani L, Tongia SK, Pal VS, Agrawal RP, Nyati P, Phadnis P. Omega-3 fatty acids have antidepressant activity in forced swimming test in Wistar rats. *Acta Pol Pharm* 2007;64:271–6.
- [57] Arbabi L, Baharuldin MTH, Moklas MAM, Fakurazi S, Muhammad SI. Antidepressant-like effects of omega-3 fatty acids in postpartum model of depression in rats. *Behav Brain Res* 2014;271:65–71. doi:10.1016/j.bbr.2014.05.036.
- [58] Covey W, Ignatowski T, Knight P, Spengler R. Brain-derived TNFalpha: involvement in neuroplastic changes implicated in the conscious perception of persistent pain 2000;859:113–22.
- [59] Apkarian a. V, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 2005;9:463–84. doi:10.1016/j.ejpain.2004.11.001.
- [60] Hellard D, Brosenitsch T, Fritsch B, Katz D. Cranial sensory neuron development in the absence of brain-derived neurotrophic factor in BDNF/Bax double null mice. *Dev Biol n.d.*;275:34–43.
- [61] Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 2012;64:238–58. doi:10.1124/pr.111.005108.
- [62] Lee D, Eva G, Anne-christine F, Klaus J, Ralf G, Alexander F, et al. Central nervous system rather than immune cell-derived BDNF mediates axonal protective effects early in autoimmune demyelination 2012:247–58. doi:10.1007/s00401-011-0890-3.
- [63] Duman RS, Heninger G, Nestler E. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54:597–606.

- [64] Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, et al. Progress in Neurobiology BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol* 2008;85:297–317. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.04.004.
- [65] Groth R, Aanonsen L. Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia. *Pain* 2002;100:171–81.
- [66] Guo W, Robbins M, Wei F, Zou S, Dubner R, Ren K. Spinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain facilitation. *J Neurosci* 2006;26:126–37.
- [67] Miki K, Fukuoka T, Tokunaga A, Kondo E. Differential effect of brain-derived neurotrophic factor on high- threshold mechanosensitivity in a rat neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 2001;278:85–8.
- [68] Lee-Kubli C, Calcutt N. Altered rate-dependent depression of the spinal H-reflex as an indicator of spinal disinhibition in models of neuropathic pain. *Pain* 2014;155:250–60.
- [69] Khan N, Smith M. Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology. *Molecules* 2015;20:10657–88.
- [70] Ferreira C, Bernardi J, Bosa V, Schuch I, Goldani M, Kapczinski F, et al. Correlation between n-3 polyunsaturated fatty acids consumption and BDNF peripheral levels in adolescents. *Lipids Heal Dis* 2014;1:13–44.
- [71] Kumar Y, Srinivas G, YM E, Malla L, Rao A. Agonistic approach of omega-3, omega-6 and its metabolites with BDNF: An in-silico study. *Bioinformation* 2013;9:908–11.
- [72] Rao JS, Ertley RN, Lee H, Jr JCD, Arnold JT, Rapoport SI, et al. n-3 Polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Psychiatry* 2007;12:36–46. doi:10.1038/sj.mp.4001888.

3.8 FIGURE LEGENDS

Figure 1. Timeline of experimental protocol. DBT: Diabetes; VF: Electronic Von Frey; MFS: Modified Forced Swimming test; OF: Open Field test; BG: Blood Glucose.

Figure 2. Effect of the treatment with fish oil (FO; 0.5, 1 g/kg or 3 g/kg) on the mechanical threshold in STZ-diabetic rats. Values were expressed with mean \pm SEM of 6-9 animals/ experimental group (panel A) or values of area under curve (AUC, in arbitrary units-AU, panel B) from 1 to 4 weeks after STZ injection. * $p < 0.05$ when compared to normoglycemic (NGL) control group treated with vehicle (VEH). # $p < 0.05$ when compared to diabetic (DBT) control group treated with VEH.

Figure 3. Effect of the treatment with fish oil (FO; 0.5, 1 g/kg or 3 g/kg) on frequency of immobility (panel A), swimming (panel B) or climbing (panel C) in STZ-diabetic rats. Values were expressed with mean \pm SEM of 5-9 animals/experimental group. * $p < 0.05$ when compared to normoglycemic (NGL) control group treated with vehicle (VEH). # $p < 0.05$ when compared to diabetic (DBT) control group treated with VEH.

Figure 4. Effect of the treatment with fish oil (FO; 3 g/kg) on the BDNF levels in hippocampus (panel A) or pre frontal cortex (panel B) of STZ-diabetic rats. Values were expressed with mean \pm SEM of 4-10 animals/ experimental group (panel A). * $p < 0.05$ when compared to normoglycemic (NGL) control group treated with vehicle (VEH). # $p < 0.05$ when compared to diabetic (DBT) control group treated with VEH.

3.9 FIGURES

Figure 1

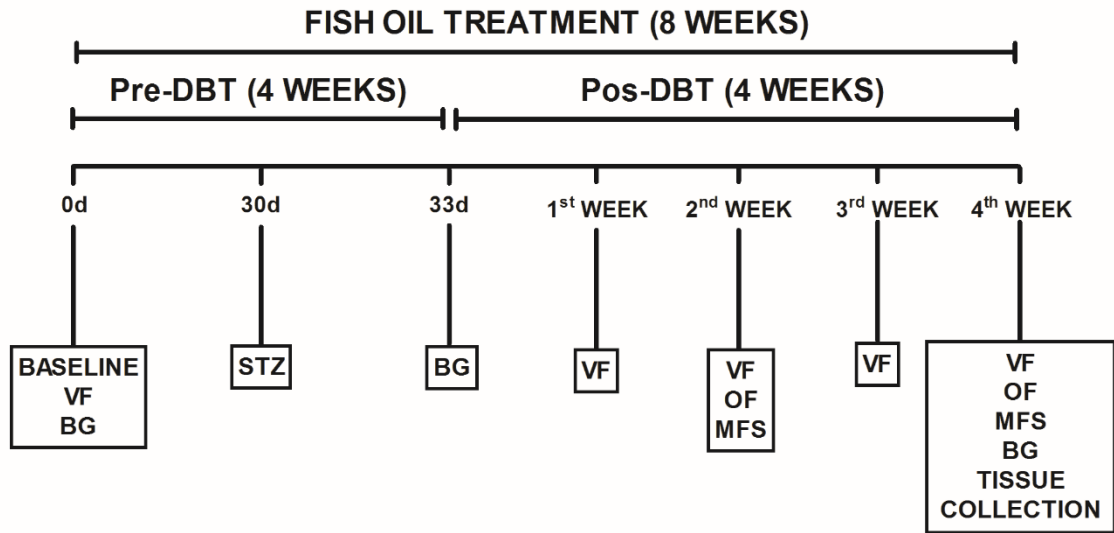


Figure 2

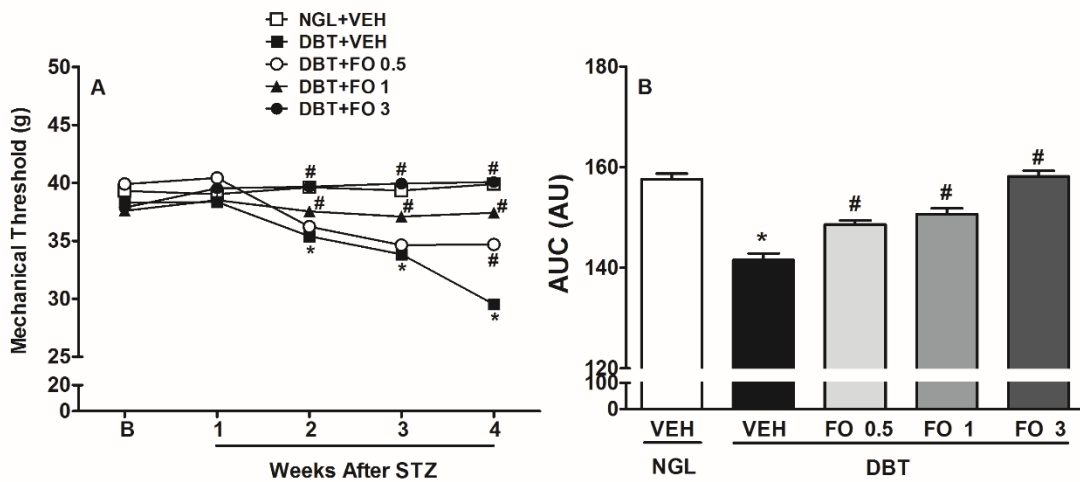


Figure 3

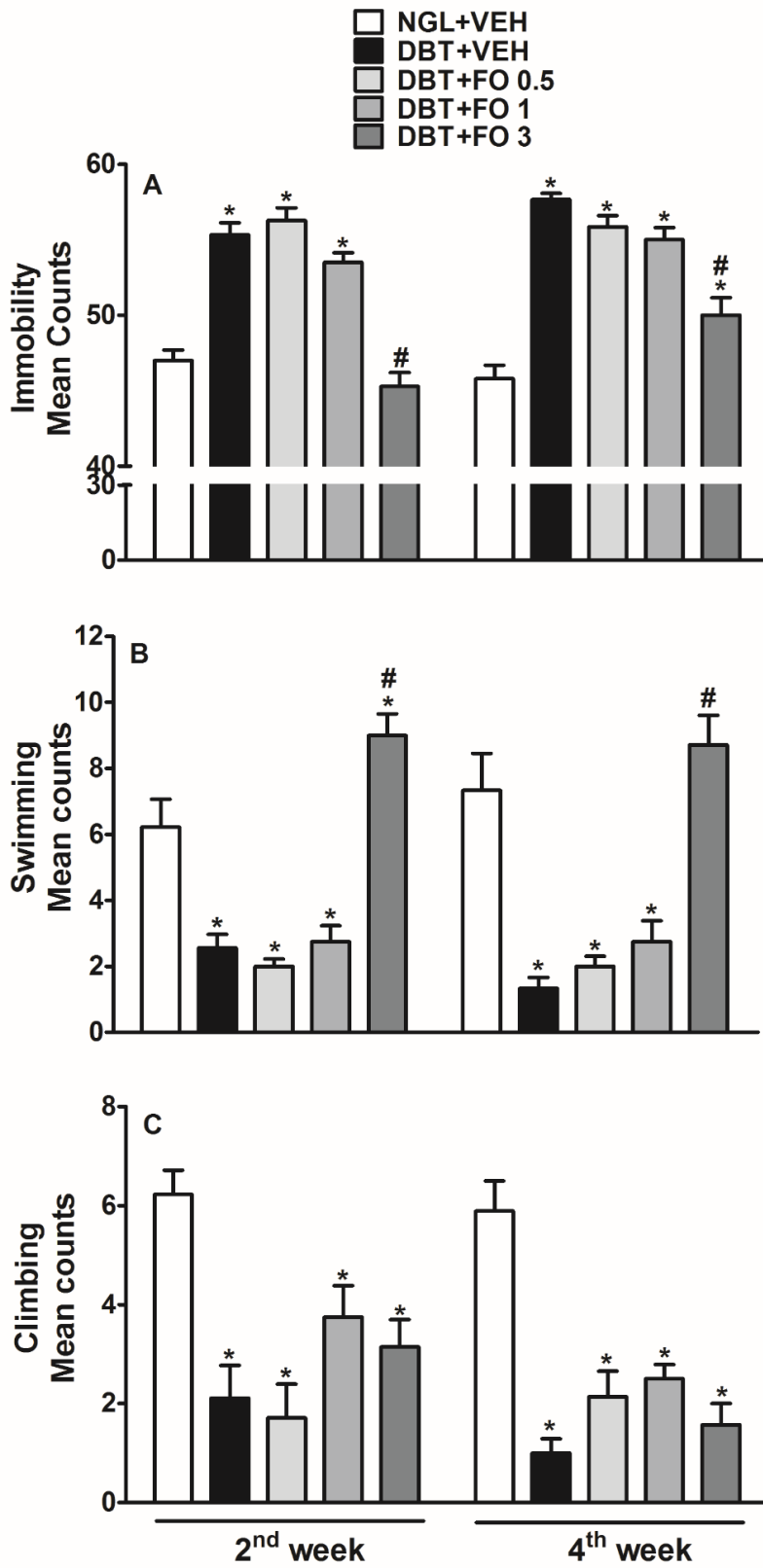
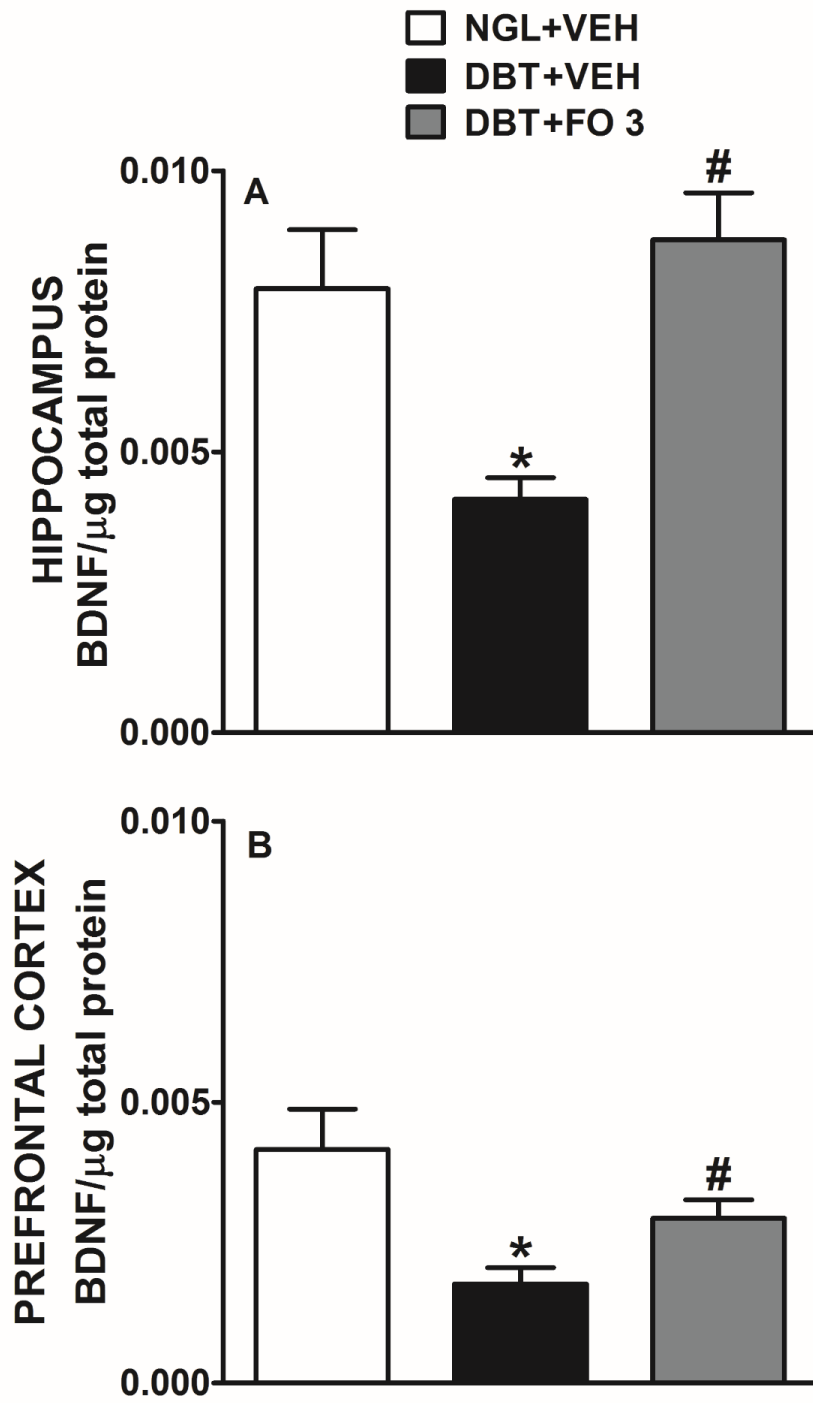


Figure 4



3.10 TABLES

Table 1: Effect of the treatment with fish oil (FO; 0.5, 1 or 3 g/Kg) on blood glucose levels in streptozotocin (STZ)-diabetic (DBT) rats.

Experimental Groups	Blood glucose (mg/dL)		
	Before STZ	3 days after STZ	28 days after STZ
NGL+ VEH	197.7 ± 2.1	200.2 ± 1.6	201.8 ± 1.2
DBT+ VEH	195.4 ± 2.9	557.5 ± 13.6*	550.2 ± 20.2*
DBT + FO (0.5 g/Kg)	196.5 ± 2.9	541.8 ± 19.2*	552.2 ± 11.2*
DBT + FO (1 g/Kg)	201.8 ± 1.3	516.1 ± 26.1*	524.2 ± 29.1*
DBT + FO (3 g/Kg)	202.2 ± 1.1	501.4 ± 30.8*	550.2 ± 28.1*

Values were expressed as mean ± SEM of 5-9 animals/experimental group. *p<0.05 when compared to normoglycemic (NGL) control group treated with vehicle (VEH).

Table 2: Effect of the treatment with fish oil (FO; 0.5, 1 or 3 g/Kg) on body mass (in grams) in streptozotocin (STZ)- diabetic (DBT) rats.

Experimental Groups	Period of Vehicle or Fish oil treatment (weeks)							
	Before STZ treatment				After STZ treatment			
	1 st week	2 nd week	3 rd week	4 th week	5 th week	6 th week	7 th week	8 th week
NGL + VEH	172.6± 2.8	182.5± 2.8	239.2± 3.6	273.1± 5.1	319.5± 6.5	330.8± 7.0	340.1± 7.3	340.2± 5.6
DBT + VEH	172.4± 2.8	186.2 ± 3.4	241.6± 3.0	268.7± 1.0	248.3± 4.4*	243.1± 5.1*	248.8± 5.3*	239.1± 3.9*
DBT + FO (0.5 g/Kg)	171.4± 3.9	191.5± 3.7	231.7± 1.7	273.4± 6.5	251.8± 2.7*	239.4± 7.0*	238.1± 7.0*	232.1± 6.5*
DBT + FO (1 g/Kg)	170.1± 4.4	197.2± 4.8	233.6± 3.4	254.6± 3.5	247.4± 5.6*	249.2± 6.9*	248.2± 7.2*	250.2± 7.2*
DBT+FO (3 g/Kg)	169.4± 3.5	190.5± 3.8	233.2± 2.3	273.1± 2.3	251.4± 3.7*	237.5± 4.2*	238.8± 6.8*	228.4± 6.3*

Values were expressed as mean ± SEM of 5-9 animals/experimental group. *p<0.05 when compared to normoglycemic (NGL) control group treated with vehicle (VEH).

Table 3: Effect of the treatment with fish oil (FO; 0.5, 1 or 3 g/kg) on locomotor activity in streptozotocin (STZ)-diabetic (DBT) rats.

Experimental groups	Number of crossings	
	2 nd Week	4 th Week
NGL+ VEH	50.8 ± 2.3	51.5 ± 4.6
DBT+ VEH	36.1 ± 1.9*	35.5 ± 1.7*
DBT+ FO (0.5 g/kg)	34.7 ± 1.4*	35.2 ± 3.8*
DBT+ FO (1 g/kg)	39.6 ± 0.7*	40.6 ± 2.9
DBT+ FO (3 g/kg)	35.5 ± 2.9*	37.2 ± 2.6*

Values were expressed as mean ± SEM of 5-9 animals/experimental group. *p<0.05 when compared normoglycemic (NGL) control group treated with vehicle (VEH).

3.11 HIGHLIGHTS

- Fish oil prevents the mechanical allodynia in diabetic rats.
- Fish oil exerts an antidepressant-like effect in diabetic rats.
- Fish oil restores the BDNF levels in the hippocampus and cortex of diabetic rats.

4) CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados obtidos em nosso estudo, pode-se concluir que:

Os animais diabéticos apresentaram diminuição do limiar mecânico a partir da 2^o a qual se manteve até a 4^o semana após STZ, bem como apresentaram comportamento do tipo-depressivo na 2^o e 4^o semanas após STZ, concomitantemente, apresentaram diminuição da atividade locomotora e diminuição dos níveis de BDNF.

O tratamento com óleo de peixe foi capaz de prevenir a instalação da alodinia mecânica bem como do comportamento do tipo-depressivo em animais diabéticos,

demonstrando seu efeito antinociceptivo e do tipo-antidepressivo, os quais podem estar relacionados ao reestabelecimento dos níveis de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal.

5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ADICIONAIS

AHRONI, J. H.; BOYKO, E. J.; DAVIGNON, D. R.; PECORARO, R. E. The health and functional status of veterans with diabetes. **Diabetes Care**. v. 17, n. 4, p. 318-21 1994.

ALBERS, J. W.; HERMAN, W. H.; POP-BUSUI, R.; FELDMAN, E. L.; MARTIN, C. L.; CLEARY, P. A.; WABERSKI, B. H.; LACHIN, J. M. Diabetes Control and Complications Trial /Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Effect of prior intensive insulin treatment during the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) on peripheral neuropathy in type 1 diabetes during the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study. **Diabetes Care**. v. 33, n. 5, p. 1090-6, 2010.

ARNOLD, R.; KWAI, N. C. G.; KRISHNAN, A. V. Mechanisms of axonal dysfunction in diabetic and uraemic neuropathies. **Clinical Neurophysiology**. v. 124, n. 11, p. 2079-2090, 2013.

BARANAUSKAS, G.; NISTRÌ, A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 3, p. 349-65, 1998.

BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, M. C. Science of pain. **Elsevier**. 1ª edição, p. 1-13, 2009.

BELMONTE, C.; CERVERO, F. Neurobiology of receptors. **Oxford University Press**. 1ª edição, p. 53, 1996.

BERTELSMANN, F. W.; HEIMANS, J. J.; VAN ROOY, J. C.; DANKMEIJER, H. F.; VISSER, S. L.; VAN DER VEEN, E. A. Peripheral nerve function in patients with painful diabetic neuropathy treated with continuous subcutaneous insulin infusion.

Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry. v. 50, n. 10, p. 1337-1341, 1987.

BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews.** v. 67, n. 1, p. 167-186, 1987.

BILOUS, R.; DONNELLY, R. Handbook of diabetes. **Wiley-Blacwell.** 4ª edição, 2010.

BORSONELO, E. C.; GALDURÓZ, J. C. F. The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: Review and propositions. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.** v. 78, p. 237-45, 2008.

CALCUTT, N.A.; JORGE, M.C.; YAKSH, T.L.; CHAPLAN, S.R. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. **Pain.** v. 68, n. 2-3, p. 293-299, 1996.

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A. Pro-inflammatory mechanisms in diabetic neuropathy: focus on the nuclear factor kappa B pathway. **Current Drug Targets.** v. 9, n. 1, p. 60-67, 2008.

CARABELLI, B.; DELATTRE, A. M.; PUDELL, C.; MORI, M. A.; SUCHECKI, D.; MACHADO, R. B.; VENANCIO, D. P.; PIAZZETTA, S. R.; HAMMERSCHMIDT, I.; ZANATA, S. M.; LIMA, M. M.; ZANOVELI, J. M.; FERRAZ, A. C. The Antidepressant-Like Effect of Fish Oil: Possible Role of Ventral Hippocampal 5-HT(1A) Post-synaptic Receptor. **Molecular Neurobiology.** 2014. *Article in press.*

DE CATERINA, R.; MADONNA, R.; BERTOLOTTO, A.; SCHMIDT, E. R. N3 fatty acids in the treatment of diabetics patients. **Diabetes Care.** v. 30, n. 4, p. 1012 - 1026, 2007.

CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. **Science's STKE** n. 225, 2004.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYAKASA, C. K.; PROCOPIO, J. Entendendo a gordura - Os ácidos graxos. **Manole.** 6ª edição, p. 2-7, 2002.

DELATTRE, A. M.; KISS, A.; SZAWKA, R.; ANSELMOFRANCI, J.; BAGATINI, P. B.; XAVIER, L. L.; RIGON, P.; ACHAVAL, M.; IAGHER, F.; DE DAVID, C.; MARRONI, N.A.P.; FERRAZ, A. C. Evaluation of chronic omega-3 fatty acids supplementation on behavioral and neurochemical alterations in 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Neuroscience Research**. v. 66, p. 256-267, 2010.

DEUTCH, B.; BONEFELD, E.; JORGENSEN, J.C.; HANSEN, J. Menstrual discomfort in Danish women reduced by dietary supplements of omega-3 and B12 (fish oil or sea oil capsules). **Nutritional Research**. v. 20, p. 621-631, 2000.

DSM-V – Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (Tradução Cláudia Dornelles). **APA**. 5ª edição, 2013.

DREVON, C. A.; BAKASAAS, I.; KROKAN H. E. Omega-3 fatty acids: Metabolism and Biological Effects. **Birkhäuser**, p. 1-11, 1993.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. **Archives of General Psychiatry**. v. 54, n. 7, p. 597-606, 1997.

DUMAN, R. S. Depression: a case of neuronal life and death? **Biological Psychiatry**. v. 56, n. 3, p. 140-5, 2004.

FISHER, L.; SKAFF, M. M.; MULLAN, J. T.; AREAN, P.; GLASGOW, R. M. U. A longitudinal study of affective and anxiety disorders, depressive affect and diabetes distress in adults with Type 2 diabetes. **Diabetes Medicine**. v. 25, p. 1096–101, 2008.

GERBI, A.; MAIXENT, J.M.; ANSALDI, J.L.; PIERLOVISI, M.; COSTE, T.; PELISSIER, J. F.; VAGUE, P.; RACCAH, D. Fish oil supplementation prevents diabetes-induced nerve conduction velocity and neuroanatomical changes in rats. **The Journal of Nutrition**. v. 129, p. 207-213, 1999.

GILRON, I.; MAX, M. B. Combination pharmacotherapy for neuropathic pain: current evidence and future directions. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 5, n. 6, p. 823-830, 2005.

GOLDEN, S. H.; LAZO, M.; CARNETHON, M.; BERTONI, A. G.; SCHREINER, P. J.; DIEZ ROUX, A. V.; LEE, H. B.; LYKETSOS, C. Examining a bidirectional association between depressive symptoms and diabetes. **JAMA**. v. 299, p. 2751–9, 2008.

GREEN, R. C.; CUPPLES, L. A.; KURZ, A.; AUERBACH, S.; GO, R.; SADOVNICK, D.; DUARA, R.; KUKULL, W. A.; CHUI, H.; EDEKI, T.; GRIFFITH, P. A.; FRIEDLAND, R. P.; BACHMAN, D.; FARRER, L. Depression as a risk factor for Alzheimer disease: the MIRAGE Study. **Archives of Neurology**. v. 60, n. 5, p. 753-9, 2003.

DE GROOT, M.; ANDERSON, R.; FREEDLAND, K. E.; CLOUSE, R. E.; LUSTMAN, P. J. Association of depression and diabetes complications: a meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**. v. 63, n. 1, p. 619-630, 2001.

GROTH, R.; AANONSEN, L. Spinal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) produces hyperalgesia in normal mice while antisense directed against either BDNF or trkB, prevent inflammation-induced hyperalgesia. **Pain**. v. 100, n. 1-2, p. 171-81, 2002.

GUO, W.; ROBBINS, M. T.; WEI, F.; ZOU, S.; DUBNER, R.; REN, K. Supraspinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain facilitation. **The Journal of Neuroscience**. v. 26, n. 1, p. 126-37, 2006.

HANDWERKER, H. O.; KOBAL, G. Psychophysiology of experimentally induced pain. **Physiological Reviews**. v. 73, n. 3, p. 639-71 1993.

HARATI Y. Diabetes and the nervous system. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**. v. 25, n. 2, p. 325-59, 1996.

HASHIMOTO, M.; HOSSAIN, S.; TANABE, Y.; KAWASHIMA, A.; HARADA, T.; YANO, T.; MIZUGUCHI, K.; SHIDO, O. The protective effect of dietary eicosapentaenoic acid against impairment of spatial cognition learning ability in rats infused with amyloid beta (1– 40). **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 20, p. 965-973, 2008.

HELLARD, D.; BROSENITSCH, T.; FRITZSCH, B.; KATZ, D. M. Cranial sensory neuron development in the absence of brain-derived neurotrophic factor in BDNF/Bax double null mice. **Developmental Biology**. v. 275, n. 1, p. 34-43, 2004.

HENDRICKX, H.; MCEWEN, B. S.; OUDERAA, F. V. Metabolism, mood and cognition in aging: the importance of lifestyle and dietary intervention. **Neurobiology of Aging**. 2005.

HESDORFFER, D. C.; HAUSER, W. A.; ANNEGERS, J. F.; CASCINO, G. Major depression is a risk factor for seizures in older adults. **Annals of Neurology**. v. 47, n. 2, p. 246-9, 2000.

HIMSWORTH, H. Management of diabetes mellitus. **The British Medical Journal**. v. 1, n. 1, p. 188-190, 1936.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, disponível em: <http://www.idf.org/about-diabetes>. Acesso em 23 Jun 2015.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 6th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013.

JENSEN, T. S.; BACKONJA, M. M.; HERNÁNDEZ JIMÉNEZ, S.; 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. 108-119, 2006.

JOERIKSEN, W.; SANDVIK, L.; BRUUSGAARD, D. Does dietary supplementation of cod liver oil mitigate musculoskeletal pain? **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 50, p. 689-693, 1996.

KELLER, M. B.; HIRSCHFELD, R. M.; DEMYTTENAERE, K.; BALDWIN, D. S. Optimizing outcomes in depression: focus on antidepressant compliance. **International Clinical Psychopharmacology**. v. 17, n. 6, p. 265-71, 2002.

KHAN, N.; SMITH, M. Neurotrophins and Neuropathic Pain: Role in Pathobiology. **Molecules**. v. 20, p. 10657–88, 2015.

- KO, G. D.; NOWACKI, N. B.; ARSENEAU L, EITEL M, HUM A. Omega-3 fatty acids for neuropathic pain: case series. **The Clinical Journal of Pain**. v. 26, p. 168–72, 2010.
- KORCZAK, D. J.; PEREIRA, S.; KOULAJIAN, K.; MATEJCEK, A.; GIACCA, A. Type 1 diabetes mellitus and major depressive disorder: evidence for a biological link. **Diabetologia**. v. 54, n. 10, p. 2483-93, 2011.
- KREMER, J.M. N-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 71, p. s349–s351, 2000.
- KULKANTRAKORN, K.; LORSUWANSIRI, C. Sensory profile and its impact on quality of life in patients with painful diabetic polyneuropathy. **Journal of Neuroscience in Rural Practice**. v. 4, n. 3, p. 267-70, 2013.
- LANG, E. U.; BORGWARDT, S. Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 31, n. 1, p. 761-777, 2013.
- LEE, D. H.; GEYER, E.; FLACH, A. C.; JUNG, K.; GOLD, R.; FLÜGEL, A.; LINKER, R. A.; LÜHDER, F. Central nervous system rather than immune cell-derived BDNF mediates axonal protective effects early in autoimmune demyelination. **Acta Neuropathologica**. v. 123, n. 2, p. 247-58, 2012.
- LEE, J. H.; McCARTY, R. Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats. **Physiological Behaviour**. v. 47, n. 2, p. 225-230, 1990.
- LEE, J. H.; McCARTY, R. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. **Pain**. v. 50, n. 2, p. 231-236, 1992.
- LEE-KUBLI, C. A.; CALCUTT, N. A. Altered rate-dependent depression of the spinal H-reflex as an indicator of spinal disinhibition in models of neuropathic pain. **Pain**. v. 155, n. 2, p. 250-60, 2014.
- LIMA, T.; GORJAO, R.; HATANAKA, E.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; SILVA, E. P. P.; PROCOPIO, J.; CURI, R. Mechanisms by which fatty acids regulate leukocyte function. **Clinical Science**. v. 113, p. 65-77, 2007.

MAES, M.; FISAR, Z.; MEDINA, M.; SCAPAGNINI, G.; NOWAK, G.; BERK, M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. **Inflammopharmacology**. v. 20, n. 3, p. 127-150, 2012.

MAX, M. B.; LYNCH, S. A.; MUIR, J.; SHOAF, S. E.; SMOLLER, B.; DUBNER, R. Effects of desipramine, amitriptyline, and fluoxetine on pain in diabetic neuropathy. **The New England Journal of Medicine**. v. 326, n. 19, p. 1250-1256, 1992.

MERIGHI, A.; SALIO, C.; GHIRRI, A.; LOSSI, L.; FERRINI, F.; BETELLI, C.; BARDONI, R. BDNF as a pain modulator. **Progress in Neurobiology**. v. 85, n. 3, p. 297-317, 2008.

MIJNHOUT, G. S.; SCHELTENS, P.; DIAMANT, M.; BIESELS, G. J.; WESSELS, A. M.; SIMSEK, S.; SNOEK, F. J.; HEINE, R. J. Diabetic encephalopathy: A concept in need of a definition. **Diabetologia**. v. 49, n. 6, p. 1447-8, 2006.

MIKI K, FUKUOKA T, TOKUNAGA A, KONDO E, DAI Y, NOGUCHI K. Differential effect of brain-derived neurotrophic factor on high-threshold mechanosensitivity in a rat neuropathic pain model. **Neuroscience Letters**. v. 278, n. 1-2, p. 85-8, 2000.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biological Psychiatry**. v. 65, n. 9, p. 732-41, 2009.

MOLANDER, C.; GRANT, G. Laminar distribution and somatotopic organization of primary afferent fibers from hindlimb nerves in the dorsal horn. A study by transganglionic transport of horseradish peroxidase in the rat. **Neuroscience**. v. 19, n. 1, p. 297-312, 1986.

DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C.P.; DA SILVA, L.M.; FERREIRA, D.M.; WERNER, M.F.; ANDREATINI, R.; DA CUNHA, J.M.; ZANOVELI, J.M. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. **Behavioural Brain Research**, v. 258, n. 1, p. 52-64, 2014.

MORELLO, C.M.; LECKBAND, S.G.; STONER, C.P.; MOORHOUSE, D.F.; SAHAGIAN, G.A. Randomized double-blind study comparing the efficacy of gabapentin with amitriptyline on diabetic peripheral neuropathy pain. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, n. 16, p. 1931-1937, 1999.

NAKAMOTO, K.; NISHINAKA, T.; AMBO, A.; MANKURA, M.; KASUYA, F.; TOKUYAMA, S. Possible involvement of β -endorphin in docosahexaenoic acid-induced antinociception. **European Journal of Pharmacology**. v. 666, p. 100-4, 2011.

NEMETS, B.; STAHL, Z.; BELMAKER, R. H. Addition of Omega-3 Fatty Acid to Maintenance Medication Treatment for Recurrent Unipolar Depressive Disorder. **The American Journal of Psychiatry**. v. 159, n. 3, p. 477-9, 2002.

Ney, J. P.; Devine, E. B.; Watanabe, J. H.; Sullivan, S. D. Comparative efficacy of oral pharmaceuticals for the treatment of chronic peripheral neuropathic pain: meta-analysis and indirect treatment comparisons. **Pain Medicine**. v. 14, n. 5, p. 706-19, 2013.

NOUWEN, A.; LLOYD, C. E.; POWWER, F. Depression and type 2 diabetes over the lifespan: a meta-analysis. Response to Mezuk et al. **Diabetes Care**. v. 32, n. 5, p. e56, 2009.

PELTIER, A.; GOUTMAN, S. A.; CALLAGHAN, B. C. Painful diabetic neuropathy. **BMJ case reports**. v. 348, p. g1799, 2014.

PENNINX, B. W.; GURALNIK, J. M.; PAHOR, M.; FERRUCCI, L.; CERHAN, J. R.; WALLACE, R. B.; HAVLIK, R. J. Chronically depressed mood and cancer risk in older persons. **Journal of National Cancer Institute**. v. 90, n. 24, p. 1888-93, 1998.

POP-BUSUI, R.; LOW, P. A.; WABERSKI, B. H.; MARTIN, C. L.; ALBERS, J. W.; FELDMAN, E. L.; SOMMER, C.; CLEARY, P. A.; LACHIN, J. M.; HERMAN, W. H.; DCCT/EDIC Research Group. Effects of prior intensive insulin therapy on cardiac autonomic nervous system function in type 1 diabetes mellitus: the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study (DCCT/EDIC). **Circulation**. v. 119, n. 22, p. 2886-93, 2009.

QUAN, Y.; DU, J.; WANG, X. High glucose stimulates GRO secretion from rat microglia via ROS, PKC, and NF-KappaB pathways. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 14, p. 3150-3159, 2007.

RENN, B. N.; FELICIANO, L.; SEGAL, D. L. The bidirectional relationship of depression and diabetes : A systematic review. **Clinical Psychology Review**. v. 31, p. 1239–46, 2011.

RUSSELL, J. W.; SULLIVAN, K. A.; WINDEBANK, A. J.; HERMANN, D. N.; FELDMAN, E. L. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. **Neurobiology of Disease**, v. 6, n. 5, p. 347-363, 1999.

RUSSELL, J. W.; GOLOVOY, D.; VINCENT, A. M.; MAHENDRU, P.; OLZMANN, J. A.; MENTZER, A.; FELDMAN, E. L. High glucose induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction of neurons. **Federation of American societies for Experimental Biology Journal**, v. 16, n. 13, p. 1738-1748, 2002.

SAID, G. Diabetic neuropathy-a review. **Nature Clinical Practice. Neurology**, v. 3, n. 6, p. 331-340, 2007.

SCHMIDT, H. D.; SHELTON, R. C.; DUMAN, R. S. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. **Neuropsychopharmacology**. v. 36, n. 12, p. 2375-94, 2011.

SCHREIBER, A. K.; NEUFELD, M.; JESUS, C. H. A.; CUNHA, J. M. Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin- diabetic rats. **Neuropharmacology**. v. 63, p. 1286-97, 2012.

SCHESTATSKY, P.; NASCIMENTO, O. J. What do general neurologists need to know about neuropathic pain? **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v. 67, n. 3^a, p. 741-9, 2009.

DA SILVA, T.; MUNHOZ, R.; ALVAREZ, C.; NALIWAIKO, K.; KISS, A.; ANDREATINI, R.; FERRAZ, A. C. Depression in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study of omega-3 fatty-acid supplementation. **Journal of Affective Disorders**. v. 111, p. 351–9, 2008.

SIMON, G.; ORMEL, J.; VONKORFF, M.; BARLOW, W. Health care costs associated with depressive and anxiety disorders in primary care. **The American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 3, p. 352-357, 1995.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, disponível em: <http://www.diabetes.org.br/diabetes-gestacional>. Acesso em 23 Jun 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR, disponível em: http://www.sbed.org.br/materias.php?cd_secao=65&codant=&friurl=_-5o-Sinal-Vital--_#.VYnbuPIViko. Acesso em 23 Jun 2015.

STOLL, A.; SEVERUS, W.; FREEMAN, M.; RUETER, S.; ZBOYAN, H.; DIAMOND, E.; CRESS, K. K.; MARANGELL, L. B. Omega 3 Fatty Acids in Bipolar Disorder, A Preliminary Double-blind Trial, Placebo-controlled. **Archives of General Psychiatry**. v. 56, p. 407-12, 2015.

SULLIVAN, M.; REESOR, K.; MIKAIL, S.; FISHER, R. The treatment of depression in chronic low back pain: review and recommendations. **Pain**. v. 50, p. 5-13, 1992.

TESFAYE, S.; BOULTON, A. J. M.; DICKENSON, A. H. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. **Diabetes care**. v. 36, n. 9, p. 2456-2465, 2013.

VAN DER KOOY, K.; VAN HOUT, H.; MARWIJK, H.; MARTEN, H.; STEHOUWER, C.; BEEKMAN, A. Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta-analysis. **International Journal of Geriatric Psychiatry**. v. 22, n. 7, p. 613-26, 2007.

VENNA, V.; DEPLANQUE, D.; ALLET, C.; BELARBI, K.; HAMDANE, M.; BORDET, R. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**. v. 34, p. 199-211, 2009.

VON KORFF, M.; SIMON, G. The relationship between pain and depression. **The British Journal of Psychiatry**, Supplement. v. 168, p. 101-8, 1996.

WREDLIING, R. A.; THEORELL, P. G.; ROLL, H. M.; LINS, P. E.; ADAMSON, U. K. Psychosocial state of patients with IDDM prone to recurrent episodes of severe hypoglycemia. **Diabetes care**, v. 15, n. 4, p. 518-521, 1992.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: etiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**. v. 353, n. 9168, p. 1959-64, 1999.

ZANOVELI, J. M.; DE MORAIS, H.; DA SILVA, I. C. S.; SCHREIBER, A. K.; DE SOUZA, C. P.; DA CUNHA, J. M. Depression associated with diabetes: from pathophysiology to treatment. **Currents Diabetes Review**. 2015. *Article in press*.

ZIEGLER, D. Painful diabetic neuropathy: treatment and future aspects. **Diabetes/Metabolism Research and Review**. v. 24, p. 52-7, 2008.