UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS HENRIQUE ALVES JESUS

CANABIDIOL ATENUA A ALODINIA MECÂNICA EM ANIMAIS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA SEROTONÉRGICO

CURITIBA

2018

CARLOS HENRIQUE ALVES JESUS

CANABIDIOL ATENUA A ALODINIA MECÂNICA EM ANIMAIS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA SEROTONÉRGICO

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

Orientadora: Profa. Dra. Joice Maria da Cunha

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Jesus, Carlos Henrique Alves
Canabidiol atenua a alodinia mecânica em animais com diabetes induzido por estreptozotocina através da ativação do sistema serotonérgico. / Carlos Henrique Alves Jesus. – Curitiba, 2018.
105 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Joice Maria da Cunha

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Diabetes 2. Dor 3. Canabidiol 4. Serotonina 5. Neuropatia I. Título II. Cunha, Joice Maria da III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.462

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

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 **CARLOS HENRIQUE ALVES JESUS** intitulada: **CANABIDIOL ATENUA A ALODINIA MECÂNICA EM ANIMAIS COM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA SEROTONÉRGICO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 02 de Fevereiro de 2018.

JOICE MARIA DA CUNHA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

RAFAELA FRANCO CLAUDINO
Avaliador Externo (UFPR)

ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO
Avaliador Interno (UFPR)

Aos amados Moacir, Maria e Laura

Que estejamos sempre juntos em muito mais conquistas como essa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me deixar sempre cercado de pessoas repletas de amor.

À minha amada família; Pai, Mãe e Laura. Nada vale a pena se não tenho o amor de vocês. Obrigado por me apoiar em todas as decisões e loucuras que tento fazer pra alcançar meus sonhos, estar ao lado de vocês é um sonho que eu realizo todos os dias.

Ao Carlos Henrique, não esse que escreve agora, mas aquele que tomou as decisões certas, pra chegar até aqui e passar por muitos obstáculos que a vida traz. Você foi corajoso e esforçado, e aqui fica o lembrete de que enfrentar a vida dessa forma é compensador.

À minha incrível orientadora Professora Joice Cunha, por esses quase 7 anos de companheirismo e trabalho duro, e por me ajudar a crescer não só como profissional, mas também como pessoa.

À madrinha Iracema, minha segunda mãe, obrigado pelos abraços e pelo amor.

À Daiany Redivo, minha irmã de ciência e coração, obrigado por essa colaboração e amizade, você sempre será minha rainha do óleo de peixe.

Às melhores amigas que o mundo poderia colocar no meu caminho, Karine, Jeniffer, Juliana, Hely e Jéssica, obrigado por cada sorriso e cada conversa, espero ser realmente merecedor de todo o apoio e amor que recebo.

Às amigas de “batalha”, Maiara, Camila e Marcela, estamos em sintonia desde o primeiro dia, obrigado por essa amizade tão natural e por me ensinarem que não sou o único cheio de dúvidas sobre meu futuro, vocês me fizeram sorrir mesmo quando a tensão do trabalho me deixava pra baixo, vocês me inspiram todos os dias.

Às amigas Erika, Rafa e Amanda, é ótimo estar cercado de pessoas inteligentes e poder contar com a ajuda preciosa de mulheres como vocês.

Às veteranas de laboratório, Renata, Carina e Anne, vocês também foram inspirações pra eu chegar até aqui.

Aos Brazilian Musketeers, 2014/2015 ficou na memória, e como diz nossa mamãe Jaqueline Volpe, a quem eu tenho todo o amor do mundo, “foi um tempo lindo que não voltará”, mas eu me emociono de saber que cada um de nós está crescendo na vida, é gratificante poder acompanhar a evolução de cada um, mesmo que de longe.

Às alunas de iniciação científica, mas também grandes amigas, Alexia, Bruna e Priscila, a ajuda e amor de vocês foram importantíssimos, espero de alguma forma ter contribuído para formação e experiência de vocês.

À Glaucia Tobaldini, colega do departamento de Fisiologia, que me ajudou imensamente na técnica de injeção intratecal.

À todos os professores do departamento de farmacologia, em especial aos professores Aleksander, Alexandra, Arquimedes, Maria Fernanda, Juliana, Janaína e Paulo, pela contribuição direta durante a minha formação acadêmica desses dois anos.

Aos colaboradores do projeto, Milene, Karina e Professor Crippa, espero que possamos trabalhar juntos mais vezes.

À Laure Rasdall, por me dar a primeira oportunidade como teacher, a experiência tem sido gratificante.

Aos primos Alex e Malu, espero servir de inspiração para a trajetória de vocês, vai ter família Alves na universidade sim!

À todos os amigos do vôlei, vulgo terapia, praticar esse esporte com vocês foi de grande ajuda pra canalizar a tensão do dia a dia.

À Universidade Federal do Paraná, por me fornecer a estrutura física para os estudos e pesquisa;

À CAPES pelo apoio financeiro.

“My body tells me no!

But I won’t quit

‘Cuz I want more, ‘cuz I want more”

My body – Young the Giant

RESUMO

A neuropatia periférica tem sido descrita como uma das complicações mais comuns e debilitantes do diabetes. Os mecanismos envolvidos no estabelecimento de sintomas dolorosos associados a neuropatia diabética ainda não estão completamente entendidos e os tratamentos farmacológicos disponíveis são apenas paliativos e pouco eficientes. O uso de fitocanabinoides em muitas condições patológicas tem sido explorado em pesquisas e o constituinte não psicomimético da *Cannabis,* canabidiol (CBD), tem mostrado resultados promissores em condições dolorosas. Nesse sentido, nós visamos investigar o potencial efeito antinociceptivo agudo e repetido do CBD sobre a alodinia mecânica em ratos com diabetes (DBT) induzido por estreptozotocina, bem como seus mecanismos envolvidos. Foi observado que o tratamento agudo com CBD (nas doses de 0,3 e 3 mg/Kg, por via intraperitoneal, i.p.) 28 dias após a indução do diabetes exerceu um efeito antialodínico significativo quanto comparado ao grupo DBT tratado com veículo, o que nao parece estar associado com alterações na atividade locomotora, já que todas as doses de CBD testadas não alteraram o número de cruzamentos no teste de campo aberto. O efeito antinociceptivo do CBD (3 mg/Kg) não foi alterado pelo pré-tratamento com: antagonistas CB_1 ou CB_2 (AM251 e AM630; respectivamente; ambos na dose de 1 mg/Kg, i.p.), antagonista de receptores de glicina (cloridrato de estricnina; 10 µg/20 µL; intratecal, i.t.) e antagonista não seletivo de receptores de serotonina (maleato de metisergida; 30 µg/20 µL. i.t.). No entanto, esse efeito foi completamente prevenido pelo pré-tratamento com antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY100135 (3 µg/20 µL, i.t.). O tratamento diário com CBD (0,3 ou 3 mg/Kg) durante 14 dias (iniciado 14 dias após a indução do diabetes) induziu uma atenuação persistente da alodinia mecânica em ratos DBT. Comparadas a amostras de animais normoglicêmicos (NGL), amostras do cordão espinhal (L3-L6) de animais DBT apresentaram níveis significativamente mais baixos de serotonina, o que foi prevenido pelo tratamento diário com CBD. Assim, nossos dados sugerem que o CBD pode ser efetivo no tratamento da alodinia mecânica associada com a neuropatia diabética, sem causar déficit locomotor, e esse efeito parece ser potencialmente mediado pela ativação do sistema serotonérgico através de receptores 5-HT_{1A}.

Palavras chave: Diabetes. Dor. Canabinoides. Serotonina. Receptor 5-HT_{1A}.

ABSTRACT

Peripheral neuropathy has been described as one of the most common and debilitating complications of diabetes. The mechanisms behind the establishment of painful symptoms associated with diabetic neuropathy are still not fully understood and the available pharmacological treatments are palliative and poorly efficient. The use of phytocannabinoids in several pathological conditions has been explored in research and the non-psychomimetic cannabis constituent, cannabidiol (CBD), has shown promising results in painful conditions. In this sense, we aimed to investigate the potential acute and repetitive antinociceptive effect of CBD over the mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic (DBT) rats, as well as its involved mechanisms. It was observed that acute treatment with CBD (at doses of 0.3 and 3 mg/Kg, intraperitoneally, i.p.) at 28 days after diabetes induction exerted a significant anti-allodynic effect when compared to the vehicle-treated DBT group, which does not appear to be associated with changes in the locomotor activity since all tested doses of CBD did not change the number of crossings in the open field test. The antinociceptive effect of CBD (3 mg/Kg) was not altered by the pre-treatment with: CB_1 or CB_2 receptor antagonists (AM251 and AM630; respectively; both at doses of 1 mg/Kg, i.p.), glycine receptor antagonist (strychnine hydrochloride; 10 µg/20 µL; intrathecal, i.t.), nor by the non-selective serotonin receptor antagonist (metisergide maleate 30 µg/20 µL. i.t.). However, this effect was completely prevented by the pre-treatment with the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100135 (3 µg/20 µL, i.t.). Daily treatment with CBD (0.3 or 3 mg/Kg) during 14 days (starting at day 14 after diabetes induction) induced a sustained attenuation of the mechanical allodynia in DBT rats. Compared to samples from normoglycemic animals, spinal cord (L3-L6) samples from DBT rats presented significantly lower levels of serotonin, which was prevented by the daily treatment with CBD. Taken together, our data suggest that CBD may be effective in the treatment of mechanical allodynia associated with diabetic neuropathy, without causing locomotor impairment, and this effect seems to be potentially mediated by the serotoninergic system activation through 5-HT_{1A} receptors.

Keywords: diabetes, pain, cannabinoids, serotonin, 5-HT_{1A} receptor

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM CANABIDIOL NA ALODINIA MECÂNICA E ATIVIDADE LOCOMOTORA DE ANIMAIS DIABÉTICOS 35
FIGURA 2 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANTAGONISTAS DE RECEPTORES CANABINOIDES SOBRE O EFEITO ANTIALODÍNICO AGUDO DO CANABIDIOL 37
FIGURA 3 – EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ANTAGONISTA DE RECEPTORES DE GLICINA SOBRE O EFEITO ANTIALODÍNICO DO CANABIDIOL 39
FIGURA 4 – EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTAGONISTA NÃO SELETIVO E SELETIVO DE RECEPTORES DE SEROTONINA SOBRE O EFEITO ANTIALODÍNICO AGUDO DO CANABIDIOL..... 41
FIGURA 5 - EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM CANABIDIOL SOBRE A ALODINIA MECÂNICA EM RATOS DIABÉTICOS..... 43
FIGURA 6 – EFEITO DO TRATAMENTO REPETIDO COM CANABIDIOL SOBRE O CONTEÚDO ESPINHAL DE 5-HT E 5-HIAA EM RATOS DIABÉTICOS..... 45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLICOSE SANGUÍNEA E PESO CORPORAL DE ANIMAIS DIABÉTICOS TRATADOS COM CBD 46

TABELA 2 – DESENVOLVIMENTO DE ALODINIA MECÂNICA, ALTERAÇÕES EM PERFORMANCE LOCOMOTORA E CONTEÚDO ESPINHAL DE 5-HT E 5-HIAA APÓS STZ, E INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS 48

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG - 2-araquidonilglicerol

2-AGE - éter 2-araquidonoil-gliceril

5-HIAA – ácido 5-hidroxindolacético

5-HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina)

AC – adenilato ciclase

AEA – anandamida

AM251 - 1-(2,4-diclorophenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-n-1-piperidinil-1h-pirazol-3-carboxamida

AM630 - [6-iodo-2-methIl-1-[2-(4- morfolinil)etil]-1h-indol-3-yl] (4-metoxifenil) metanona

CBD - canabidiol

CFA - adjuvante completo de freund

CAMP - monofosfato cíclico de adenosina

DBT – diabético(s)

DAG – diacilglicerol

FAAH – amida hidrolase de ácidos graxos

MAGL – monoacilglicerol lipase

MAP - proteína ativada por mitógeno

MTS – maleato de metisergida

NADA - *n*-araquidonoil-dopamina

NE - noradrenalina

PAG – substância cinzenta periaquidutal

PDA – polineuropatia distal simétrica

RVM – bulbo rostroventromedial

STRYCH - estricnina

STZ - estreptozotocina

THC - Δ^9-tetrahidrocanabinol

TRPV1 - receptor de potencial transitório do tipo vaniloide 1

VEI – veículo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 DIABETES 14
1.2 NEUROPATIA, DOR E DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA 15
1.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA 19
1.4 *CANNABIS*, CANNABINOIDES E O SISTEMA ENDOCANABINOIDE 20
1.5 CANABIDIOL 23
1.6 CANABIDIOL NO CONTROLE DA DOR 25
2 OBJETIVOS 27
2.1 OBJETIVO GERAL 27
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS 27
3 MATERIAL E MÉTODOS 28
3.1 ANIMAIS 28
3.2 DROGAS 28
3.3 INDUÇÃO DO DIABETES 29
3.4 TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO 29
3.5 TESTE DE CAMPO ABERTO 30
3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS 30
3.7 DETERMINAÇÃO POR HPLC DO CONTEÚDO DE 5-HT E 5-HIAA NO CORDÃO ESPINHAL 32
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 33
4 RESULTADOS 34
4.1 CBD EXERCE EFEITO ANTIALODÍNICO AGUDO SEM ALTERAR A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS DIABÉTICOS 34
4.2 EFEITO ANTIALODÍNICO AGUDO DO CBD NÃO É DEPENDENTE DA ATIVAÇÃO DIRETA DE RECEPTORES CB1 E CB2 36
4.3 EFEITO ANTIALODÍNICO AGUDO DO CBD NÃO É BLOQUEADO POR UM ANTAGONISTA COMPETITIVO DE RECEPTOR DE GLICINA 38
4.4 EFEITO ANTIALODÍNICO AGUDO DO CBD É DEPENDENTE DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT1A 40
4.5 CBD EXERCE EFEITO ANTIALODÍNICO APÓS TRATAMENTO CONTINUADO . 42

4.6 TRATAMENTO REPETIDO COM CBD AUMENTA DE DORMA SIGNIFICATIVA O CONTEÚDO ESPINHAL DE 5-HT 44
4.7 TRATAMENTO REPETIDO COM CBD NÃO EXERCE ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE GLICOSE E NO PESO CORPORAL DE ANIMAIS DIABÉTICOS 46
5 DISCUSSÃO..... 49
6 CONCLUSÃO..... 58
REFERÊNCIAS 59
APÊNCICE 1 – VERSÃO FINAL DE ARTIGO SUBMETIDO..... 72
ANEXO 1 – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA..... 105

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES

O diabetes afeta cerca de 425 milhões de pessoas no mundo e pelo menos 13 milhões de pessoas no Brasil, segundo a Federação Internacional do Diabetes. Acredita-se que o diabetes represente uma das maiores emergências globais do século 21 e está entre uma das dez principais causas de morte no mundo. A ocorrência do diabetes tem aumentado a cada ano em pessoas com faixa etária entre 20 a 64 anos, faixa que compreende cerca de 73% do total de pacientes, sem distinção entre homens e mulheres. Além da alta prevalência, o diabetes impacta fortemente a economia uma vez que está associado à um alto índice de mortes prematuras em diversos países do mundo. Em termos de custo com tratamentos para essa condição, estima-se que um gasto de cerca de 24 bilhões de dólares por ano seja feito somente no Brasil (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

O *diabetes mellitus* é uma doença crônica caracterizada por altos níveis de glicose no sangue devido a falta de produção do hormônio insulina e/ou a redução da eficácia da insulina produzida. São três os principais tipos de diabetes, o diabetes do tipo 1, é resultado de uma reação autoimune em que o organismo ataca as células beta do pâncreas que são responsáveis pela produção de insulina, acarretando a deficiência relativa ou absoluta de insulina; no diabetes do tipo 2 a hiperglicemia é causada por uma produção inadequada de insulina e/ou uma inabilidade do organismo em responder completamente a insulina que é produzida, um processo chamado resistência à insulina. O terceiro tipo é a hiperglicemia durante a gestação que possui duas subclasses, o diabetes na gravidez, diagnosticado antes do início da gravidez, e o diabetes gestacional, diagnosticado pela primeira vez durante a gravidez (HALEY E RICHARDS, 2014; HOD *et al.*, 2015; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

A hiperglicemia crônica leva a danos vasculares em diversos tecidos como olhos, coração, rins e nervos. Dessa forma, o diabetes está relacionado ao aumento do risco e também desenvolvimento de várias complicações como doença cardiovascular, falha renal, retinopatia e a neuropatia, uma complicação bastante comum em pacientes diabéticos (SCHREIBER *et al.*, 2015).

1.2 NEUROPATIA, DOR E DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

A neuropatia, de forma geral, é classificada como um distúrbio na função ou alteração patológica em nervos periféricos ou centrais. A neuropatia diabética é a complicação crônica mais prevalente em pacientes diabéticos. Embora pacientes diabéticos possam manifestar outras formas de neuropatia, a forma mais comum é a polineuropatia distal simétrica (PDS), que afeta 90% dos pacientes com neuropatia (TESFAYE *et al.*, 2013). Essa forma de neuropatia é definida clinicamente pela presença de sinais e/ou sintomas que estejam envolvidos com disfunção em nervos periféricos, após a exclusão de outras causas.

Pessoas com PDS frequentemente desenvolvem sintomas que são dependentes da duração da neuropatia, e afetam inicialmente os pés e progridem de forma proximal. Esses sintomas são majoritariamente sensoriais e classificados como positivos e negativos. Sintomas positivos, que se manifestam inicialmente, incluem formigamento, dor em queimação ou ainda tipo choque elétrico e facada, dor evocada por estímulos nocivos ou não, ou ainda sensações incomuns como inchaço no pé, frio nas pernas e sensação dos pés em areia. São considerados sintomas negativos a perda sensorial, fraqueza e também dormência nos membros. A PDS também é um fator que contribui para fraturas e quedas em pacientes. Esse tipo de neuropatia tem grandes efeitos negativos na qualidade de vida de pacientes que possuem um maior risco para o desenvolvimento de ulcerações nos pés, neuroartropatia de Charcot, e consequente amputação de membro. Essas complicações tardias são responsáveis por altos custos econômicos da neuropatia e são preditoras de mortalidade (TESFAYE *et al.*, 2013; VINIK, 2016; VOLMER-THOLE E LOBMANN, 2016; POP-BUSUI *et al.*, 2017).

Apesar da diversidade de alterações sensoriais, a dor é um dos principais sintomas que leva os pacientes a procurar serviço médico. A dor é definida pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) como um sensação de caráter desagradável e emocional associada com dano tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos de tal dano. Dentre diferentes tipos de classificação, de acordo com o tempo a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A forma aguda é normalmente repentina resultante de um estímulo externo como um trauma ou mesmo inflamação, e a dor crônica persiste por um tempo mais longo e suas causas podem ser difíceis de determinar, por serem resultado não somente de traumas, mas de uma combinação de elementos psicológicos e mudanças físicas que acontecem durante a progressão de doenças, como o diabetes por exemplo (KWON *et al.*, 2014; POP-BUSUI *et al.*, 2017).

A dor tem sua transmissão iniciada em terminações nervosas na periferia, os nociceptores, que são neurônios pseudounipolares, cujo corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal, e possuem uma ramificação periférica e outra que se direciona ao sistema nervoso central. Essas fibras nervosas podem ser divididas em duas categorias principais: tipo A, que são fibras mielinizadas de médio a grande diâmetro, e tipo C, fibras não mielinizadas de pequeno diâmetro. A transmissão da dor é dividida de acordo com sua velocidade em rápida e lenta. Fibras Aδ são fibras relativamente pequenas (1-6 m) e finamente mielinizadas que detectam e transmitem dor rapidamente (6-30 m/seg.). Fibras C são fibras menores (<1,5 m) e conduzem a dor de forma mais lenta (0,5-2 m/seg.). Fibras Aβ são fibras grandes (6-12m) e mielinizadas que conduzem em alta velocidade (30-70 m/seg.) (BASBAUM *et al.*, 2009; BOURNE *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2014). Uma vez estimuladas após dano tecidual ou estímulo de naturezas diversas, essas fibras transmitem o estímulo até a matéria cinzenta do corno dorsal da medula espinhal. Essa informação de dor ainda ascende para regiões do sistema nervoso como tálamo e o córtex somatossensorial onde a dor ganha aspecto sensorial e discriminativo de intensidade e localização. Do tálamo, partem projeções para áreas como córtex anterior cingulado, pré-frontal e insular, a amígdala e o hipotálamo, onde os

aspectos afetivos e emocionais são adicionados a percepção de dor (BOURNE *et al.*, 2014).

Existe ainda um mecanismo de controle descendente que atua na modulação nociceptiva, e regiões como a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e o bulbo rostroventromedial (RVM) contribuem para essa modulação. Estudos eletrofisiológicos revelaram que o RVM recebe projeções nervosas da PAG que exercem papel importante na facilitação e também na inibição da transmissão nociceptiva a nível espinhal. Além disso, é relatado que esses efeito modulatórios são mediados por neurotransmissores como noradrenalina (NE), dopamina e serotonina (5-HT) (BOURNE *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2014).

Diferentes sistemas de neurotransmissores tem sido implicados na transmissão, processamento e controle da dor. Dentre eles, evidências tem estabelecido que vias descendentes serotonérgicas exercem influência facilitatória (facilitação descendente) ou inibitória (inibição descendente) no processamento espinhal da informação nociceptiva, dependendo dos estados agudo ou crônico da dor (BARDIN, 2011). Estudos primários mostraram a contribuição de vias descendentes serotonérgicas, originadas do núcleo magno da rafe (NRM, localizado na vizinhança do RVM) (MILLAN, 2002), na inibição da dor. Estimulação elétrica ou química, por exemplo, do NRM mostrou exercer a liberação de 5-HT (RIVOT *et al.*, 1982) e induzir analgesia (OLIVERAS *et al.*, 1977). Além disso, uma hiperalgesia consecutiva a lesões em projeções serotonérgicas espinhais já foi reportada (SAITO *et al.*, 1990). No entanto, estudos recentes demonstram que a inflamação crônica lesionando fibras serotonérgicas espinhais (MILLAN *et al.*, 1997; PERTOVAARA *et al.*, 2001) ou neurônios serotonérgicos no RVM aumenta a hiperalgesia térmica (WEI *et al.*, 1999). Em contraste, em modelos de dor neuropática, as lesões em vias descendentes serotonérgicas tem sido reportada em reduzir ou prevenir alodinia e/ou hiperalgesia (PORRECA *et al.*, 2002; SUZUKI *et al.*, 2004; OSSIPOV *et al.*, 2010).

A ativação de receptores 5-HT_{1A} é importante para a inibição da liberação de neurotransmissores e a ativação desses receptores leva a uma abertura de canais de potássio e fechamento da condução de íons cálcio através da inibição da

adenilato ciclase (LANFUMEY E HAMON, 2004). Receptores 5-HT_{1A} podem ser expressos em diferentes áreas do sistema nervoso central e medula. No núcleo da rafe, por exemplo, esses receptores estão localizados na membrana pré-sináptica (autoreceptores), enquanto que receptores pós sinápticos podem ser encontrados em neurônios espinotalâmicos em lâminas superficiais e em interneurônios gabaérgicos no corno dorsal (BARDIN, 2011). Portanto, os efeitos pró-nociceptivos de receptores 5-HT_{1A} parecem ser predominantemente mediados por autoreceptores pré-sinápticos, enquanto os efeitos antinociceptivos parecem envolver a ativação de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos (COLPAERT *et al.*, 2006; BARDIN, 2011). Essas informações conflitantes mostram que vias serotonérgicas participam de forma importante do controle da dor de forma complexa e não só dependente do estado patológico, mas também do tipo de receptor serotonérgico ativado.

A dor neuropática diabética manifesta-se como dor espontânea (i.e. dor na ausência de qualquer estimulação), hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos nocivos) e/ou alodinia (dor em resposta a estímulos normalmente inócuos) (TODOROVIC, 2016). A alodinia se torna debilitante quando estímulos periféricos diários como o toque do tecido da roupa na pele ou o calçar de um sapato passam a ser interpretados como dolorosos. Ambas hiperalgesia e hipoalgesia (perda de sensibilidade) mecânica têm sido reportadas em estudos clínicos envolvendo indivíduos diabéticos, as quais estão correlacionadas ao decurso temporal do diabetes. Em pacientes com PDS recém estabelecida, a hiperalgesia mecânica é característica, enquanto que em pacientes com PDS avançada, a perda de sensibilidade (hipoalgesia) e aumento de percepção vibratória são majoritariamente identificadas. A alodinia também é observada em uma proporção grande de pacientes com diabetes (30 a 47%). Assim, a sensibilidade mecânica é um sinal clínico importante em pacientes com neuropatia, porém pouco se conhece sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no seu estabelecimento e persistência no diabetes (OTTO *et al.*, 2003; OBROSOVA, 2009).

Estudos indicam que a dor neuropática diabética afeta cerca de 1/3 dos pacientes diabéticos e é decorrente de danos ao sistema nervoso periférico ou central. Existem mecanismos consensuais do diabetes que parecem exercer efeito no desenvolvimento das complicações de forma geral, como danos vasculares e alterações metabólicas. Além disso, diversos fatores como alteração na atividade de canais iônicos, sensibilização periférica e central, e redução da inibição feita por vias descendentes parecem também contribuir para o estabelecimento da dor em pacientes com neuropatia diabética (TESFAYE *et al.*, 2013; LEE-KUBLI *et al.*, 2014; GANDHI E SELVARAJAH, 2015).

1.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA

Como a patogênese da neuropatia diabética é multifatorial, o tratamento da dor neuropática diabética inclui drogas pertencentes a diferentes classes. Antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes, fazem parte da primeira linha de tratamento. A segunda linha de tratamento aborda agentes tópicos como adesivos de lidocaína 5%. Embora os analgésicos opioides, atualmente terceira linha de tratamento, sejam comumente indicados para o tratamento da neuropatia periférica dolorosa no diabetes, seu uso crônico está associado a muitos efeitos colaterais como constipação, sedação, dependência e tolerância, e por essa razão deixaram de ser considerados como segunda linha (TESFAYE *et al.*, 2013; FORNASARI, 2017).

Dos antidepressivos duais seletivos, que atuam na inibição da recaptação de 5-HT e NE, a duloxetina é também considerado um fármaco efetivo para o tratamento da dor na neuropatia diabética e de outras formas de neuropatia. Esse fármaco alivia a dor por aumentar a disponibilidade sináptica de 5-HT e NE nas vias descendentes que inibem a transmissão de dor. Os principais efeitos adversos da duloxetina incluem náusea, sonolência, tontura, boca seca, redução de apetite e constipação (KALSO *et al.*, 2013; PERGOLIZZI *et al.*, 2013). O tratamento com antidepressivos tricíclicos oferece alívio da dor que excede minimamente o efeito induzido pelo tratamento placebo, porém é limitado também pelos efeitos colaterais

indesejados, que incluem sonolência, tontura e efeitos cardiovasculares (KALSO *et al.*, 2013).

Dentre os anticonvulsivantes, a gabapentina e a pregabalina, são derivados do GABA, mas sem efeito sobre o sistema gabaérgico. Seu mecanismo de ação inclui ligação as subunidades alfa-2/delta-1 de canais de cálcio dependentes de voltagem, levando a desestabilização do complexo molecular que mantém o canal na superfície da membrana pré-sináptica, promovendo sua internalização e redução das correntes mediadas por esse canal (FORNASARI, 2017). Dessa forma, atuam na redução da ação excitatória mediada por glutamato que é liberado em resposta a entrada de cálcio na célula. Esses gabapentinoides têm sido os tratamentos de escolha, porém mais de 50% dos pacientes desenvolvem efeitos adversos como euforia, tontura, sedação e ganho de peso, que limitam o uso clínico dessa classe (TESFAYE *et al.*, 2013; PELTIER *et al.*, 2014; TODOROVIC, 2016).

Estudos indicam que mesmo após essas abordagens terapêuticas, somente uma parcela pequena de pacientes obtém benefícios associados especificamente às drogas e a maioria dos pacientes não se beneficiam, o que contribui para a dor neuropática diabética representar um desafio na prática clínica (KALSO *et al.*, 2013). A inexistência de drogas com efeito satisfatório para a terapia da dor neuropática diabética pode ser decorrente da complexidade envolvida na fisiopatologia do diabetes. Portanto, torna-se de extrema importância o entendimento dos mecanismos envolvidos nesse processo e a busca por novos e eficazes tratamentos.

1.4 *CANNABIS*, CANABINOIDES E O SISTEMA ENDOCANABINOIDE

Cannabis é a designação de preferência para as plantas *Cannabis sativa*, *Cannabis indica*, e de menos significância a *Cannabis ruderalis*. No Brasil, os nomes comuns a essa planta são maconha e cânhamo, e nos Estados Unidos, *hemp* e *marijuana.* O código dos Estados Unidos define *Cannabis* como todas as partes da planta, que crescem ou não; as sementes da mesma; a resina extraída

de qualquer parte da planta; e todos os componentes, preparação, sal, derivado ou mistura da planta. Esse termo não abrange os talos maduros dessa planta, nem as fibras desses talos, óleo ou bolo feito das sementes, e nenhum outro composto retirado desses talos maduros, além de sementes estéreis da planta que são incapazes de germinar (KINGHORN *et al.*).

A *Cannabis* tem sido usada na medicina desde os tempos antigos. Registros da China antiga (1500-1200 a.C.) mostram o uso da *Cannabis* como analgésico. Na Índia (1000 a.C.) registros mostram o uso de preparações de *Cannabis* como solução analgésica. Na idade moderna, o extrato e medicações baseadas em *Cannabis* foram vendidos por companhias farmacêuticas nos Estados Unidos no final do século XIX e começo do século XX, mas o aumento do uso recreativo, após a migração pela revolução mexicana, levou a formação do Ato Fiscal da Maconha em 1937, e eventualmente a *Cannabis* foi retirada do formulário e farmacopeia americanos. Porém nos anos 60, o uso recreativo atingiu um pico, que foi seguido de um grande interesse científico no uso da *Cannabis* para fins medicinais. A *Cannabis* está atualmente passando por um retorno a ciência, devido a seu rico repertório de fitoquímicos (ELIKKOTTIL *et al.*, 2009; ANDRE *et al.*, 2016).

O interesse na era moderna pelas propriedades medicinais da *Cannabis* foi acompanhado de diversos estudos que ajudaram a descrever muitos dos compostos presentes nessa planta, os canabinoides. Na década de 40 cientistas da Universidade de Illinois, nos Estados Unidos, isolaram um dos principais compostos não psicoticomiméticos da *Cannabis*, o canabidiol (CBD). Sua estrutura foi melhor compreendida cerca de 20 anos depois, por um cientista israelense chamado Rafael Mechoulan, que determinou a estrutura química do CBD além de isolar seu outro principal composto com propriedade psicoticomimética, o Δ^9-tetrahidrocanabinol (THC). E essas pesquisas deram oportunidade a um grande número de pessoas, com condições que falham em responder a drogas de prescrição, a utilizar canabinoides (IZZO *et al.*, 2009; PAIN, 2015).

Os efeitos farmacológicos dos canabinoides são majoritariamente devidos a existência do sistema endocanabinoide. As primeiras evidências de que o THC

poderia se ligar a receptores específicos nas células surgiram cerca de 20 anos após a descoberta dessa substância. Um ano depois, o receptor de membrana acoplado a proteína G responsivo a THC foi clonado e nomeado receptor canabinoide do tipo 1 (CB_1) (DEVANE *et al.*, 1988). Alguns anos depois, o receptor canabinoide do tipo 2 (CB_2) foi clonado (MUNRO *et al.*, 1993). A descoberta desses receptores levantou hipóteses relevantes da existência de ligantes endógenos, os endocanabinoides. Assim, em 1992, o primeiro agonista endógeno de ambos os receptores foi isolado e identificado como N-araquidonoil-etanolamida ou anandamida (AEA). Outro ligante foi isolado do intestino de cachorros dois anos depois e chamado de 2-araquidonilglicerol (2-AG) (MATSUDA *et al.*, 1990; DI MARZO *et al.*, 1994; HOWLETT, 1998). Esses endocanabinoides são produzidos através de fosfolipídios de membrana conforme demanda da célula e são degradados por suas enzimas amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) para a AEA, e monoacilglicerol lipase (MAGL) para o 2-AG. Inibidores dessas enzimas têm sido estudados como alternativa para o aumento do conteúdo de endocanabinoides em tecidos e consequente ativação de receptores CB_1 e CB_2 (IANNOTTI *et al.*, 2016).

Os receptores CB_1 e CB_2 pertencem a grande família de receptores acoplados a proteína G. O receptor CB_1 é expresso em todas as estruturas do cérebro e considerado o receptor acoplado a proteína G mais abundante nessa região. Em geral, esse receptor está localizado em terminais pré-sinápticos de neurônios glutamatérgicos e gabaérgicos. Ao contrário de receptores CB_1, receptores CB_2 estão localizados de forma expressiva em células do sistema imune, além de tecidos como pulmões, rins e fígado (IANNOTTI *et al.*, 2016; AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2017).

Esses receptores são ativados tanto por ligantes endógenos (i.e. AEA e 2-AG), como exógenos (i.e. THC) e sua modulação farmacológica parece ser importante em diversas condições. Sabe-se por exemplo que a administração de endocanabinoides, como AEA e 2-AG, pode produzir analgesia em modelos animais de dor aguda e crônica (GUINDON *et al.*, 2006; GUINDON *et al.*, 2007; SCHREIBER *et al.*, 2012). No entanto, estudos também já mostraram a influência

pró-nociceptiva de endocanabinoides. Um aumento dos níveis de AEA e 2-AG na PAG já foi encontrado em modelos de dor neuropática (PETROSINO *et al.*, 2007). Além disso, em determinadas doses injetadas diretamente na PAG, um agonista de receptores CB_1, o WIN55,212-2, mostrou exercer uma resposta hiperalgésica tardia em ratos (MAIONE *et al.*, 2006). E ao modular a produção do endocanabinoide 2-AG com a injeção intraperitoneal de um inibidor de diacil-glicerol lipase (DAGL), tanto alodinia ao frio quanto mecânica foram reduzidas (WILKERSON *et al.*, 2017). Portanto, fica claro o papel modulatório crítico do sistema endocanabinoide na regulação nociceptiva. Esse papel pode sofrer plasticidade, com alterações em expressão e função durante determinados estados fisiológicos. Endocanabinoides ainda possuem efeitos de curta duração e são degradados rapidamente *in vivo,* o que os torna inadequados como analgésicos (WOODHAMS *et al.*, 2015; SUMMERS *et al.*, 2017). Dessa forma são empregados canabinoides sintéticos e fitocanabinoides para a modulação desse sistema, porém nem todos parecem atuar diretamente na ativação de receptores CB_1 e CB_2, como por exemplo o CBD.

1.5 CANABIDIOL

A *Cannabis sativa* contém centenas de compostos químicos, e o CBD é o segundo componente mais prevalente da planta. Além de não estar associado a efeitos psicoativos, sozinho o CBD não afeta a função motora, memória ou a temperatura corporal. Em comparação ao THC, o CBD mostra uma afinidade menor aos receptores CB_1 e CB_2, porém pode atuar de forma indireta na ativação desses receptores. Estudos *in vitro* já mostraram que o CBD pode inibir tanto recaptação de anandamida, quanto a enzima que faz sua degradação (FAAH) afetando de forma expressiva o tônus desse endocanabinoide. A esse aumento foi associado a melhora de sintomas de esquizofrenia (DE PETROCELLIS *et al.*, 2011; LEWEKE *et al.*, 2012).

O CBD é também responsável por reduzir os efeitos colaterais resultantes do efeito do THC e devido a esse perfil de segurança e a falta de efeito

psicoticomimético, o CBD tem sido o canabinoide mais explorado a respeito de seus efeitos farmacológicos em diversos modelos de doença através de diferentes alvos moleculares (BOOZ, 2011). Um dos primeiros efeitos farmacológicos do CBD descritos foi o efeito antiepilético. Na década de 70, um grupo de cientistas brasileiros mostrou o efeito ativo do CBD em reduzir ou até mesmo bloquear convulsões induzidas em animais experimentais por uma variedade de substâncias e procedimentos (CARLINI *et al.*, 1973; IZQUIERDO *et al.*, 1973).

O CBD exibe um espectro abrangente de potenciais efeitos terapêuticos em condições neurológicas tanto em modelos animais, quanto em estudos em humanos, incluindo efeitos ansiolítico, antidepressivo e neuroprotetor. De forma importante, o receptor de serotonina 5-HT_{1A} parece estar envolvido em muitos desses efeitos, já que o bloqueio desse receptor com antagonistas, impede o desenvolvimento desses efeitos terapêuticos (CAMPOS E GUIMARÃES, 2008; CAMPOS *et al.*, 2015; LINGE *et al.*, 2016). Em doenças neurodegenerativas, como a esclerose múltipla, o uso de *Sativex* (medicamento em *spray* contendo proporções iguais de CBD e THC) mostrou controle de espasticidade em pacientes (MEUTH *et al.*, 2015). Já no estudo de Esposito e colaboradores em 2007, o uso de CBD mostrou ter uma ação anti-inflamatória em um modelo animal de Alzheimer induzido por injeção de peptídeo beta amiloide humano no hipocampo (ESPOSITO *et al.*, 2007). O CBD também foi efetivo na neuroproteção em um modelo de doença de Parkinson induzida por injeção unilateral de 6-hidroxidopamina no cérebro. No estudo de García-Arencibia e colaboradores com esse modelo, o CBD induziu aumento da expressão das superóxidos desmutases dependente de cobre e zinco, enzimas importantes no controle de estresse oxidativo. E como conclusão os autores discutem que, através de propriedades antioxidantes, o CBD promoveu neuroproteção contra a degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos, característica da doença de Parkinson (GARCÍA-ARENCIBIA *et al.*, 2007).

O interesse terapêutico em relação ao CBD também tem aumentado não só pelos efeitos em condições neurológicas, mas também por seu efeito analgésico. Medicamentos baseados em CBD já foram aplicados na clínica para tratar

condições dolorosas. Um estudo utilizando o tratamento com *Sativex* em pacientes com diferentes modalidades de dor neuropática periférica mostrou que esse fármaco exerceu melhora na dor de pacientes (SERPELL *et al.*, 2014).

1.6 CANABIDIOL NO CONTROLE DA DOR

A prática clínica enfrenta dificuldades particulares quanto ao tratamento de pacientes com dores associadas ao câncer, dores neuropáticas e dores centrais, como a dor associada a esclerose múltipla. Dessa forma o uso de canabinoides representa uma alternativa para esses pacientes que possuem condições refratárias aos tratamentos atualmente disponíveis. Diversos estudos empregando modelos animais de dor neuropática e também inflamatória já mostraram efeitos positivos do CBD nessas condições, e diferentes componentes do circuito de transmissão da dor mostram estar envolvidos (XIONG *et al.*, 2012; WARD *et al.*, 2014; HARRIS *et al.*, 2016; CASEY *et al.*, 2017; KING *et al.*, 2017).

O CBD parece exercer estimulação em receptores de potencial transitório do tipo vaniloide 1 (TRPV1) que estão envolvidos no mecanismo de hiperalgesia térmica e inflamatória. O CBD mostrou efeito dessensibilizador nos receptores TRPV1 para ação de seu agonista direto, a capsaicina, sugerindo que esse canabinoide exerce atividade anti-inflamatória através da dessensibilização de nociceptores (BISOGNO *et al.*, 2001). Estudos já mostraram que CBD recupera o limiar mecânico e também impede o desenvolvimento de alodinia ao frio em modelos de dor neuropática induzida por quimioterápicos como cisplatina e paclitaxel em camundongos (WARD *et al.*, 2011; HARRIS *et al.*, 2016). No trabalho de Ward e colaboradores em 2014, o efeito antinociceptivo mecânico do CBD em um modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel, foi parcialmente bloqueado por um antagonista de receptores de serotonina do tipo 5-HT_{1A}, sugerindo um envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito analgésico de CBD (WARD *et al.*, 2014). Utilizando um modelo de dor induzida por constrição do nervo ciático em camundongos, Casey e colaboradores mostraram que tanto THC, quanto CBD induziram efeito antinociceptivo, porém apenas o THC mostrou exercer efeitos

adversos (CASEY *et al.*, 2017). Além disso, o CBD mostrou ser eficaz em reduzir a dor inflamatória induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) e também a dor neuropática após ligação do nervo espinhal. Esse efeito ocorreu através da interação do CBD com um sítio específico de ligação em receptores de glicina α3, e efeitos adversos como alteração motora ou variação na temperatura corporal não foram encontrados (XIONG *et al.*, 2012). Um estudo recente de Genaro e colaboradores também evidenciou um papel analgésico do CBD em um modelo de dor após incisão na região plantar da pata de ratos (GENARO *et al.*, 2017).

Apesar de estudos já terem mostrado a eficácia do CBD em inibir alterações sensoriais associadas a diferentes tipos de dor (XIONG *et al.*, 2012; WARD *et al.*, 2014; HARRIS *et al.*, 2016; CASEY *et al.*, 2017; GENARO *et al.*, 2017), um efeito neuroprotetor (EL-REMESSY *et al.*, 2006), e sua eficácia em alguma complicações do diabetes, como a retinopatia (EL-REMESSY *et al.*, 2010) e inflamação no pâncreas relacionada ao diabetes tipo 1, sabe-se muito pouco quanto a seus efeitos na dor neuropática diabética. No trabalho único de Toth e colaboradores (2010) o CBD, após tratamento de 3 meses por via intranasal e sistêmica, mostrou efeito antinociceptivo em um modelo de diabetes em camundongos (TOTH *et al.,* 2010). Dessa forma, o presente estudo visou investigar o potencial efeito antinociceptivo do CBD na alodinia mecânica em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (STZ), bem como identificar alguns dos mecanismos envolvidos nesse efeito.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial efeito antinociceptivo do CBD sobre a alodinia mecânica em ratos com diabetes induzido quimicamente por estreptozotocina e avaliar possíveis mecanismo de ação envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar alterações no limiar mecânico de animais diabéticos tratados com CBD através do teste de von Frey eletrônico;
- Investigar a participação do receptores de serotonina, dos receptores de glicina e dos receptores canabinoides CB1 e CB2 no mecanismo de ação do CBD;
- Avaliar o conteúdo de serotonina (5-HT) e de seu metabólito (5-HIAA) em amostras de cordão espinhal de ratos diabéticos tratados ou não com CBD.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos (n=301) da variedade *Wistar* pesando entre 180 e 220 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Esses animais foram alocados em caixas de plástico (41 x 32 x 16.5 cm) em grupos de no máximo 4 animais por caixa, e mantidos em condições controladas de iluminação, com água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR; #1007).

3.2 DROGAS

Foram utilizados estreptozotocina (STZ; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Califórnia, EUA) e citrato de sódio fornecido pela Merck S.A. Indústrias Farmacêuticas (Brasil). Canabidiol (CBD) 99,6% puro (sem nenhum outro canabinoide) foi gentilmente fornecido pela BSPG-Pharm (Sandwich, Reino Unido). Os antagonistas de receptores canabinoides AM251 (antagonista CB_1) e AM630 (antagonista CB_2) foram adquiridos pela Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, EUA). O antagonista não seletivo de receptores de serotonina, maleato de metisergida (MTS, antagonista 5-$HT_{1A/B/D}$, 5-HT_2 e 5-HT_7) e cloridrato de estricnina (STRYCH, antagonista de receptores de glicina) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). (S)-WAY 100135 (WAY, antagonista seletivo de receptores de serotonina 5-HT_{1A}) foi fornecido pela Tocris Bioscience (Perdizes, SP, Brasil). O CBD foi diluído com solução 0,9% NaCl e 2% tween 80. AM251 e AM630 foram diluídos em uma solução 1:1:18 de dimetilsulfóxido, tween 80 e salina. MTS e STRYCH foram diluídos em salina. (S)-WAY100135 foi diluído em salina aquecida (60ºC).

3.3 INDUÇÃO DO DIABETES

Após um jejum de 12 horas, a indução do diabetes em ratos foi realizada através da administração única de estreptozotocina (STZ; 60 mg/Kg, i.p.; diluída em tampão citrato, 10 mM, pH 4,5). A confirmação do diabetes foi realizada três dias após a injeção de STZ (considerado o dia 0 para o estado diabético) e também ao fim dos experimentos 28 dias após a confirmação do diabetes, por meio da aplicação de um pequeno volume de sangue periférico colhido da cauda dos animais em fitas teste impregnadas de glicose oxidase (Accu-Check ActiveTM, Roche). Foram considerados diabéticos e mantidos nos experimentos os animais cuja glicemia foi igual ou maior que 250 mg/dL. Os grupos controles (grupos normoglicêmicos) receberam somente tampão citrato (VEI, 10 mM, pH 4,5, volume equivalente).

3.4 TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO

Os animais foram alocados em caixas de acrílico, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm^2, constituída de arame não maleável de 1 mm. A alodinia mecânica foi avaliada por meio do teste de pressão crescente na pata de ratos (Von frey eletrônico), aplicado por um analgesímetro eletrônico (IITC Life Science, California, EUA). O aparelho possui um transdutor conectado a um contador digital que registra o limiar aplicado a pata do animal em gramas (g). O contato do transdutor com a pata foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados nas caixas de acrílico por um tempo de ambientação de 15 min antes da aplicação, por entre as malhas da rede, de uma força linearmente crescente no centro da planta da pata. O estímulo foi cessado quando o animal produzia uma resposta de retirada e/ou sacudida da pata estimulada. A intensidade da alodinia mecânica foi então quantificada pela média aritmética de três medidas em cada uma das patas traseiras do animal, e

então foi feita a média entre as patas para representar o limiar mecânico de cada animal (YAMAMOTO *et al.*, 2009).

3.5 TESTE DE CAMPO ABERTO

A atividade locomotora após a injeção de CBD (0,1, 0,3 ou 3 mg/Kg, i.p.) ou veículo foi avaliada através do teste de campo aberto conforme previamente descrito (SANTIAGO *et al.*, 2010). A arena utilizada para o teste consistia em uma caixa retangular (50 x 40 x 63 cm) com piso dividido virtualmente em 9 quadrantes iguais. Uma hora após o tratamento com CBD (pico do efeito antialodínico), os animais foram colocados individualmente no centro da arena e o número de quadrantes cruzados, isto é a passagem do animal com as duas patas traseiras para o próximo quadrante, foi contabilizado manualmente durante 5 min. O número de cruzamentos no campo aberto foi utilizado como um índice da atividade locomotora.

3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

No primeiro conjunto de experimentos, o limiar mecânico foi avaliado antes e 28 dias após a indução do diabetes. No dia 28, após a confirmação do diabetes, animais diabéticos receberam injeção única i.p. de veículo (VEI) ou CBD nas doses de 0,1, 0,3 ou 3 mg/Kg, baseadas no trabalho de Genaro e colaboradores (2017). O limiar mecânico foi então reavaliado a cada hora, durante quatro horas após o tratamento com CBD, começando na primeira hora após tratamento. Ao fim do experimento a glicose sanguínea foi novamente mensurada (FIGURA 1A).

O segundo conjunto de experimentos visou avaliar se os receptores CB_1 e CB_2 estariam envolvidos no efeito antinociceptivo agudo do CBD. O diabetes foi induzido como descrito previamente. Animais diabéticos tiveram seu limiar mecânico mensurado 28 dias após a indução do diabetes, e então, receberam injeção intraperitoneal de veículo (VEI), AM251 (antagonista CB_1) ou AM630

(antagonista CB_2) ambos na dose de 1 mg/Kg (HILL E GORZALKA, 2005; DE MORAIS *et al.*, 2016). Vinte minutos após tratamento com os antagonistas, os grupos foram tratados com CBD (3 mg/Kg) ou veículo, e o limiar mecânico foi avaliado novamente a cada hora, até a quarta hora após o tratamento com CBD. Levando em conta a expressão ubíqua de receptores canabinoides, seus respectivos antagonistas foram administrados de forma sistêmica (FREUNDT-REVILLA *et al.*, 2017) (FIGURA 2A).

Para avaliar o papel de receptores de glicina ou 5-HT no efeito antinociceptivo agudo do CBD sobre a alodinia mecânica em ratos diabéticos, os antagonistas próprios desses receptores foram administrados por via intratecal (i.t.). Para isso, após a avaliação basal do limiar mecânico em animais diabéticos 28 dias após indução do diabetes, grupos independentes de animais diabéticos foram posicionados dorsalmente sob anestesia leve (4% halotano). Uma agulha de aproximadamente 2,5 cm de comprimento (25-G) foi introduzida transcutaneamente na altura do espaço subaracnoide entre as vertebras lombares L5 e L6, como descrito previamente por Pereira e colaboradores (Pereira *et al.*, 2017). Um movimento lateral rápido da cauda foi considerado indicativo de que a agulha havia adentrado o espaço subaracnoide. Então, VEI (20 µL), STRYCH (10 µg/20 µL), MTS (30 µg/20 µL) ou WAY (3 µg/20 µL) foi injetado 10 min antes do tratamento com CBD (3 mg/Kg, i.p.) e o limiar mecânico foi reavaliado de hora em hora durante um período de quatro horas (FIGURAS 3A e 4A). As doses de STRYCH, MTS e WAY foram selecionadas com base em estudos encontrados na literatura (WEI E PERTOVAARA, 2006; SAADÉ *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013). O efeito do tratamento i.t. com antagonistas sozinho foi testado em grupos experimentais independentes.

O efeito de um tratamento repetido com CBD foi avaliado em um outro conjunto de experimentos. Animais tiveram o limiar mecânico avaliado antes e 14 dias após a indução do diabetes. Após a avalição do limiar mecânico no dia 14, um tratamento diário i.p. com CBD (0,1, 0,3 ou 3 mg/Kg) foi iniciado e mantido durante 14 dias. O limiar mecânico foi novamente mensurado uma vez por semana (no dia 21 e 28 após a injeção de STZ; sempre antes do tratamento

diário com CBD) (FIGURA 5A). Para todos os tratamentos os animais tiveram o peso corporal mensurado previamente a injeção. Ao fim do experimento, todos os animais eutanasiados com overdose de anestésico e amostras do cordão espinhal (L3-L6) foram dissecadas para a quantificação do conteúdo de serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroxi indol acético (5-HIAA) através da técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (FIGURA 6A).

3.7 DETERMINAÇÃO POR HPLC DO CONTEÚDO DE 5-HT E 5-HIAA NO CORDÃO ESPINHAL

Os conteúdos de 5-HT e seu metabólito 5-HIAA em segmento lombar (L3-L6) do cordão espinhal de animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com CBD (0,1, 0,3 e 3 mg/Kg) ou veículo durante 14 dias foram avaliados por HPLC como descrito previamente (DA SILVA DIAS *et al.*, 2016). O sistema de HPLC contém uma coluna de fase reversa (Hypurity Elite C18, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm e 100-Å poro, o tamanho do diâmetro da partícula; Hypersil, Cheshire, UK), acoplada em um detector eletroquímico. As amostras de cordão espinhal foram pesadas e homogeneizadas em 800 µL de solução de extração (0,05 M de ácido perclórico), centrifugadas à 15,000 rpm durante 20 min à 6 ºC e armazenadas à -70 ºC para análise. Sobrenadantes foram submetidos a separação isocrática rápida através do sistema de coluna C18-HPLC de fase reversa (C18, ODS, 3 μm, coluna 150 mm x 2.0 mm; acoplada a coluna New-Guard Cartridge, KJ0-4282; ambas fornecidas por Phenomenex, Torrance, CA, USA). O sistema HPLC consistia de um detector eletroquímico BAS Epsilon com um eletrodo de vidro de carbono e uma bomba (PM-92e). O potencial foi regulado a 650 mV (comparado com eletrodo Ag-AgCl de referência). A fase móvel consistiu de 50 mM NaH_2PO_4, 0,1 mM Na_2–EDTA, 0,5mM sulfato de n-octil-sódio, 10% metanol (pH 5,5) e foi filtrado e bombeado através do sistema em um fluxo de 140 μL/min. O volume da injeção foi de 10 μL. Esse arranjo permitiu a análise do conteúdo de 5-HT e 5-HIAA em cada amostra dialisada, o que resultou em um

tempo de espera de aproximadamente 30 min. Todas as substâncias foram quantificadas comparando áreas de pico de curvas padrão.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados comportamentais foram apresentados com a média ± erro padrão da média (EPM) para 5-13 animais por grupo. Test t de *student* foi utilizado para analisar os valores de peso corporal e glicemia nos dias de confirmação inicial do diabetes (dia 0) e o fim dos experimentos (dia 28), e ANOVA de uma via foi utilizada para comparação entre os tratamentos em cada um dos intervalos de tempo. Os dados de análise por HPLC dos conteúdos de 5-HT, 5-HIAA e a razão [5-HIAA] / [5-HT], os dados do teste de campo aberto, bem como os valores de peso corporal foram analisados por ANOVA de uma via. ANOVA de duas vias com medidas repetidas foi utilizada para a avaliação do limiar mecânico (todos os protocolos). Os fatores independentes utilizados foram tratamento e tempo. Quando apropriado, análise utilizando *post-hoc* Bonferroni para comparações múltiplas foi aplicada. O nível de significância foi estabelecido para $p < 0.05$. Todos os testes foram conduzidos utilizando o software GraphPad Prism (versão 6, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 CBD EXERCE EFEITO ANTIALODÍNICO AGUDO SEM ALTERAR A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS DIABÉTICOS

Todos os grupos de animais diabéticos mostraram uma redução no limiar mecânico, avaliado no teste de von Frey eletrônico, 28 dias após a indução do diabetes (grupos STZ), quando comparados ao grupo de animais normoglicêmicos (VEI+VEI), o que indica o desenvolvimento de alodinia mecânica. ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeitos significativos de tratamento [$F_{(4, 34)} = 38,01$; $p<0,0001$], tempo [$F_{(5, 170)} = 57,18$; $p<0,0001$] e também interação entre esses fatores [$F_{(20, 170)} = 6,92$; $p<0,0001$]. O *post hoc* de Bonferroni para comparações múltiplas mostrou que a injeção i.p. única de CBD 3 mg/Kg (STZ + CBD 3) foi capaz de exercer efeito antialodínico em animais diabéticos por duas horas após tratamento. A dose de 0,3 mg/Kg de CBD (STZ + CBD 0,3) mostrou efeito apenas uma hora após o tratamento. Nenhum efeito foi encontrado em animais tratados com a dose de 0,1 mg/Kg (STZ + CBD 0,1) durante o decurso temporal do experimento. O grupo controle normoglicêmico (VEI+VEI) não mostrou diferenças no limiar mecânico durante o experimento (FIGURA 1B).

Para testar uma possível relação entre o efeito antinociceptivo do CBD e um déficit locomotor, animais normoglicêmicos tratados com veículo ou animais diabéticos tratados com veículo ou CBD foram avaliados no teste de campo aberto uma hora após os respectivos tratamentos (FIGURA 1C), sendo esse o período de tempo que o pico do efeito antinociceptivo do CBD foi observado. ANOVA de uma via não revelou efeitos significativos no tratamento $F_{(4, 46)} = 1.988$; $p=0,1121$].

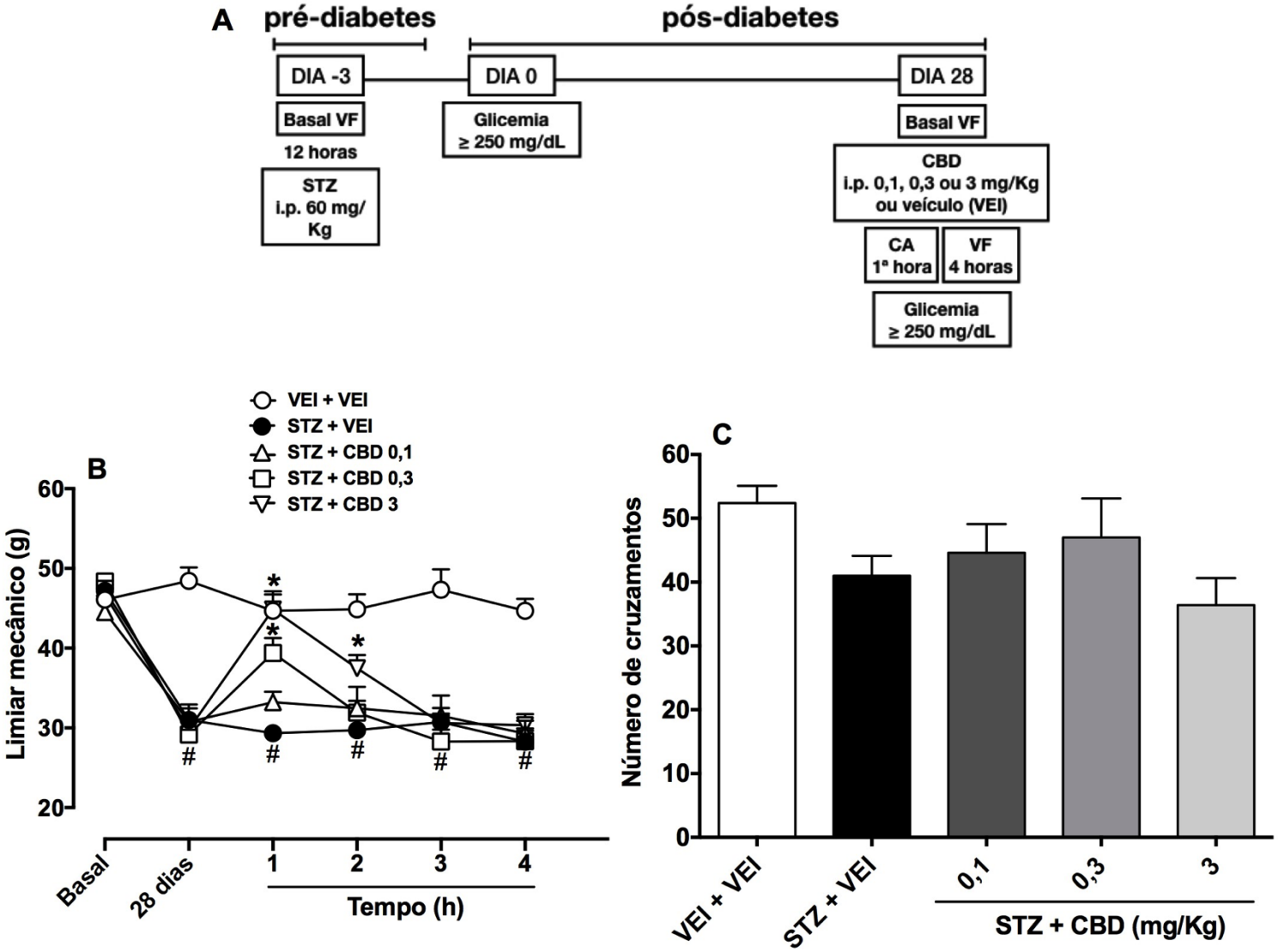

FIGURA 1 – Linha temporal do experimento para avaliação do efeito do tratamento agudo com CBD (painel A). Efeito do tratamento agudo com CBD (0,1, 0,3 ou 3 mg/Kg, i.p.) na alodinia mecânica (painel B) e na atividade locomotora (painel C) em animais com diabetes induzido por STZ. Os dados apresentam média ± EPM, com n = 7-9 por grupo. VF: von Frey eletrônico; STZ: estreptozotocina; CA: campo aberto. # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle normoglicêmico tratado com veículo (VEI+VEI). * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo diabéticos tratado com veículo (STZ + VEI). ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de *post hoc* de Bonferroni (painel B). ANOVA de uma via seguida de *post hoc* de Bonferroni (painel C).

4.2 EFEITO ANTIALODÍNICO AGUDO DO CBD NÃO É DEPENDENTE DA ATIVAÇÃO DIRETA DE RECEPTORES CB_1 E CB_2

Quando comparados ao grupo controle normoglicêmico (VEI+VEI), animais diabéticos (grupos STZ), avaliados no teste de von Frey eletrônico, mostraram um limiar mecânico reduzido 28 dias após a indução do diabetes (FIGURA 2B e 2C). Os grupos diabéticos foram pré-tratados com veículo ou antagonistas de receptores CB_1 e CB_2, AM251 ou AM630 (1 mg/Kg, i.p.), respectivamente, 20 minutos antes do tratamento com veículo ou CBD (dose de 3 mg/Kg, i.p., a dose com efeito antialodínico eficaz de duas horas determinado no experimento 1). O limiar mecânico foi então reavaliado durante quatro horas após o tratamento com CBD.

Como mostrado na figura 2B, ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou diferença significativa no efeito de tratamento [$F_{(4, 234)} = 63,12$; $p<0,0001$], tempo [$F_{(5, 234)} = 31,55$; $p<0,0001$] e também na interação entre esses dois fatores [$F_{(20, 234)} = 5,232$; $p<0,0001$]. O *post hoc* de Bonferroni para comparações múltiplas indicou que o tratamento com AM251 não bloqueou o efeito antialodínico do CBD uma e duas horas após o tratamento (FIGURA 2B).

Ao avaliar um potencial envolvimento do receptor CB_2 através do pré-tratamento com seu antagonista (AM630), ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo de tratamento [$F_{(4, 222)} = 46,83$; $p<0,0001$], tempo [$F_{(5, 222)} = 29,85$; $p<0,0001$] e interação entre esses fatores [$F_{(20, 222)} = 4,652$; $p<0,0001$]. O *post hoc* mostrou que o pré-tratamento com AM630 não bloqueou o efeito antialodínico do CBD uma e duas horas após o tratamento (FIGURA 2C).

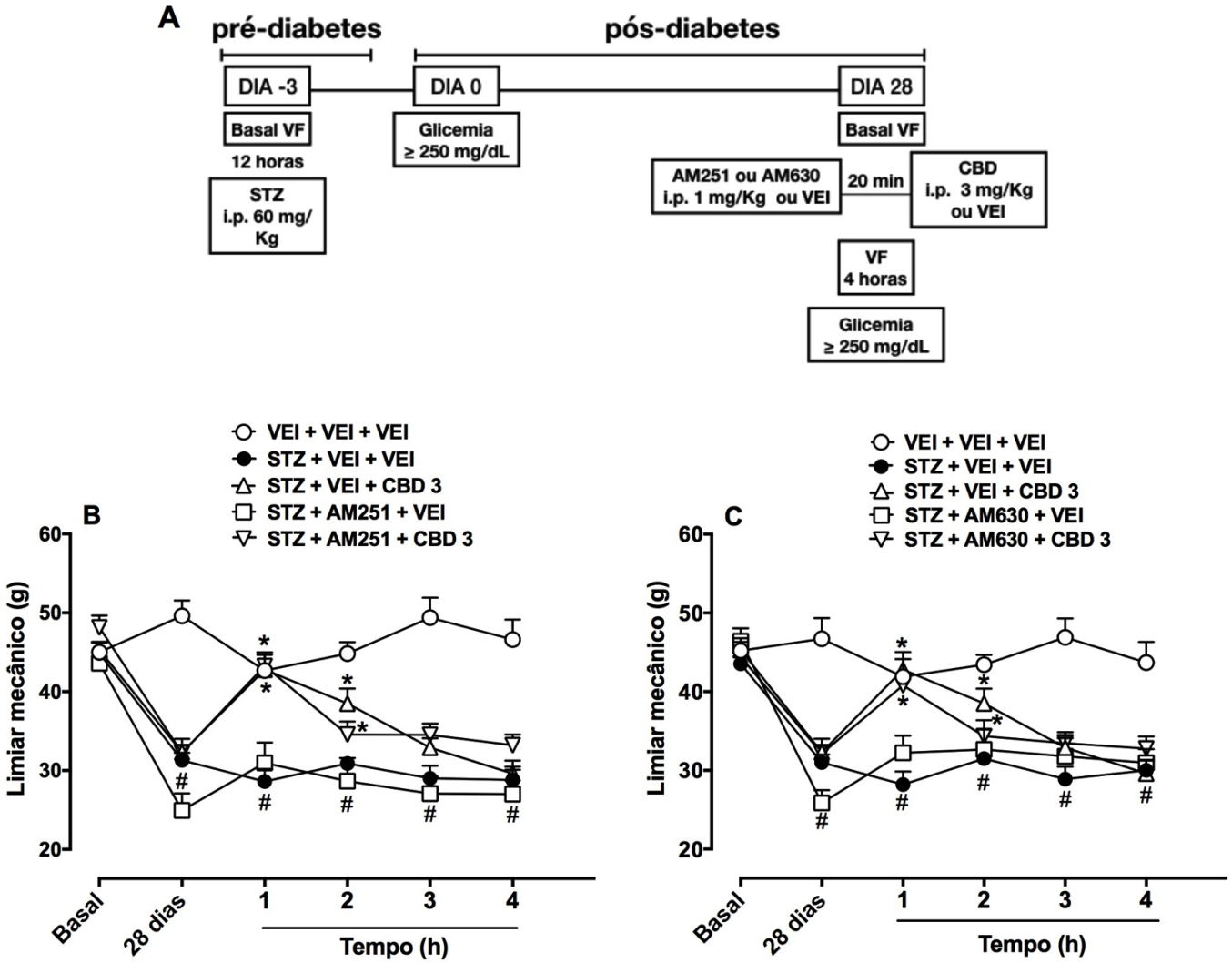

FIGURA 2- Linha temporal do experimento para avaliação do pré-tratamento com antagonistas de receptores CB_1 e CB_2 no efeito antialodínico agudo do CBD (painel A). Efeito do pré-tratamento com antagonistas de receptores CB_1 e CB_2 (AM251 ou AM630; painéis B e C, respectivamente; ambos antagonistas na dose de 1 mg/Kg, i.p.) no efeito antialodínico do CBD (3 mg/Kg, i.p.) em animais diabéticos (STZ). Os dados representam média ± EPM, com n = 5-10 por grupo. VF: von Frey eletrônico; STZ: estreptozotocina. # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle normoglicêmico tratado com veículo (VEI+VEI+VEI). * Indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo (STZ+VEI+VEI). ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de *post hoc* de Bonferroni.

4.3 EFEITO ANTIALODÍNICO AGUDO DO CBD NÃO É BLOQUEADO POR UM ANTAGONISTA COMPETITIVO DE RECEPTOR DE GLICINA

Para avaliar um potencial envolvimento de receptores de glicina no efeito antialodínico do CBD, 28 dias após a indução do diabetes, animais receberam uma injeção i.t. única de veículo ou STRYCH (10 µg/20 µL) 10 min antes do tratamento com veículo ou CBD (3 mg/Kg, i.p.). O limiar mecânico foi mensurado novamente a cada hora durante um período de quatro horas após o tratamento com CBD. ANOVA de duas vias com medidas mostrou efeitos significativos de tratamento [$F_{(4,240)} = 62,28$; $p<0,0001$], tempo [$F_{(5, 240)} = 31,84$; $p<0,0001$] e também interação entre esses fatores [$F_{(20, 240)} = 4,73$; $p<0,0001$]. O *post hoc* de Bonferroni mostrou que a injeção i.t. de STRYCH não bloqueou o efeito antialodínico do CBD estabelecido uma e duas horas após o tratamento (FIGURA 3B).

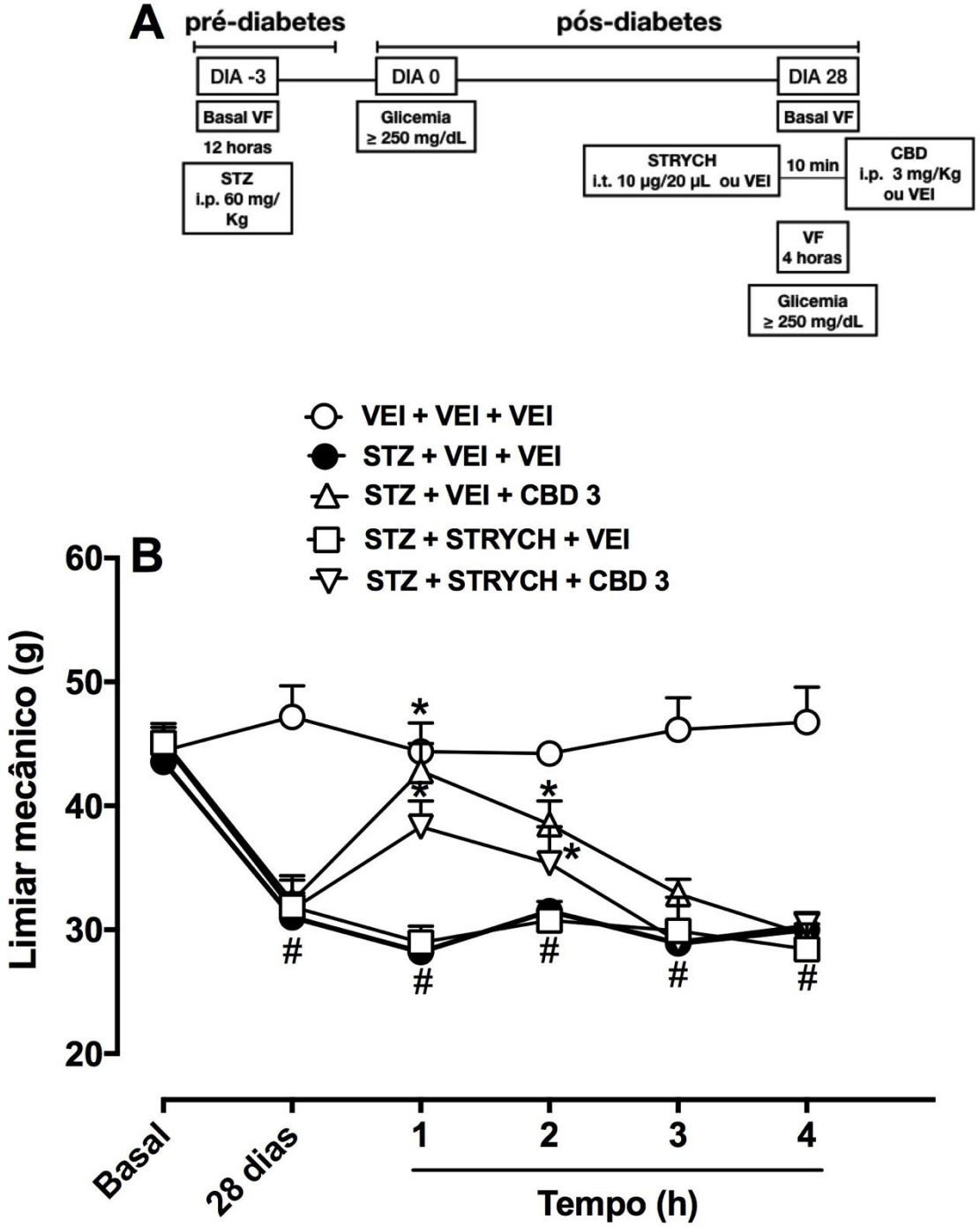

FIGURA 3 – Linha temporal do experimento para avaliação do pré-tratamento com um antagonista competitivo de receptores de glicina (painel A). Efeito do pré-tratamento com estricnina (STRYCH, 10 µg/20 µL, i.t) no efeito antialodínico do CBD (3 mg/Kg, i.p.) em animais diabéticos (STZ) (painel B). Os dados representam média ± EPM, com n= 7-10 por grupo. VF: von Frey eletrônico; STZ: estreptozotocina. # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo (VEI + VEI + VEI). * Indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo (STZ + VEI + VEI). ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de *post hoc* de Bonferroni.

4.4 EFEITO ANTIALODÍNICO AGUDO DO CBD É DEPENDENTE DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR 5-HT$_{1A}$

Animais diabéticos foram testados no aparelho de von Frey eletrônico 28 dias após a indução do diabetes para avaliar o envolvimento dos receptores de serotonina com o efeito antinociceptivo do CBD. Para isso, animais receberam injeção i.t. de veículo ou antagonista não seletivo de receptores de serotonina, MTS (30 µg/20 µL) 10 min antes do tratamento com veículo ou CBD. ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo de tratamento [$F_{(4, 39)} = 39,05$; $p<0,0001$], tempo [$F_{(5, 195)} = 45,73$; $p<0,0001$] e interação entre esses dois fatores [$F_{(20, 195)} = 6,78$; $p<0,0001$]. O *post hoc* de Bonferroni mostrou que o pré-tratamento com MTS não bloqueou o efeito antialodínico que o CBD exerceu em animais diabéticos uma e duas horas após o tratamento (FIGURA 4B).

No próximo conjunto de experimentos, um antagonista seletivo de receptores 5-HT$_{1A}$ foi testado. Animais diabéticos receberam uma injeção i.t. de veículo ou WAY (3 µg/20 µL) 10 min antes do tratamento com veículo ou CBD, e o limiar mecânico foi reavaliado novamente a cada hora durante quatro horas após o tratamento com CBD. ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito significativo de tratamento [$F_{(4, 234)} = 65,54$; $p<0,0001$], tempo [$F_{(5, 234)} = 37,76$; $p<0,0001$] e interação [$F_{(20, 234)} = 5,31$; $p<0,0001$]. Contudo, *post hoc* de Bonferroni mostrou que o pré-tratamento com antagonista seletivo de receptores 5-HT$_{1A}$, WAY100135, foi capaz de reverter o efeito antialodínico do CBD (FIGURA 4C).

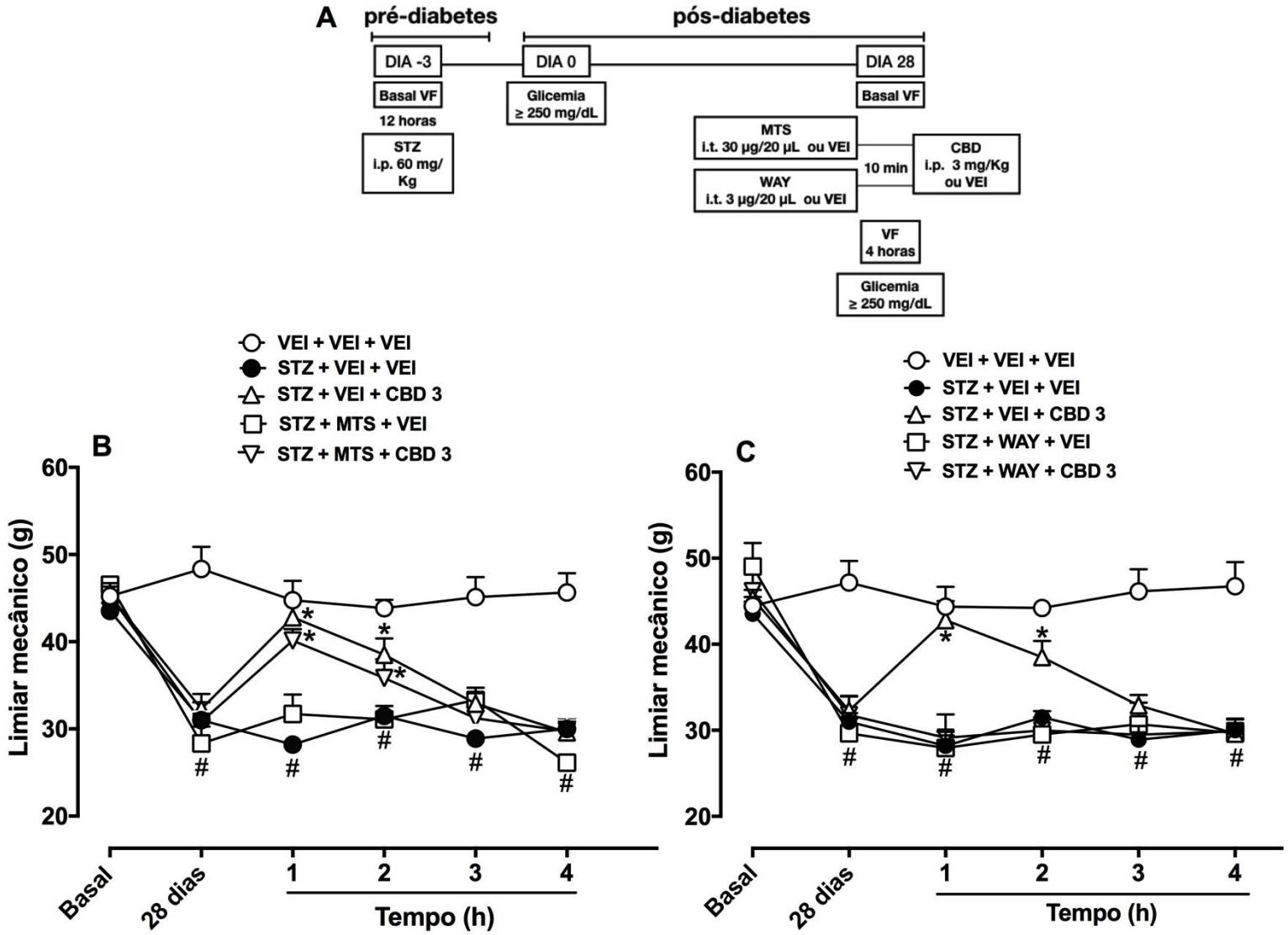

FIGURA 4 – Linha temporal do experimento para avaliação do pré-tratamento com antagonistas de receptores de serotonina (painel A). Efeito do pré-tratamento com antagonista não seletivo (painel B) (metisergida, MTS, 30 µg/20 µL, i.t.) ou antagonista seletivo (painel C) de receptores 5-HT_{1A} (WAY 100135, WAY, 3 µg/20 µL, i.t.) no efeito antialodínico do CBD (3 mg/Kg, i.p.) em animais diabéticos (STZ). Os dados representam média ± EPM, com n = 6-10 por grupo. VF: von Frey eletrônico; STZ: estreptozotocina. # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo (VEI + VEI + VEI). * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo (STZ + VEI +VEI). ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de *post hoc* de Bonferroni.

4.5 CBD EXERCE EFEITO ANTIALODÍNICO APÓS TRATAMENTO REPETIDO

Animais diabéticos, avaliados no teste de von Frey eletrônico, mostram uma redução do limiar mecânico no dia 14 após a indução do diabetes quando comparados ao grupo normoglicêmico (VEI+VEI). Um tratamento diário com CBD (0,1, 0,3 ou 3 mg/Kg) teve início no dia 14, com duração de 14 dias. O limiar mecânico foi reavaliado do dia 21 e novamente no dia 28, antes que tratamento respectivo desses dias fosse administrado, ou seja, vinte e quatro horas após o último tratamento com CBD.

ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito significativo de tratamento [$F_{(4, 48)} = 28,26$, $p<0,0001$], tempo [$F_{(3, 144)} = 46,95$, $p<0,0001$] e interação [$F_{(12, 144)} = 7,61$, $p<0,0001$]. O *post hoc* de Bonferroni mostrou que o tratamento repetido com CBD (nas doses de 0,3 e 3 mg/Kg) foi capaz de produzir um efeito antialodínico em animais diabéticos no dia 21 e no dia 28 quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo (STZ + VEI; FIGURA 5B).

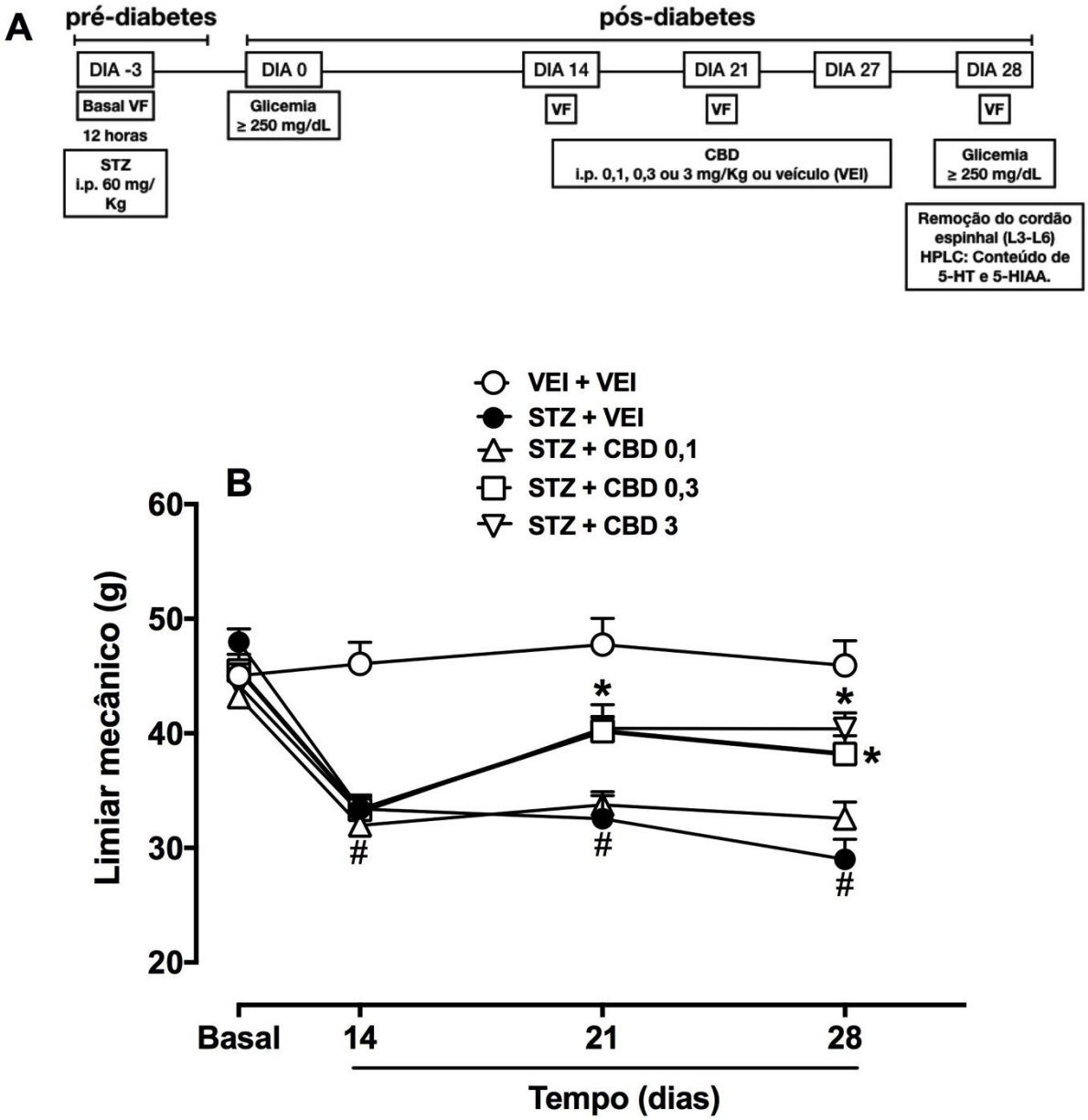

FIGURA 5 – Linha temporal do experimento para avaliação do tratamento repetido com CBD (painel A). Efeito do tratamento repetido com CBD (0,1, 0,3 ou 3 mg/Kg; durante 14 dias) na alodinia mecânica em animais diabéticos (STZ) (painel B). Os dados representam média ± EPM, com n = 6-11 por grupo. VF: von Frey eletrônico; STZ: estreptozotocina; HPLC: cromatografia líquida de alta performance; 5-HT: serotonina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxi indol acético. # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo (VEI + VEI). * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo (STZ + VEI). ANOVA de duas vias com medidas repetidas para seguida de *post hoc* de Bonferroni.

4.6 TRATAMENTO REPETIDO COM CBD AUMENTA DE FORMA SIGNIFICATIVA O CONTEÚDO ESPINHAL DE 5-HT.

Animais diabéticos tratados de forma repetida com CBD (nas doses de 0,1, 0,3 ou 3 mg/Kg, durante 14 dias) tiveram amostras da porção lombar do cordão espinhal (L3-L6) dissecadas e a técnica de HPLC foi feita para aferir o conteúdo de 5-HT e 5-HIAA.

Considerando o níveis espinhais de 5-HT, ANOVA de uma via mostrou que efeitos significativos de tratamento $F_{(4, 43)} = 60,93$; $p<0,0001$]. O *post hoc* de Bonferroni revelou que animais diabéticos tiveram um redução significativa do conteúdo de 5-HT no cordão espinhal quando comparados ao grupo de animais controle normoglicêmicos (VEI+VEI). O tratamento repetido com CBD (dose de 0,3 mg/Kg) induziu um aumento significativo no conteúdo de 5-HT no cordão espinhal de ratos diabéticos (FIGURA 6B).

Os níveis do metabólito de 5-HT, o 5-HIAA foram também avaliados nos animais normoglicêmicos e nos animais diabéticos tratados com veículo ou CBD. ANOVA de uma via mostrou efeito significativo de tratamento nos níveis de 5-HIAA [$F(4,43) = 6,992$; $p=0,0002$]. O post hoc de Bonferroni para comparações múltiplas revelou que animais diabéticos não diferiram de animais normoglicêmicos considerando o conteúdo espinhal do metabólito 5-HIAA. Apenas animais diabéticos tratados com CBD (na dose de 3 mg/Kg) tiveram um aumento do conteúdo de 5-HIAA no cordão espinhal quando comparados a animais diabéticos tratados com veículo (STZ + VEI; FIGURA 6C).

Por fim, a razão [5-HIAA] / [5-HT] foi calculada para estimar a taxa de renovação de 5-HT (FIGURA 6D). ANOVA de uma via mostrou efeito significativo de tratamento [$F(4,43) = 65,02$; $p<0,0001$]. O post hoc de Bonferroni para comparações múltiplas mostrou que animais diabéticos, com exceção do grupo tratado com a dose de CBD 0,3 mg/Kg, diferem de forma significativa de animais normoglicêmicos nesse parâmetro. O tratamento com CBD nas doses de 0,3 e 3 mg/Kg alterou significativamente a razão [5-HIAA] / [5-HT] em animais diabéticos quando comparados ao grupo diabético tratado apenas com veículo, sendo a razão significativamente menor no grupo diabético tratado com CBD 0,3 mg/Kg e maior em animais diabéticos tratados com CBD na maior dose (3 mg/Kg).

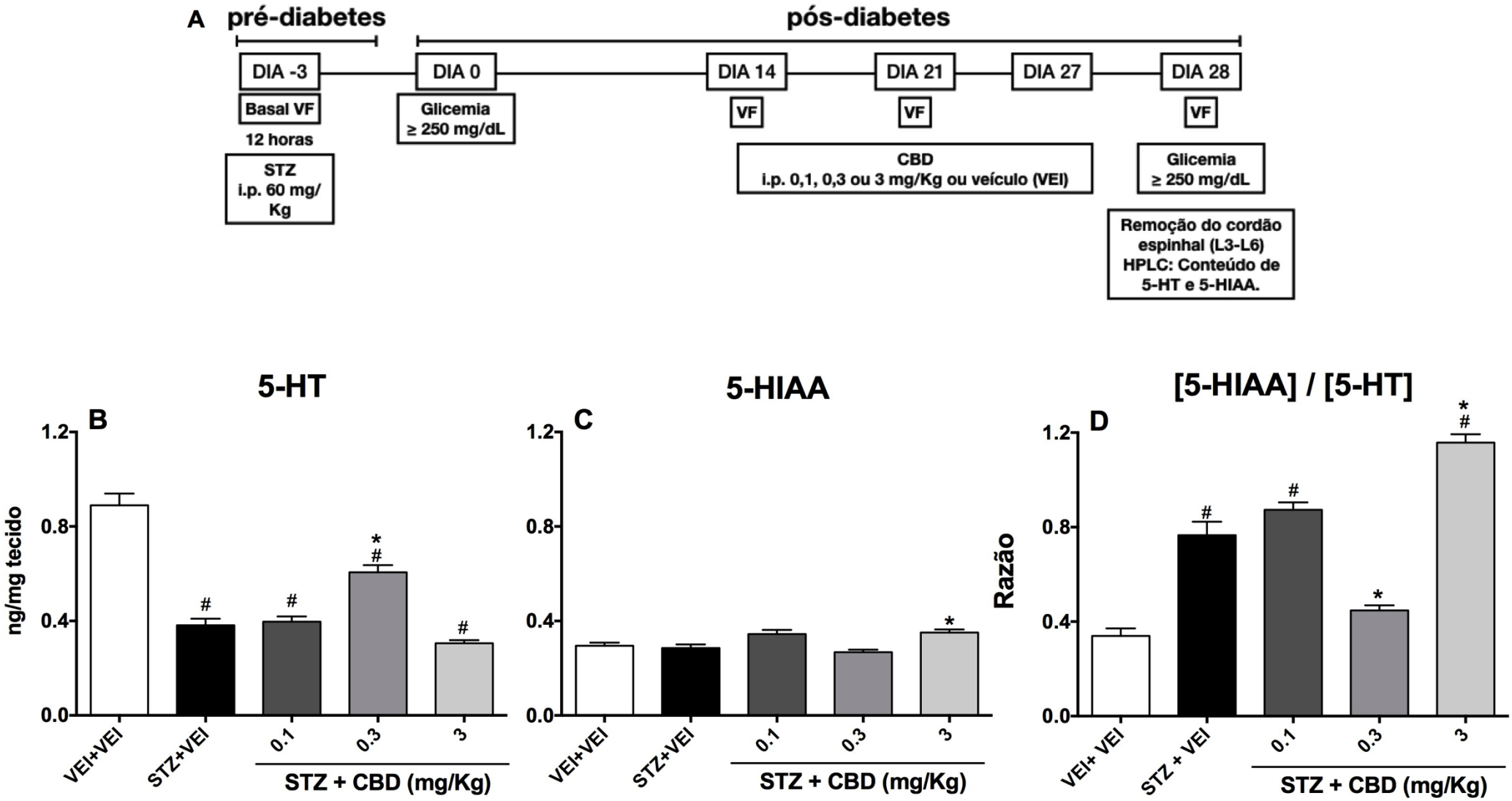

FIGURA 6 – Linha temporal do experimento de avaliação do conteúdo de 5-HT e 5-HIAA (painel A) em amostras do cordão espinhal de animais diabéticos tratados repetidamente com CBD. Efeito do tratamento com CBD (0,1, 0,3 ou 3 mg/Kg, durante 14 dias) sobre o conteúdo espinhal de 5-HT (painel B) ou seu metabólito 5-HIAA (painel C). A metabolização de 5-HT, estimada pelo cálculo da razão [5-HIAA] / [5-HT] é mostrada no painel D. Os dados representam média ± EPM, com n = 6-11 por grupo. VF: von Frey eletrônico; STZ: estreptozotocina; HPLC: cromatografia líquida de alta performance; 5-HT: serotonina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxi indol acético. # indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo normoglicêmico tratado com veículo (VEI + VEI). * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo diabético tratado com veículo (STZ + VEI). ANOVA de uma via seguida de *post hoc* de Bonferroni (painéis B, C e D).

4.7 TRATAMENTO REPETIDO COM CBD NÃO EXERCE ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE GLICOSE E NO PESO CORPORAL DE ANIMAIS DIABÉTICOS

O tratamento crônico com CBD durante 14 dias (doses de CBD 0,1, 0,3 ou 3 mg/Kg) não modificou de forma significativa os níveis séricos de glicose ou o peso corporal dos animais diabéticos (TABELA 1) quando comparados ao grupo de animais diabéticos tratados apenas com veículo (VEI).

TABELA 1 – AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLICOSE SANGUÍNEA E PESO CORPORAL DE ANIMAIS DIABÉTICOS TRATADOS REPETIDAMENTE COM CBD.

Tratamento	Tempo (dias em relação a confirmação do diabetes)	Níveis de glicose (mg/dL)	Peso corporal (g)
VEI	Dia 0	483,9 ± 38,50	196,4 ± 2,878
	Dia 14	n.d.	204,4 ± 5,615
	Dia 21	n.d.	207,1 ± 6,365
	Dia 28	472,1 ± 37,26	209,4 ± 6,924
CBD 0,1 mg/Kg	Dia 0	537,8 ± 12,19	202,6 ± 1,194
	Dia 14	n.d.	188,2 ± 5,316
	Dia 21	n.d.	195,3 ± 4,872
	Dia 28	482,8 ± 27,12	196,5 ± 6,430
CBD 0,3 mg/Kg	Dia 0	483,7 ± 18,82	199,8 ± 3,321
	Dia 14	n.d.	192,5 ± 5,136
	Dia 21	n.d.	196,8 ± 4,916
	Dia 28	506,2 ± 18,27	195,6 ± 6,108
CBD 3 mg/Kg	Dia 0	498,6 ± 18,92	194,7 ± 2,497
	Dia 14	n.d.	192,1 ± 6,198
	Dia 21	n.d.	198,3 ± 6,178
	Dia 28	494,4 ± 17,63	197,2 ± 6,179

NOTA – Os níveis de glicose de animais diabéticos foram avaliados no dia 0 (dia de confirmação do diabetes) e no dia 28 após a confirmação do diabetes. O peso corporal de animais diabéticos foi mensurado também no dia 0 e nos dias 14, 21 e 28 após a confirmação do diabetes. É importante ressaltar que o tratamento com CBD ou VEI foi iniciado no dia 14, após confirmação

inicial do diabetes, e perdurou por 14 dias. Os dados representam média ± EPM, com n = 9-11 por grupo. * indica $p < 0,05$ quando comparado ao grupo diabético no dia 0. # indica $p < 0,05$ quando comparado aos grupo VEI no dia 28. Test t de student (glicose) e ANOVA de uma via seguida de *post hoc* de Bonferroni (glicose e peso corporal).

4.8 RESUMO DOS RESULTADOS

TABELA 2 – DESENVOLVIMENTO DE ALODINIA MECÂNICA, ALTERAÇÕES EM PERFORMANCE LOCOMOTORA E CONTEÚDO ESPINHAL DE 5-HT E 5-HIAA APÓS STZ, E INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS

Tratamentos	**Alodinia mecânica**			**Performance Locomotora**	**[5-HT]**	**[5-HIAA]**	**[5-HT]/[5-HIAA]**
	14 dias	21 dias	28 dias	28 dias	28 dias	28 dias	28 dias
STZ 60 mg/Kg	+	+	+	-	∨	< >	∧
Agudo CBD 0,1 mg/Kg	n.a.	n.a.	< >	-	n.a.	n.a.	n.a.
Agudo CBD 0,3 mg/Kg	n.a.	n.a.	∨	-	n.a.	n.a.	n.a.
Agudo CBD 3 mg/Kg	n.a.	n.a.	∨	-	n.a.	n.a.	n.a.
Agudo AM251 + CBD 3 mg/Kg	n.a.	n.a.	∨	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Agudo AM630 + CBD 3 mg/Kg	n.a.	n.a.	∨	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Agudo STRYCH + CBD 3 mg/Kg	n.a.	n.a.	∨	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Agudo MTS + CBD 3 mg/Kg	n.a.	n.a.	∨	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Agudo WAY + CBD 3 mg/Kg	n.a.	n.a.	< >	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Crônico CBD 0,1 mg/Kg	n.a.	< >	< >	n.a.	∨	< >	∧
Crônico CBD 0,3 mg/Kg	n.a.	∨	∨	n.a.	∧	< >	∨
Crônico CBD 3 mg/Kg	n.a.	∨	∨	n.a.	∨	∧	∧

NOTA - Os símbolos + e – indicam desenvolveu e não desenvolveu, respectivamente. Os símbolos ∧, ∨, < >, e n.a. indicam aumento, redução, sem alteração e não avaliado, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

A principal contribuição do presente estudo é o importante efeito antialodínico exercido pelo tratamento com CBD em um modelo de dor neuropática induzida pelo diabetes em ratos, sem que a performance locomotora fosse alterada por esse mesmo tratamento. Além disso, o efeito antialodínico agudo do CBD não parece ser dependente da ativação de receptores canabinoides ou receptores de glicina, mas sim de receptores 5-HT_{1A}. De forma interessante, para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que demonstrou um aumento nos níveis de 5-HT no cordão espinhal após o tratamento repetido com CBD e seu efeito antinociceptivo agudo nesse tipo de dor neuropática em ratos. Considerando o perfil insatisfatório dos tratamentos disponíveis para a neuropatia diabética dolorosa, canabinoides tem sido estudados de forma extensiva em modelos de dor inflamatória e neuropática, representando uma alternativa promissora para o tratamento de dores refratárias às abordagens farmacológicas disponíveis atualmente.

A efetividade de canabinoides sobre a hiperalgesia química em animais diabéticos já foi demonstrada por estudos prévios do nosso grupo. Schreiber e colaboradores (2012) mostraram que a injeção local de endocanabinoides como a anandamida (AEA) foi capaz de produzir uma redução significativa de comportamentos nociceptivos induzidos pela injeção de formalina na pata de animais diabéticos (SCHREIBER *et al.*, 2012). A capacidade de outro endocanabinoide além da AEA, o 2-araquidonilglicerol (2-AG), em inibir a resposta nociceptiva no teste da formalina também foi demonstrada em animais normoglicêmicos (GUINDON *et al.*, 2006; GUINDON *et al.*, 2007). Em um modelo de dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo ciático, o CBD sozinho e em combinação com THC produziu um efeito antialodínico aos estímulos mecânico e térmico ao frio (CASEY *et al.*, 2017). O mesmo efeito de combinação dos dois compostos foi previamente descrito em um modelo de neuropatia periférica induzida por quimioterápico em camundongos (KING *et al.*, 2017). No presente estudo, nós determinamos que o tratamento com CBD nas doses de 0,3 e 3 mg/kg atenuou de forma significativa a alodinia mecânica em ratos com diabetes induzido por STZ. O efeito antinociceptivo do CBD não foi

sustentado, com pico na primeira hora após a injeção, com efeito remanescente na segunda hora, e ausente na terceira hora após tratamento.

Estudos investigando a farmacocinética do CBD já mostraram que sua concentração plasmática em humanos atinge um pico por volta de 1-2 horas após administração por via oral (AGURELL *et al.*, 1981). Da mesma forma, um estudo utilizando ratos *Wistar* mostrou que as concentrações de CBD no cérebro e plasma também atingem um pico no mesmo intervalo de tempo citado, após administração oral e subcutânea (HLOŽEK *et al.*, 2017). Curiosamente, as drogas recomendadas para o tratamento da dor neuropática como duloxetina, pregabalina e amitriptilina exibem perfis de efeito antinociceptivo similar ao encontrado com o tratamento com CBD em animais diabéticos com indução feita por STZ, sendo efetivos até 2 horas após injeção (TRIPATHI *et al.*, 2016). O efeito antinociceptivo do CBD não parece estar relacionado a um déficit locomotor, já que o tratamento com CBD (todas as doses testadas) não alterou o número de cruzamentos no teste de campo aberto. De forma interessante, embora o CBD e THC mostrarem efeitos benéficos na inibição da dor neuropática, apena o THC tem sido associado a efeitos adversos deletérios, como incoordenação motora, catalepsia e sedação (CASEY *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, mesmo o estado diabético não alterou significativamente o parâmetro locomotor, contrastando estudos prévios que observaram uma redução na atividade locomotora em animais diabéticos (HAIDER *et al.*, 2013; REDIVO *et al.*, 2016). Esses dados aparentemente contrastantes podem estar relacionados ao tempo de estabelecimento do diabetes, por exemplo, animais diabéticos com indução feita por STZ tendem a exibir uma redução na atividade locomotora dependente do tempo após a indução. No entanto, é importante mencionar que dados do nosso grupo mostram que animais diabéticos apresentam um comportamento do tipo ansioso e do tipo depressivo mais expressivo (GAMBETA *et al.*, 2017; SIBA *et al.*, 2017). Assim, essa redução na atividade locomotora pode ser relacionada preferencialmente com a redução na atividade exploratória ao invés de representar um déficit locomotor.

No geral, o CBD exerce seus efeito terapêuticos em condições patológicas devido ao seu vasto espectro de alvos moleculares. Embora os receptores CB_1 e CB_2 não pareçam ser diretamente ativados por esse

fitocanabinoide, estudos tem reportado que o CBD pode indiretamente induzir a ativação de receptores CB_1 e CB_2 através da inibição da amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e redução da recaptação de AEA, aumentando o tônus desse endocanabinoide (WATANABE *et al.*, 1998; LEWEKE *et al.*, 2012; MCPARTLAND *et al.*, 2015). Em estudos prévios, o CBD mostrou aliviar as manifestações dolorosas em diferentes modelos de dor neuropática, um efeito não mediado por receptores canabinoides. No trabalho de Ward e colaboradores (2014) o pré-tratamento por via intraperitoneal com antagonistas CB_1 (SR141716) e CB_2 (SR144528) não alterou o efeito preventivo de CBD no desenvolvimento de alodinia mecânica induzida pela injeção do quimioterápico paclitaxel. Da mesma forma, no trabalho de Casey e colaboradores (2017), o pré-tratamento por via subcutânea com antagonistas CB_1 (AM281) e CB_2 (AM630) não bloqueou o efeito do CBD em reduzir a alodinia mecânica em camundongos com contrição do nervo ciático. O presente estudo mostrou que o efeito antialodínico do CBD em animais diabéticos não foi bloqueado pelo pré-tratamento com os antagonistas AM251 e AM630, o que corrobora estudos em outros modelos de dor neuropática. Além disso, nenhum dos antagonistas sozinho exacerbou a sensibilidade mecânica em animais diabéticos (WARD *et al.*, 2014; CASEY *et al.*, 2017).

Apesar de a ativação de receptores CB_1 por agonistas exercer efeitos benéficos na neuropatia diabética, como previamente evidenciado pelo nosso grupo (SCHREIBER *et al.*, 2012), muitos autores já pontuaram um papel importante desse receptor no desenvolvimento de disfunções no diabetes (HORVÁTH *et al.*, 2012) como o aumento na concentração de receptores CB_1 em tecido renal de animais diabéticos e a implicação desse receptor em complicações cardiovasculares (RAJESH *et al.*, 2012). Além disso, uma redução da expressão desse receptor pode contribuir para o processo neurodegenerativo observado na neuropatia diabética (ZHANG *et al.*, 2007). Da mesma forma que o modelo de diabetes induzido por STZ já mostrou induzir uma redução na expressão de receptores CB_2 no gânglio da raiz dorsal, enquanto um aumento foi encontrado no cordão espinhal de camundongos diabéticos (CASTANY *et al.*, 2016). A ativação desses receptores tem um papel importante tanto no processamento nociceptivo, quanto na resolução de estados de dor, o que

sugere um papel modulatório e não somente analgésico (WOODHAMS *et al.*, 2015).

Receptores de glicina, que fazem parte da transmissão inibitória rápida coordenada pela própria glicina, tem sido descritos como alvos do CBD. Nesse sentido, estudos mostram que o CBD modula alostericamente de forma positiva mais de um tipo de receptor de glicina (AHRENS *et al.*, 2009; XIONG *et al.*, 2012). Estudos mostraram que atuando em receptores de glicina, o CBD produziu um efeito analgésico em modelos tanto de dor inflamatória, quanto de dor neuropática. Esse efeito foi atribuído a interação do CBD com um segmento S296 em um dos domínios transmembrana de receptores α3 de glicina. O mesmo segmento foi previamente descrito como um sítio de ligação para o efeito analgésico do THC através da potenciação de receptores α1 e α3 de glicina (XIONG *et al.*, 2011; XIONG *et al.*, 2012). Nossos resultados mostram que a injeção intratecal de estricnina, um antagonista competitivo de receptores de glicina, 10 min antes do tratamento com CBD (3 mg/Kg) não alterou o efeito antialodínico sobre a alodinia mecânica em ratos diabéticos. Além disso, o tratamento com antagonista de receptores de glicina sozinho não alterou a sensibilidade mecânica de animais diabéticos. Curiosamente, o conteúdo espinhal de glicina já foi reportado como reduzido em animais diabéticos induzidos por STZ. Da mesma forma, foi observado uma redução significativa na frequência de correntes pós-sinápticas em miniatura mediadas por glicina em neurônios do corno dorsal de animais diabéticos 28 dias após a indução do diabetes (CHIU *et al.*, 2016). Juntos, esses resultados mostram que o estado diabético pode danificar o controle inibitório feito por glicina no cordão espinhal e isso pode contribuir para a ausência de envolvimento dos receptores de glicina no efeito do CBD na dor neuropática diabética.

O CBD tem mostrado efeitos terapêuticos em distúrbios neurológicos, mostrando efeitos antidepressivo, ansiolítico e efeitos positivos em déficit cognitivo. O receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, descrito como outro alvo molecular para o CBD, parece estar envolvido de forma importante nestes efeitos uma vez que muitos deles são bloqueados por antagonistas 5-HT_{1A} (CAMPOS E GUIMARÃES, 2008; EL-ALFY *et al.*, 2010; LINGE *et al.*, 2016). Estudos *in vitro* já reportaram que o CBD pode exercer ação agonista em receptores 5-HT_{1A}, o que foi evidenciado através do aumento da ligação GTPγS no sistema desse

receptor que é acoplado a proteína G, e isso ocorre da mesma forma que é desencadeada pela ligação de 5-HT. O CBD também foi capaz de reduzir a as concetrações de AMP cíclico (RUSSO *et al.*, 2005). Um estudo de Banerjee e colaboradores também já mostrou que o CBD, e também outros canabinoides, podem atuar na inibição da recaptação de neurotransmissores como a 5-HT no cérebro de ratos (BANERJEE *et al.*, 1975). Essas ações do CBD podem ter efeito direto sobre a facilitação serotonérgica e transmissão envolvendo esses receptores (CAMPOS *et al.*, 2013). Considerando o CBD e sua ação agonista em receptores 5-HT_{1A} e de inibição da recaptação de 5-HT, um estudo revelou um efeito neuroprotetor do CBD na alodinia mecânica, um efeito supostamente mediado pela ativação de receptores 5-HT_{1A}, já que o pré-tratamento com um antagonista 5-HT_{1A} (WAY100635) bloqueou o efeito neuroprotetor do CBD nesse modelo de dor neuropática (WARD *et al.*, 2014). Nosso estudo mostra que um antagonista não seletivo de receptores de serotonina, metisergida (30 µg/20 µL), injetado por via i.t. 10 min antes do tratamento com CBD (3 mg/Kg) não bloqueou o efeito antialodínico do CBD em animais diabéticos. No entanto, esse efeito foi bloqueado quando um antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, o WAY100135 (3 µg/20 µL), foi injetado por via i.t. 10 min antes do tratamento com CBD. Esses resultados sugerem um potencial envolvimento direto do receptor 5-HT_{1A} no efeito antialodínico do CBD na dor neuropática diabética. Esses dados de certa forma contraditórios com relação ao efeitos dos dois agonistas podem ser relacionados a capacidade da metisergida em antagonizar e também atuar como agonista de alguns subtipos de receptores 5-HT_1, com menor afinidade comparada a receptores 5-HT_2, que foram atribuídos ao efeito desse antagonista na migrânea (SILBERSTEIN, 1998; DAHLÖF E MAASSEN VAN DEN BRINK, 2012).

De acordo com outros estudos, receptores 5-HT_{1A}, que mostram um perfil antinociceptivo, podem ser encontrados em diferentes regiões do sistema nervoso de ratos, desde o núcleo da rafe e hipocampo até o corno dorsal da medula (MARLIER *et al.*, 1991; LANFUMEY E HAMON, 2004). Os receptores 5-HT_{1A} são receptores acoplados a proteína G, e à nível supraespinhal podem exercer um papel regulatório no controle da liberação de 5-HT para áreas de projeção como o cordão espinhal. Em nível supraespinhal esses receptores estão localizados na membrana pré-sináptica e exercem função de autoreceptor,

enquanto que no cordão espinhal esses receptores estão localizados na membrana pós-sináptica e fazem parte da via descendente serotonérgica. A exposição a agonistas a nível supraespinhal leva a um controle inibitório reduzido da liberação de 5-HT, ou seja, um aumento da liberação de 5-HT, aumentando a sinalização em receptores pós-sinápticos, o que contribui para o efeito antinociceptivo de agonistas 5-HT_{1A} (COLPAERT *et al.*, 2004; LANFUMEY E HAMON, 2004; COLPAERT *et al.*, 2006; BARDIN, 2011). De fato, agonistas foram capazes de induzir efeito antinociceptivo após a injeção de formalina apenas em camundongos *knockout* que tinham autoreceptores altamente dessensibilizados (FABRE *et al.*, 2000). A respeito dos efeitos em modelos de dor crônica, a infusão subcutânea por 14 dias de agonistas 5-HT_{1A} foi capaz de inibir ambos os fenômenos de hiperalgesia e alodinia (COLPAERT *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2003). Paradoxalmente, a injeção intratecal de agonistas 5-HT_{1A} já mostrou reduzir a analgesia feita pelo tratamento sistêmico com morfina, enquanto que o antagonista 5-HT_{1A} (WAY100635) potencializou a analgesia a morfina (BARDIN E COLPAERT, 2004). Em conjunto, esses dados evidenciam a participação importante e complexa de receptores 5-HT_{1A} no circuito de modulação descendente da dor.

No próximo conjunto de experimentos, procuramos investigar um possível efeito cumulativo do CBD após tratamento repetido. De forma interessante, o tratamento diário com CBD (0,3 e 3 mg/Kg, i.p.) durante 14 dias (começando 14 dias após a indução do diabetes) induziu uma atenuação sustentada da alodinia mecânica em ratos diabéticos. O limiar mecânico desses animais diabéticos tratados diariamente com CBD não foi diferente do grupo de animais normoglicêmicos um dia após a última injeção de CBD. Esse é também uma das maiores contribuições do nosso estudo, considerando que o CBD produziu um reestabelecimento do limiar mecânico uma vez reduzido pela injeção de STZ.

O tratamento repetido com CBD (0,1, 0,3 ou 3 mg/Kg) não alterou o peso corporal e os níveis séricos de glicose em animais diabéticos, quando em comparação aos animais diabéticos que foram tratados com veiculo. Esses dados estão de acordo com estudos recentes que mostram que o tratamento com CBD não altera padrões como ganho de peso e ingesta de alimentos em ratos (WIERUCKA-RYBAK *et al.*, 2014; OSBORNE *et al.*, 2017). O estudo de

Jadoon e colaboradores (2016) indicou que o tratamento com CBD não alterou os níveis de glicose em pacientes com diabetes tipo 2. No entanto, em um estudo utilizando um regioisômero do CBD, com efeito vasodilatador em um modelo de cardiopatia em ratos com diabetes induzido por STZ, foi demonstrado que este composto não alterou significativamente os níveis de glicose sanguínea (MATOUK *et al.*, 2018). Além disso, um estudo anterior do nosso grupo mostrou que o tratamento agudo sistêmico com AEA não altera os níveis glicêmicos em animais com diabetes induzido por STZ (DE MORAIS *et al.*, 2016). Esses dados sugerem que o tratamento com CBD induz um efeito antialodínico na neuropatia diabética, sem que padrões característicos do estado diabético sejam alterados.

A analgesia induzida pelo tratamento sistêmico com CBD parece envolver vias descendentes, considerando que estudos reportaram que após lesão do cordão espinhal ou funículo dorsolateral, a analgesia produzida por CBD foi significativamente reduzida (LICHTMAN E MARTIN, 1991; SEYREK *et al.*, 2010). As vias serotonérgica e noradrenérgica são componentes importantes do mecanismo descendente modulatório da dor. Terminais serotonérgicos e noradrenérgicos estão localizados em áreas importantes do corno dorsal e fazem sinapse com interneurônios, neurônios de projeção e aferentes primários. Ativação desses sítios por estimulação elétrica geralmente elícita analgesia (YOSHIMURA E FURUE, 2006). Corroborando um envolvimento das vias descendentes modulatórias na neuropatia periférica diabética, antidepressivos que atuam na inibição da recaptação de 5-HT e NE são utilizados como primeira linha no tratamento dessa condição (SCHREIBER *et al.*, 2015). Assim, como foi observado nesse estudo, um papel importante de receptores serotonérgicos no efeito antialodínico agudo do CBD, o próximo conjunto de experimentos visou quantificar níveis de 5-TH e seu metabólito 5-HIAA no cordão espinhal de animais tratados repetidamente durante 14 dias com CBD. Nossos resultados pontuam uma redução significativa no conteúdo de 5-HT em animais diabéticos, o que pode estar associado com o desenvolvimento de alodinia mecânica. Estudos anteriores, no entanto, reportaram resultados inconsistentes a respeito dos níveis de 5-HT e de seus receptores no sistema nervoso de ratos diabéticos tratados com STZ. Sandrini e colaboradores (1997), mostraram que animais diabéticos desenvolvem uma redução significativa no conteúdo de 5-HT no plasma, além do córtex e tronco cerebral, quando avaliados 15 e 30 dias após o

tratamento com STZ. Esse estudo também mostrou que a densidade de receptores 5-HT_{1A} foi aumentada no córtex e tronco cerebral. O trabalho de Shimazoe e colaboradores (2000) mostrou que o tratamento com STZ não alterou o conteúdo de 5-HT em tecidos de regiões do cérebro, apesar de seu metabólito (5-HIAA) ter sido reduzido em regiões como córtex, hipotálamo e hipocampo. Morgado e colaboradores (2011) mostraram que animais com diabetes induzido por STZ desenvolveram hiperalgesia mecânica, níveis aumentados de 5-HT a nível espinhal avaliado através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e um aumento de 5-HT em neurônios do RVM, evidenciado pela expressão da enzima triptofano hidroxilase, avaliados 4 semanas após a indução do diabetes (SANDRINI *et al.,* 1997; SHIMAZOE *et al.,* 2000; MORGADO *et al.,* 2011).

Considerando o efeito do CBD sobre o conteúdo de 5-HT no cordão espinhal, nosso estudo observou que apenas animais tratados com CBD na dose de 0,3 mg/kg tiveram um aumento significativo nos níveis de 5-HT, e consequentemente uma razão [5-HIAA] / [5-HT] reduzida, quando comparados aos animais diabéticos tratados com veículo. De fato, canabinoides já mostraram produzir um aumento nos níveis de 5-HT no sistema nervoso de ratos (AVRAHAM *et al.*, 2011). O THC, por exemplo, mostrou induzir um aumento no conteúdo de 5-HT após injeção sistêmica e intracerebral (HOLTZMAN *et al.*, 1969; EGASHIRA *et al.*, 2002). Esse resultado é de alguma forma surpreendente já que o tratamento com CBD nas doses de 0,3 e 3 mg/Kg induziu um efeito antialodínico contínuo de igual significância. Portanto, é possível inferir que o efeito antinociceptivo do CBD não parece ser totalmente dependente da restauração dos níveis de 5-HT, mas de alguma forma envolve a ativação de receptores 5-HT_{1A}. Com relação aos níveis de 5-HIAA no cordão espinhal, nenhuma diferença foi observada entre os animais normoglicêmicos e animais diabéticos tratados com veículo. No entanto, animais diabéticos tratados com a maior dose de CBD (3 mg/Kg) exibiram um aumento significativo desse metabólito, sugerindo um aumento no metabolismo, uma hipótese corroborada pelo aumento da razão [5-HIAA] / [5-HT] nesse mesmo grupo experimental (FIGURA 6, painéis C e D). Isso pode explicar o porque de nenhum aumento significativo dessa monoamina ter sido detectado em amostras do cordão espinhal desse grupo experimental. Os mecanismos envolvidos no efeito

antinociceptivo da maior dose de CBD (3 mg/Kg) após tratamento repetido continuam não esclarecidos. No entanto, a diversidade de alvos moleculares ativadas por esse fitocanabinoide e a possibilidade de alterações neuroadaptativas após o tratamento repetido, nos levam a acreditar que de alguma forma os mecanismo envolvidos na analgesia associada a esta tratamento podem diferir em relação as doses consideradas.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, nossos resultados demonstraram pela primeira vez que o CBD exerce ambos efeitos agudo e cumulativo em um modelo de dor neuropática induzida pelo diabetes em ratos. Além disso, o efeito agudo desse constituinte não psicoativo da *Cannabis* na dor neuropática diabética não induziu déficit locomotor, e não parece ser mediado por uma ação direta em receptores canabinoides ou receptores de glicina. Em contraste, os resultados desse estudo demonstram especificamente que os receptores 5-HT_{1A} estão potencialmente envolvidos no efeito do CBD, já que a injeção de um antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, WAY100135, foi capaz de bloquear o efeito antialodínico do CBD. Ademais, animais diabéticos mostraram uma redução no conteúdo espinhal de 5-HT, o que foi significativamente restabelecido por CBD. Juntos, nossos dados corroboram a indicação do CBD como um alternativa na atenuação da dor neuropática diabética, potencialmente através da ativação do sistema serotonérgico.

REFERÊNCIAS

AGURELL, S. et al. Interactions of delta 1-tetrahydrocannabinol with cannabinol and cannabidiol following oral administration in man. Assay of cannabinol and cannabidiol by mass fragmentography. **Experientia,** v. 37, n. 10, p. 1090-2, Oct 1981. ISSN 0014-4754. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6273208 >.

AHRENS, J. et al. The nonpsychotropic cannabinoid cannabidiol modulates and directly activates alpha-1 and alpha-1-Beta glycine receptor function. **Pharmacology,** v. 83, n. 4, p. 217-22, 2009. ISSN 1423-0313. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204413 >.

AIZPURUA-OLAIZOLA, O. et al. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. **Drug Discov Today,** v. 22, n. 1, p. 105-110, Jan 2017. ISSN 1878-5832. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27554802 >.

ANDRE, C. M.; HAUSMAN, J. F.; GUERRIERO, G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. **Front Plant Sci,** v. 7, p. 19, 2016. ISSN 1664-462X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26870049 >.

AVRAHAM, Y. et al. Cannabidiol improves brain and liver function in a fulminant hepatic failure-induced model of hepatic encephalopathy in mice. **Br J Pharmacol,** v. 162, n. 7, p. 1650-8, Apr 2011. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21182490 >.

BANERJEE, S. P.; SNYDER, S. H.; MECHOULAM, R. Cannabinoids: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 194, n. 1, p. 74-81, Jul 1975. ISSN 0022-3565. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/168349 >.

BARDIN, L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. **Behav Pharmacol,** v. 22, n. 5-6, p. 390-404, Sep 2011. ISSN 1473-5849. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21808193 >.

BARDIN, L.; COLPAERT, F. C. Role of spinal 5-HT(1A) receptors in morphine analgesia and tolerance in rats. **Eur J Pain,** v. 8, n. 3, p. 253-61, Jun 2004. ISSN 1090-3801. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109976 >.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell,** v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 2009. ISSN 1097-4172. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837031 >.

BISOGNO, T. et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **Br J Pharmacol,** v. 134, n. 4, p. 845-52, Oct 2001. ISSN 0007-1188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606325 >.

BOOZ, G. W. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. **Free Radic Biol Med,** v. 51, n. 5, p. 1054-61, Sep 2011. ISSN 1873-4596. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238581 >.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurg Clin N Am,** v. 25, n. 4, p. 629-38, Oct 2014. ISSN 1558-1349. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25240653 >.

CAMPOS, A. C. et al. Cannabidiol increases survival and promotes rescue of cognitive function in a murine model of cerebral malaria. **Neuroscience,** v. 289, p. 166-80, Mar 2015. ISSN 1873-7544. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25595981 >.

CAMPOS, A. C. et al. Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. **Psychopharmacology (Berl),** v. 226, n. 1, p. 13-24, Mar 2013. ISSN 1432-2072. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007604 >.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology (Berl),** v. 199, n. 2, p. 223-30, Aug 2008. ISSN 0033-3158. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18446323 >.

CARLINI, E. A. et al. Letter: Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. **J Pharm Pharmacol,** v. 25, n. 8, p. 664-5, Aug 1973. ISSN 0022-3573. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4148442 >.

CASEY, S. L.; ATWAL, N.; VAUGHAN, C. W. Cannabis constituent synergy in a mouse neuropathic pain model. **Pain**, Sep 2017. ISSN 1872-6623. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28885457 >.

CASTANY, S. et al. The role of carbon monoxide on the anti-nociceptive effects and expression of cannabinoid 2 receptors during painful diabetic neuropathy in mice. **Psychopharmacology (Berl),** v. 233, n. 11, p. 2209-19, 06 2016. ISSN 1432-2072. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27020787 >.

CHIU, Y. C. et al. Reduction of spinal glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain. **Neurosci Lett,** v. 611, p. 88-93, Jan 2016. ISSN 1872-7972. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26598022 >.

COLPAERT, F. C. et al. High-efficacy 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation counteracts opioid hyperallodynia and affective conditioning. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 316, n. 2, p. 892-9, Feb 2006. ISSN 0022-3565. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254131 >.

COLPAERT, F. C. et al. Large-amplitude 5-HT1A receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. **Neuropharmacology,** v. 43, n. 6, p. 945-58, Nov 2002. ISSN 0028-3908. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423664 >.

COLPAERT, F. C. et al. High-efficacy 5-HT1A receptor activation causes a curative-like action on allodynia in rats with spinal cord injury. **Eur J Pharmacol,** v. 497, n. 1, p. 29-33, Aug 2004. ISSN 0014-2999. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321732 >.

DA SILVA DIAS, I. C. et al. Indoleamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes. **Mol Neurobiol,** v. 53, n. 10, p. 6997-7009, Dec 2016. ISSN 1559-1182. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26671617 >.

DAHLÖF, C.; MAASSEN VAN DEN BRINK, A. Dihydroergotamine, ergotamine, methysergide and sumatriptan - basic science in relation to migraine treatment. **Headache,** v. 52, n. 4, p. 707-14, Apr 2012. ISSN 1526-4610. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22444161 >.

DE MORAIS, H. et al. Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: Role of CB1 receptors. **Eur Neuropsychopharmacol,** v. 26, n. 10, p. 1590-600, Oct 2016. ISSN 1873-7862. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27544303 >.

DE PETROCELLIS, L. et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. **Br J Pharmacol,** v. 163, n. 7, p. 1479-94, Aug 2011. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21175579 >.

DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol,** v. 34, n. 5, p. 605-13, Nov 1988. ISSN 0026-895X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2848184 >.

DI MARZO, V. et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature,** v. 372, n. 6507, p. 686-91, Dec 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7990962 >.

EGASHIRA, N. et al. Intracerebral microinjections of delta 9-tetrahydrocannabinol: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats. **Brain Res,** v. 952, n. 2, p. 239-45, Oct 2002. ISSN 0006-8993. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12376185 >.

EL-ALFY, A. T. et al. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from Cannabis sativa L. **Pharmacol Biochem Behav,** v. 95, n. 4, p. 434-42, Jun 2010. ISSN 1873-5177. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20332000 >.

EL-REMESSY, A. B. et al. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. **Am J Pathol,** v. 168, n. 1, p. 235-44, Jan 2006. ISSN 0002-9440. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16400026 >.

EL-REMESSY, A. B. et al. Cannabidiol protects retinal neurons by preserving glutamine synthetase activity in diabetes. **Mol Vis,** v. 16, p. 1487-95, Aug 2010. ISSN 1090-0535. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20806080 >.

ELIKKOTTIL, J. et al. The analgesic potential of cannabinoids. **J Opioid Manag,** v. 5, n. 6, p. 341-57, 2009 Nov-Dec 2009. ISSN 1551-7489. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20073408 >.

ESPOSITO, G. et al. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. **Br J Pharmacol,** v. 151, n. 8, p. 1272-9, Aug 2007. ISSN 0007-1188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17592514 >.

FABRE, V. et al. Altered expression and functions of serotonin 5-HT1A and 5-HT1B receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter. **Eur J Neurosci,** v. 12, n. 7, p. 2299-310, Jul 2000. ISSN 0953-816X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10947809 >.

FORNASARI, D. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. **Pain Ther,** v. 6, n. Suppl 1, p. 25-33, Dec 2017. ISSN 2193-8237. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29178034 >.

FREUNDT-REVILLA, J. et al. Spatial distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1) in normal canine central and peripheral nervous system. **PLoS One,** v. 12, n. 7, p. e0181064, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28700706 >.

GAMBETA, E. et al. A serotonergic deficit in the dorsal periaqueductal gray matter may underpin enhanced panic-like behavior in diabetic rats. **Behav Pharmacol,** v. 28, n. 7, p. 558-564, Oct 2017. ISSN 1473-5849. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28799955 >.

GANDHI, R. A.; SELVARAJAH, D. Understanding and treating painful diabetic neuropathy: time for a paradigm shift. **Diabet Med,** v. 32, n. 6, p. 771-7, Jun 2015. ISSN 1464-5491. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25818649 >.

GARCÍA-ARENCIBIA, M. et al. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. **Brain Res,** v. 1134, n. 1, p. 162-70, Feb 2007. ISSN 0006-8993. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196181 >.

GENARO, K. et al. Cannabidiol Is a Potential Therapeutic for the Affective-Motivational Dimension of Incision Pain in Rats. **Front Pharmacol,** v. 8, p. 391, 2017. ISSN 1663-9812. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28680401 >.

GUINDON, J.; DESROCHES, J.; BEAULIEU, P. The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB2 receptors. **Br J Pharmacol,** v. 150, n. 6, p. 693-701, Mar 2007. ISSN 0007-1188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179944 >.

GUINDON, J. et al. Synergistic antinociceptive effects of anandamide, an endocannabinoid, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peripheral tissue: a role for endogenous fatty-acid ethanolamides? **Eur J Pharmacol,** v. 550, n. 1-3, p. 68-77, Nov 2006. ISSN 0014-2999. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17027744 >.

HAIDER, S. et al. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. **Acta Neurol Belg,** v. 113, n. 1, p. 35-41, Mar 2013. ISSN 2240-2993. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878975 >.

HALEY, N.; RICHARDS, M. Diabetes: the past, the present, and the challenging future. **MLO Med Lab Obs,** v. 46, n. 5, p. 8, 10, 13-4, May 2014. ISSN 0580-7247. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24902374 >.

HARRIS, H. M. et al. Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Cisplatin-Induced Neuropathy in Mice. **Planta Med**, May 2016. ISSN 1439-0221. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27214593 >.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. **Eur Neuropsychopharmacol,** v. 15, n. 6, p. 593-9, Dec 2005. ISSN 0924-977X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916883 >.

HLOŽEK, T. et al. Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. **Eur Neuropsychopharmacol,** v. 27, n. 12, p. 1223-1237, 12 2017. ISSN 1873-7862. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29129557 >.

HOD, M. et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on gestational diabetes mellitus: A pragmatic guide for diagnosis, management, and care. **Int J Gynaecol Obstet,** v. 131 Suppl 3, p. S173-211, Oct 2015. ISSN 1879-3479. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26433807 >.

HOLTZMAN, D. et al. 1-delta9-tetrahydrocannabinol: neurochemical and behavioral effects in the mouse. **Science,** v. 163, n. 3874, p. 1464-7, Mar 1969. ISSN 0036-8075. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5773112 >.

HORVÁTH, B. et al. The endocannabinoid system and plant-derived cannabinoids in diabetes and diabetic complications. **Am J Pathol,** v. 180, n. 2, p. 432-42, Feb 2012. ISSN 1525-2191. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155112 >.

HOWLETT, A. C. The CB1 cannabinoid receptor in the brain. **Neurobiol Dis,** v. 5, n. 6 Pt B, p. 405-16, Dec 1998. ISSN 0969-9961. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9974174 >.
IANNOTTI, F. A.; DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. **Prog Lipid Res,** v. 62, p. 107-28, 04 2016. ISSN 1873-2194. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26965148 >.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, **Diabetes Atlas Executive Summary**, 8th edition, 2015.

IZQUIERDO, I.; ORSINGHER, O. A.; BERARDI, A. C. Effect of cannabidiol and of other cannabis sativa compounds on hippocampal seizure discharges. **Psychopharmacologia,** v. 28, n. 1, p. 95-102, 1973. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4714680 >.

IZZO, A. A. et al. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends Pharmacol Sci,** v. 30, n. 10, p. 515-27, Oct 2009. ISSN 1873-3735. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19729208 >.

JADOON, K. A. et al. Efficacy and Safety of Cannabidiol and Tetrahydrocannabivarin on Glycemic and Lipid Parameters in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel Group Pilot Study. **Diabetes Care,** v. 39, n. 10, p. 1777-86, 10 2016. ISSN 1935-5548. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27573936 >.

KALSO, E.; ALDINGTON, D. J.; MOORE, R. A. Drugs for neuropathic pain. **BMJ,** v. 347, p. f7339, 2013. ISSN 1756-1833. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24355386 >.

KING, K. M. et al. Single and combined effects of Δ(9) -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. **Br J Pharmacol,** v. 174, n. 17, p. 2832-2841, Sep 2017. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28548225 >.

KINGHORN, A. D. E. et al. **Phytocannabinoids : unraveling the complex chemistry and pharmacology of 'Cannabis sativa'**. ISBN 9783319455396 (cased)
9783319455419 (eBook). Disponível em: < 1850-9999 http://link.springer.com/ BLDSS >.

KWON, M. et al. The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. **Pain Pract,** v. 14, n. 7, p. 656-67, Sep 2014. ISSN 1533-2500. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24256177 >.

LANFUMEY, L.; HAMON, M. 5-HT1 receptors. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord,** v. 3, n. 1, p. 1-10, Feb 2004. ISSN 1568-007X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14965240 >.

LEE-KUBLI, C. A. et al. Animal models of diabetes-induced neuropathic pain. **Curr Top Behav Neurosci,** v. 20, p. 147-70, 2014. ISSN 1866-3370. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24510303 >.

LEWEKE, F. M. et al. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Transl Psychiatry,** v. 2, p. e94, Mar 2012. ISSN 2158-3188. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22832859 >.

LICHTMAN, A. H.; MARTIN, B. R. Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 258, n. 2, p. 517-23, Aug 1991. ISSN 0022-3565. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1650831 >.

LINGE, R. et al. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT1A receptors. **Neuropharmacology,** v. 103, p. 16-26, Apr 2016. ISSN 1873-7064. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26711860 >.

MAIONE, S. et al. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 316, n. 3, p. 969-82, Mar 2006. ISSN 0022-3565. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284279 >.

MARLIER, L. et al. Autoradiographic mapping of 5-HT1, 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT2 receptors in the rat spinal cord. **Brain Res,** v. 550, n. 1, p. 15-23, May 1991. ISSN 0006-8993. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1832328 >.

MATOUK, A. I. et al. Abnormal cannabidiol confers cardioprotection in diabetic rats independent of glycemic control. **Eur J Pharmacol,** v. 820, p. 256-264, Feb 2018. ISSN 1879-0712. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29274332 >.

MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature,** v. 346, n. 6284, p. 561-4, Aug 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2165569 >.

MCPARTLAND, J. M. et al. Are cannabidiol and Δ(9) -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. **Br J Pharmacol,** v. 172, n. 3, p. 737-53, Feb 2015. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25257544 >.

MEUTH, S. G.; VILA, C.; DECHANT, K. L. Effect of Sativex on spasticity-associated symptoms in patients with multiple sclerosis. **Expert Rev Neurother,** v. 15, n. 8, p. 909-18, 2015. ISSN 1744-8360. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26166264 >.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol,** v. 66, n. 6, p. 355-474, Apr 2002. ISSN 0301-0082. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034378 >.

MILLAN, M. J.; GIRARDON, S.; BERVOETS, K. 8-OH-DPAT-induced spontaneous tail-flicks in the rat are facilitated by the selective serotonin (5-HT)2C agonist, RO 60-0175: blockade of its actions by the novel 5-HT2C receptor antagonist SB 206,553. **Neuropharmacology,** v. 36, n. 4-5, p. 743-5, 1997 Apr-May 1997. ISSN 0028-3908. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9225301 >.

MORGADO, C. et al. Changes in serotoninergic and noradrenergic descending pain pathways during painful diabetic neuropathy: the preventive action of IGF1. **Neurobiol Dis,** v. 43, n. 1, p. 275-84, Jul 2011. ISSN 1095-953X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515376 >.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature,** v. 365, n. 6441, p. 61-5, Sep 1993. ISSN 0028-0836. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689702 >.

OBROSOVA, I. G. Diabetic painful and insensate neuropathy: pathogenesis and potential treatments. **Neurotherapeutics,** v. 6, n. 4, p. 638-47, Oct 2009. ISSN 1878-7479. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19789069 >.

OLIVERAS, J. L. et al. Opiate antagonist, naloxone, strongly reduces analgesia induced by stimulation of a raphe nucleus (centralis inferior). **Brain Res,** v. 120, n. 2, p. 221-9, Jan 1977. ISSN 0006-8993. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/832121 >.

OSBORNE, A. L. et al. Improved Social Interaction, Recognition and Working Memory with Cannabidiol Treatment in a Prenatal Infection (poly I:C) Rat Model. **Neuropsychopharmacology,** v. 42, n. 7, p. 1447-1457, Jun 2017. ISSN 1740-634X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28230072 >.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest,** v. 120, n. 11, p. 3779-87, Nov 2010. ISSN 1558-8238. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041960 >.

OTTO, M. et al. Pain phenomena and possible mechanisms in patients with painful polyneuropathy. **Pain,** v. 101, n. 1-2, p. 187-92, Jan 2003. ISSN 0304-3959. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507713 >.

PAIN, S. A potted history. **Nature,** v. 525, n. 7570, p. S10-1, Sep 2015. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26398731 >.

PELTIER, A.; GOUTMAN, S. A.; CALLAGHAN, B. C. Painful diabetic neuropathy. **BMJ,** v. 348, p. g1799, 2014. ISSN 1756-1833. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24803311 >.

PEREIRA, F. C. et al. Antinociceptive effects of low-level laser therapy at 3 and 8 j/cm(2) in a rat model of postoperative pain: possible role of endogenous Opioids. **Lasers Surg Med**, Jul 2017. ISSN 1096-9101. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28671718 >.

PERGOLIZZI, J. V. et al. A review of duloxetine 60 mg once-daily dosing for the management of diabetic peripheral neuropathic pain, fibromyalgia, and chronic musculoskeletal pain due to chronic osteoarthritis pain and low back pain. **Pain Pract,** v. 13, n. 3, p. 239-52, Mar 2013. ISSN 1533-2500. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22716295 >.

PERTOVAARA, A. et al. Response properties of neurons in the rostroventromedial medulla of neuropathic rats: attempted modulation of responses by [1DMe]NPYF, a neuropeptide FF analogue. **Neuroscience,** v. 105, n. 2, p. 457-68, 2001. ISSN 0306-4522. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11672611 >.

PETROSINO, S. et al. Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. **Neuropharmacology,** v. 52, n. 2, p. 415-22, Feb 2007. ISSN 0028-3908. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17011598 >.

POP-BUSUI, R. et al. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care,** v. 40, n. 1, p. 136-154, Jan 2017. ISSN 1935-5548. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27999003 >.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci,** v. 25, n. 6, p. 319-25, Jun 2002. ISSN 0166-2236. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086751 >.

RAJESH, M. et al. Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. **Diabetes,** v. 61, n. 3, p. 716-27, Mar 2012. ISSN 1939-327X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315315 >.

REDIVO, D. D. et al. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental

diabetes. **Behav Brain Res,** v. 298, n. Pt B, p. 57-64, Feb 2016. ISSN 1872-7549. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26546881 >.

RIVOT, J. P.; CHIANG, C. Y.; BESSON, J. M. Increase of serotonin metabolism within the dorsal horn of the spinal cord during nucleus raphe magnus stimulation, as revealed by in vivo electrochemical detection. **Brain Res,** v. 238, n. 1, p. 117-26, Apr 1982. ISSN 0006-8993. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6177378 >.

RUSSO, E. B. et al. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. **Neurochem Res,** v. 30, n. 8, p. 1037-43, Aug 2005. ISSN 0364-3190. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258853 >.

SAADÉ, N. E. et al. Brainstem injection of lidocaine releases the descending pain-inhibitory mechanisms in a rat model of mononeuropathy. **Exp Neurol,** v. 237, n. 1, p. 180-90, Sep 2012. ISSN 1090-2430. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22759335 >.

SAITO, Y.; COLLINS, J. G.; IWASAKI, H. Tonic 5-HT modulation of spinal dorsal horn neuron activity evoked by both noxious and non-noxious stimuli: a source of neuronal plasticity. **Pain,** v. 40, n. 2, p. 205-19, Feb 1990. ISSN 0304-3959. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2308766 >.

SANDRINI, M. et al. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the rat brain. **Life Sci,** v. 60, n. 16, p. 1393-7, 1997. ISSN 0024-3205. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096260 >.

SANTIAGO, R. M. et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,** v. 34, n. 6, p. 1104-14, Aug 2010. ISSN 1878-4216. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547199 >.

SCHREIBER, A. K. et al. 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, n. 8, p. 1286-97, Dec 2012. ISSN 1873-7064. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22959964 >.

SCHREIBER, A. K. et al. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. **World J Diabetes,** v. 6, n. 3, p. 432-44, Apr 2015. ISSN 1948-9358. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897354 >.

SERPELL, M. et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group study of THC/CBD spray in peripheral neuropathic pain treatment. **Eur J Pain,** v. 18, n. 7, p. 999-1012, Aug 2014. ISSN 1532-2149. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24420962 >.

SEYREK, M. et al. Systemic cannabinoids produce CB_1 -mediated antinociception by activation of descending serotonergic pathways that act upon spinal 5-HT(7) and 5-HT(2A) receptors. **Eur J Pharmacol,** v. 649, n. 1-3, p. 183-94, Dec 2010. ISSN 1879-0712. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20868676 >.

SHIMAZOE, T. et al. Entrainment function in the suprachiasmatic nucleus of streptozotocin-induced diabetic rats. **Jpn J Pharmacol,** v. 83, n. 4, p. 355-8, Aug 2000. ISSN 0021-5198. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001184 >.

SIBA, I. P. et al. Fish oil prevents rodent anxious states comorbid with diabetes: A putative involvement of nitric oxide modulation. **Behav Brain Res,** v. 326, p. 173-186, May 2017. ISSN 1872-7549. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28284945 >.

SILBERSTEIN, S. D. Methysergide. **Cephalalgia,** v. 18, n. 7, p. 421-35, Sep 1998. ISSN 0333-1024. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9793694 >.

SUMMERS, T. et al. Endocannabinoids Have Opposing Effects On Behavioral Responses To Nociceptive And Non-nociceptive Stimuli. **Sci Rep,** v. 7, n. 1, p. 5793, Jul 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28724917 >.

SUZUKI, R. et al. Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurones following peripheral nerve injury. **Brain Res,** v. 1019, n. 1-2, p. 68-76, Sep 2004. ISSN 0006-8993. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306240 >.

TESFAYE, S.; BOULTON, A. J.; DICKENSON, A. H. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. **Diabetes Care,** v. 36, n. 9, p. 2456-65, Sep 2013. ISSN 1935-5548. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23970715 >.

TODOROVIC, S. M. Painful Diabetic Neuropathy: Prevention or Suppression? **Int Rev Neurobiol,** v. 127, p. 211-25, 2016. ISSN 0074-7742. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27133151 >.

TOTH, C. C. et al. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. **Mol Pain,** v. 6, p. 16, Mar 2010. ISSN 1744-8069. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20236533 >.

TRIPATHI, C. D.; MEHTA, A. K.; YADAV, A. M. Drug combinations in diabetic neuropathic pain: an experimental validation. **J Basic Clin Physiol Pharmacol,** v. 27, n. 6, p. 617-624, Nov 2016. ISSN 2191-0286. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27331307 >.

VINIK, A. I. CLINICAL PRACTICE. Diabetic Sensory and Motor Neuropathy. **N Engl J Med,** v. 374, n. 15, p. 1455-64, Apr 2016. ISSN 1533-4406. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27074068 >.

VOLMER-THOLE, M.; LOBMANN, R. Neuropathy and Diabetic Foot Syndrome. **Int J Mol Sci,** v. 17, n. 6, 2016. ISSN 1422-0067. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27294922 >.

WARD, S. J. et al. Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT(1A) receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. **Br J Pharmacol,** v. 171, n. 3, p. 636-45, Feb 2014. ISSN 1476-5381. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24117398 >.

WARD, S. J. et al. Cannabidiol prevents the development of cold and mechanical allodynia in paclitaxel-treated female C57Bl6 mice. **Anesth Analg,** v. 113, n. 4, p. 947-50, Oct 2011. ISSN 1526-7598. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737705 >.

WATANABE, K. et al. Distribution and characterization of anandamide amidohydrolase in mouse brain and liver. **Life Sci,** v. 62, n. 14, p. 1223-9, 1998. ISSN 0024-3205. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570337 >.

WEI, F.; DUBNER, R.; REN, K. Laminar-selective noradrenergic and serotoninergic modulation includes spinoparabrachial cells after inflammation. **Neuroreport,** v. 10, n. 8, p. 1757-61, Jun 1999. ISSN 0959-4965. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501570 >.

WEI, H.; PERTOVAARA, A. 5-HT(1A) receptors in endogenous regulation of neuropathic hypersensitivity in the rat. **Eur J Pharmacol,** v. 535, n. 1-3, p. 157-65, Mar 2006. ISSN 0014-2999. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16545367 >.

WIERUCKA-RYBAK, M.; WOLAK, M.; BOJANOWSKA, E. The effects of leptin in combination with a cannabinoid receptor 1 antagonist, AM 251, or cannabidiol on food intake and body weight in rats fed a high-fat or a free-choice high sugar diet. **J Physiol Pharmacol,** v. 65, n. 4, p. 487-96, Aug 2014. ISSN 1899-1505. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25179081 >.

WILKERSON, J. L. et al. Investigation of Diacylglycerol Lipase Alpha Inhibition in the Mouse Lipopolysaccharide Inflammatory Pain Model. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 363, n. 3, p. 394-401, Dec 2017. ISSN 1521-0103. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28970359 >.

WOODHAMS, S. G. et al. The role of the endocannabinoid system in pain. **Handb Exp Pharmacol,** v. 227, p. 119-43, 2015. ISSN 0171-2004. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25846617 >.

WU, W. P. et al. The very-high-efficacy 5-HT1A receptor agonist, F 13640, preempts the development of allodynia-like behaviors in rats with spinal cord

injury. **Eur J Pharmacol,** v. 478, n. 2-3, p. 131-7, Oct 2003. ISSN 0014-2999. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14575797 >.

XIONG, W. et al. Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-induced analgesia. **Nat Chem Biol,** v. 7, n. 5, p. 296-303, May 2011. ISSN 1552-4469. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460829 >.

XIONG, W. et al. Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting α3 glycine receptors. **J Exp Med,** v. 209, n. 6, p. 1121-34, Jun 2012. ISSN 1540-9538. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22585736 >.

YAMAMOTO, H. et al. Pharmacological characterization of standard analgesics on mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Neuropharmacology,** v. 57, n. 4, p. 403-8, Sep 2009. ISSN 1873-7064. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19591853 >.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **J Pharmacol Sci,** v. 101, n. 2, p. 107-17, Jun 2006. ISSN 1347-8613. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16766858 >.

ZHANG, F. et al. Expression of cannabinoid CB1 receptors in models of diabetic neuropathy. **J Pharmacol Exp Ther,** v. 323, n. 2, p. 508-15, Nov 2007. ISSN 0022-3565. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17702901 >.

ZHANG, J. Y. et al. Gelsemine, a principal alkaloid from Gelsemium sempervirens Ait., exhibits potent and specific antinociception in chronic pain by acting at spinal α3 glycine receptors. **Pain,** v. 154, n. 11, p. 2452-62, Nov 2013. ISSN 1872-6623. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886522 >.

APÊNDICE 1 – VERSÃO FINAL DE ARTIGO SUBMETIDO

Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors.

Carlos Henrique Alves Jesus[1], Daiany Darlly Bello Redivo[1], Aléxia Thamara Gasparin[1], Bruna Bittencourt Sotomaior[1], Milene Cristina de Carvalho[2], Karina Genaro[2,3], Antonio Waldo Zuardi[3], Jaime Eduardo Cecílio Hallak[3], José Alexandre Crippa[3], Janaina Menezes Zanoveli[1,2], Joice Maria da Cunha[1,2]*.

[1]Department of Pharmacology, Biological Science Sector, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

[2]Institute of Neurosciences and Behavior (INeC) and Laboratory of Neuropsychopharmacology of Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

[3]Department of Neuroscience and Behavioral Sciences, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil and National Institute of Science and Technology for Translational Medicine (INCT-TM-CNPq), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

*Corresponding Author:
Joice Maria da Cunha, PhD.
Laboratory of Pharmacology of Pain, Department of Pharmacology, Biological Science Building, Federal University of Parana, P.O. Box 19031, Curitiba, Paraná, Brazil.
ZIP code: 81540-990.
Tel.: +55 41 3361-1720.
Fax: +55 41 3226 2042.
E-mail address: joice.cunha@ufpr.br

ABSTRACT

Background and Purpose:

Most diabetic patients describe moderate to severe pain symptoms whose pharmacological treatment is palliative and poorly effective. Cannabidiol (CBD) has shown promising results in painful conditions. Then, we aimed to investigate the potential antinociceptive effect of CBD over the mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic (DBT) rats, as well as its involved mechanisms.

Experimental Approach:

Wistar adult male diabetic rats were treated acutely or sub-chronically (during 14 days) with CBD (0.1, 0.3 or 3 $mg \cdot kg^{-1}$, intraperitoneal; i.p.) and had their mechanical threshold assessed using the electronic Von Frey.

Key Results:

Acute treatment with CBD (at doses of 0.3 and 3 $mg \cdot kg^{-1}$) exerted a significant anti-allodynic effect, which is not associated with changes in the locomotor activity. The antinociceptive effect of CBD (3 $mg \cdot kg^{-1}$) was not altered by the pre-treatment with CB_1 or CB_2 receptor antagonists (AM251 and AM630; respectively), glycine receptor antagonist (strychnine hydrochloride), nor by the non-selective serotonin receptor antagonist (methysergide). However, this effect was completely prevented by the pre-treatment with the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY 100135. Sub-chronic treatment with CBD (0.3 or 3 $mg \cdot kg^{-1}$) induced a sustained attenuation of the mechanical allodynia in DBT rats. DBT rats presented significantly lower spinal cord levels of serotonin, which was prevented by the daily treatment with CBD (0.3 $mg \cdot kg^{-1}$).

Conclusions and Implications:

Taken together, our data suggest that CBD may be effective in the treatment of painful diabetic neuropathy and this effect seems to be potentially mediated by the serotonergic system activation through 5-HT_{1A} receptors.

Running Tittle: Cannabidiol reduces diabetic pain via 5-HT_{1A} receptors.

HIGHLIGHTS

- Cannabidiol exerts significant anti-allodynic effect in diabetic neuropathic pain.
- Cannabidiol does not alter locomotor activity in diabetic animals.
- 5-HT_{1A} receptors mediate the effect of cannabidiol in diabetic neuropathic pain.
- Cannabidiol may induce an increase of spinal cord levels of serotonin in diabetic rats.

Keywords: diabetes, neuropathic pain, cannabinoids, cannabinoid receptors, serotonin.

1. INTRODUCTION

Peripheral diabetic neuropathy (PDN) is considered one of the most common complications of diabetes (Dermanovic Dobrota *et al.*, 2014) affecting about 50% of both type 1 and type 2 diabetic patients with neuropathy (see Schreiber *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2017 for review), depending on the diagnostic criteria. In the early course of PDN, patients experience positive symptoms, being neuropathic pain the symptom that most significantly affects patients' quality of life, reducing performance in daily abilities (Schreiber *et al.*, 2015).

Approximately 30% of diabetic patients develop painful neuropathy, which is characterized by a range of debilitating sensations such as electric shock, tingling and burning (Pruitt *et al.*, 2017). The mechanisms involved in the establishment of these sensory disturbances are not completely understood. Thus, the current pharmacological treatments are only palliative and include different classes of drugs, such as antidepressants, antiepileptic or opioids. Even after these therapeutic approaches, less than one third of patients reach 50% of pain recover or remission, which represents a challenge in clinical practice (Javed *et al.*, 2015). Thus, there is a high demand for novel therapeutic compounds for the management of this important clinical condition.

In this sense, it has known that the most abundant phytocannabinoids found in the *Cannabis* plant, the Δ^9 tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) have been used to treat painful conditions since ancient history. Differently from THC, CBD lacks psychotomimetic activity and does not seem to exert direct biological activity on the CB_1 or CB_2 cannabinoid receptors even in high concentrations (Kim and Fishman, 2017).

CBD has also shown to produce therapeutic effect in different conditions such as inflammation, oxidative stress, nerve loss and degeneration. These effects are due to the wide spectrum of targets that CBD acts on (see Zuardi, 2008 for review). CBD also exerts promising analgesic effects in different models of inflammatory and chronic pain. For instance, CBD has been associated to a desensitization of the transient receptors potential vanilloid 1 (TRPV1) to the capsaicin, which may partially explain its anti-inflammatory effect (Bisogno *et al.*, 2001). CBD also restores the mechanical threshold in models of chemotherapy-induced neuropathic pain in mice (Ward *et al.*, 2014; Harris *et al.*, 2016), which

was partially blocked by a serotonin receptor 5-HT1$_A$ antagonist (Ward *et al.*, 2014). In a model of neuropathic pain induced by chronic constriction nerve injury, both THC and CBD induced antinociceptive effect, being THC the only one related to the side effects development (Casey *et al.*, 2017). Moreover, CBD has also been associated with the suppression of spinal nerve ligation-induced neuropathic and Freund's Complete Adjuvant-induced inflammatory pain. This antinociceptive effect occurred through interaction with a specific binding site at α3 glycinergic receptors, without showing common side effects associated with the cannabinoids use (Xiong *et al.*, 2012).

Although previous studies have already demonstrated the effectiveness of CBD in inhibiting sensory manifestations associated with different types of pain, an important neuroprotective effect (El-Remessy *et al.*, 2006, Campos et al., 2016) and its efficacy in some complications of diabetes, such as retinopathy (El-Remessy *et al.*, 2010), little is known about its effect on diabetic neuropathic pain.

Thus, the present study aimed to investigate the potential antinociceptive effect of CBD on the mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats, as well as the mechanisms involved in this effect.

2. METHODS

2.1. Animals

Three hundred and one male Wistar rats, provided by the Federal University of Parana colony, weighing between 180 and 220 g, were placed in plastic cages (41 x 32 x 16.5 cm^{-1}) and maintained in standard conditions of environment with appropriate temperature (21 ± 2 ºC) and illumination cycle (12 h/12 h light/dark) with water and food *ad libitum*. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals were followed and all protocols were previously approved by the Federal University of Parana Institutional Committee for the Ethical Use of Animals (CEUA/BIO-UFPR; authorization #1007). This study was performed in accordance with the ethical guidelines of Brazilian legislation on animal welfare following the ARRIVE guideline. All efforts were made to minimize the number and suffering of animals used.

2.2. Drugs and Solutions

Streptozotocin (STZ) from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, USA) and sodium citrate from Merck S.A. Indústrias Farmacêuticas (Brazil) were used. Cannabidiol (CBD) 99,6 % pure (without any other cannabinoid) was kindly supplied by BSPG-Pharm, Sandwich, United Kingdom. AM251 (CB1 receptor antagonist) and AM630 (CB2 receptor antagonist) were purchased from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Methysergide maleate salt (MTS, 5-$HT_{1B/D}$, 5-HT_2 and 5-HT_7-receptors antagonist) and strychnine hydrochloride (STRYCH, glycine receptor antagonist) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). (S)-WAY 100135 (serotonin receptor 5-HT_{1A} antagonist) was purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). CBD was freshly diluted with 0.9 % NaCl plus 2 % tween 80. AM251 and AM630 were diluted in a solution 1:1:18 of dimethyl sulfoxide, tween 80 and saline. MTS and STRYCH were freshly diluted in saline. (S)-WAY 100135 was diluted in heated saline (at 60 ºC).

2.3. Diabetes induction

After an overnight fast, diabetes was induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of streptozotocin (STZ) at the dose of 60 $mg \cdot kg^{-1}$, freshly diluted in citrate buffer (10 mM, pH 4.5). Hyperglycemia was confirmed 3 days after STZ administration and again at the end of the study. Blood samples of about 5 µL, obtained by pricking the tail, were added in test strips containing oxidase glucose. Only animals with non-fasting blood glucose levels ≥ 15 mM were included in the diabetic group and proceeded in the study. A control group (normoglycemic group) received an equivalent volume injection of citrate buffer (10 mM, pH 4.5).

2.4. Mechanical Threshold

Mechanical threshold was assessed before and at different times after induction of diabetes using the electronic von Frey equipment (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). After an

acclimation of 15 min in acrylic cages (12 × 20 × 17 cm) with a wire-grid floor (5 mm^2), the stimulus of increasing pressure was applied to the hind paws and ceased when the animal showed paw withdrawal. The pressure responsible for the withdrawal was defined as the mechanical threshold of the animal and calculated as the average of 3 measurements taken (Yamamoto *et al.*, 2009).

2.5. Open Field

The locomotor activity after single injection of CBD (0, 0.1, 0.3 or 3 $mg \cdot kg^{-1}$, i.p.) was assessed in the open field test as previously described (Santiago *et al.*, 2010). Briefly, the open field used was a rectangular arena (50 x 40 x 63 cm) with the floor divided by lines into nine squares. One hour after the vehicle or CBD treatment (peak of the antinociceptive effect), rats were placed individually in the center of the open-field and locomotion (number of squares crossed) was video recorded and then counted manually for 5 min. A crossed square was only counted when the rat placed its forepaws in the next square and moved forward. The number of squares crossed in the test was used as an index of locomotor activity.

2.6. Experimental Protocols

All behavioral experiments were conducted by an experimenter blind to treatments but not blind to the diabetic condition since diabetic animals exhibit typical physiological changes such as polyuria, polyphagia, polydipsia and weight gain reduction.

In the first set of experiments, mechanical threshold was assessed before and 28 days after diabetes induction. On day 28 after diabetes induction, diabetic animals received a single i.p. injection of CBD (at doses of 0.1, 0.3 or 3 $mg \cdot kg^{-1}$; based on previous studies from our group; Genaro *et al.*, 2017). Mechanical threshold was then reevaluated hourly, during four hours after CBD treatment, starting at the first hour after treatment.

The second set of experiments aimed to evaluate the mechanisms involved in the acute antinociceptive effect of CBD. Diabetes was induced as previously described. Diabetic animals had their mechanical threshold assessed 28 days after diabetes induction, and then, received an intraperitoneal injection of AM251 (CB1 receptor antagonist) or AM630 (CB2 receptor antagonist) at the

dose of 1 mg·kg^{-1}(Hill and Gorzalka, 2005; De Morais *et al.*, 2016). Twenty minutes after, the experimental groups were treated with CBD (3 mg·kg^{-1}, i.p.) and the mechanical threshold was evaluated again each hour until the fourth hour after CBD treatment. Given the ubiquitous expression of cannabinoid receptors in the nociceptive pathways (Freundt-Revilla et al., 2017), the cannabinoid receptor antagonists were systemically administered.

Considering the importance of the serotonin or glycine spinal receptors for pain modulation, the serotonergic or glycine receptor antagonists were intrathecally (i.t.) administered. For this, after a mechanical threshold assessment on day 28 after STZ injection, independent groups of diabetic animals were dorsally positioned under light anesthesia (4% halothane). A 1-inch, 25-G needle was transcutaneously introduced at the L5-L6 level into the subarachnoid space as previously described by Pereira *et al.*, (2017). A quick lateral movement of the tail was taken as indicative that the needle entered the subarachnoid space. Then, STRYCH (10 µg·20 µL^{-1}), MTS (30 µg·20 µL^{-1}) or WAY (3 µg·20 µL^{-1}) was injected 10 min before CBD treatment (3 mg·kg^{-1}, i.p.) and mechanical threshold was reassessed hourly during four hours. The doses of STRYCH, MTS and WAY were selected from the literature (Wei e Pertovaara, 2006; Saadé *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). The effect of i.t. treatment with the antagonists alone was tested in independent experimental groups.

The effect of a more sustained treatment with CBD was evaluated in another set of experiments. Animals had their mechanical threshold evaluated before and 14 days after STZ injection. After mechanical threshold evaluation on the 14th day, an intraperitoneal treatment with CBD (0.1, 0.3 or 3 mg·kg^{-1}) was started and maintained during the following 14 days. The mechanical threshold was assessed again once a week (at the 21st and 28th day after STZ injection; just before the daily treatment with CBD). At the end of the experiment, all animals were euthanized by anesthetic overdose and lumbar samples of the spinal cord (L4-L6) were dissected for serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hidroxyindole acetic acid (5-HIAA) quantification using high-performance liquid chromatography (HPLC).

2.7. Determination of Serotonin and 5HIAA levels in spinal cord by HPLC.

The levels of 5-HT and its metabolite 5-HIAA in the lumbar segment of

normoglycemic and diabetic animals treated with CBD (0.1, 0.3 or $mg \cdot kg^{-1}$) or vehicle during 14 days were evaluated by HPLC as described previously (Da Silva Dias *et al.*, 2015). Briefly, samples were weighted and homogenized in 800 µL of extraction solution (0.05 M perchloric acid), centrifuged at 15,000 x g for 20 min at 6ºC and stored at -70ºC for further analysis. Supernatants were submitted to fast isocratic separation through a C18 HPLC reversed-phase column system (C18, ODS, 3 µm, 150 mm x 2.0 mm column; linked to a New-Guard Cartridge Column, KJ0-4282; both from Phenomenex, Torrance, CA, USA). The HPLC consisted of a BAS Epsilon electrochemical detector with a glass-carbon electrode and a pump (PM-92e). The potential was set at 650 mV (compared with the Ag–AgCl reference electrode). The mobile phase consisted of 50 mM NaH_2PO_4, 0.1 mM Na_2–EDTA, 0.5mM n-octyl sodium sulfate, 10% methanol (pH 5.5) and was filtered and pumped through the system at a flow rate of 140 $\mu L \cdot min^{-1}$. The injection volume was 10 µL. This set-up allowed the analysis of serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels in each dialysate sample in a run that lasted approximately 30 min. All substances were quantified by comparing the peak areas to standard curves.

2.8. Statistical analysis

All behavioral data are presented by mean plus standard error of mean (SEM) for 5-13 animals per group. This difference in the number of animals in the experimental groups is associated with eventual deaths during the experiment period or the reversal of the diabetic state after four weeks. The data spinal cord levels of 5-HT or 5-HIAA, the ratio [5-HIAA] / [5-HT] and the open field test data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Two-way ANOVA with repeated measures was used for mechanical threshold evaluation (all treatments). The independent factors used were treatment and time. When appropriate, the *post-hoc* analysis of Bonferroni was applied. The level of significance was established as $p < 0.05$. All the tests were carried out using the GraphPad Prism program (version 6, San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

3.1. CBD exerts acute anti-allodynic effect without altering the locomotor activity in diabetic rats

As shown in the Figure 1A, all diabetic groups showed a reduced mechanical threshold 28 days after diabetes induction (STZ groups), when compared to the normoglycemic control group (VEH + VEH), indicating the development of mechanical allodynia. Two-way ANOVA with repeated measures revealed significant main effects of treatment [$F_{(4, 34)} = 38.01$; $p<0.0001$], time [$F_{(5, 170)} = 57.18$; $p<0.0001$] and also interaction [$F_{(20, 170)} = 6.92$; $p<0.0001$]. Bonferroni's multiple comparison tests indicated that single i.p. injection of CBD 3 $mg \cdot kg^{-1}$ (STZ + CBD 3) exerts an anti-allodynic effect in diabetic rats for two hours after treatment. The dose of 0.3 $mg \cdot kg^{-1}$ (STZ + CBD 0.3) of CBD showed effect only one hour after treatment and no effect was found after the injection of the CBD at a dose of 0.1 $mg \cdot kg^{-1}$ in diabetic animals (STZ + CBD 0.1) during the time course of the experiment. The normoglycemic control group (VEH + VEH) did not show differences in the mechanical threshold throughout the experiment.

To test whether the antinociceptive effect of CBD was related to a potential locomotor impairment, vehicle-treated normoglycemic rats and vehicle or CBD-treated diabetic animals were evaluated in the open field test one hour after the respective treatments (Figure 1B), which represented the peak of the antinociceptive effect of CBD in diabetic animals. One-way ANOVA did not reveal any significant effect of treatment [$F_{(4, 46)} = 1.988$; $p=0.1121$].

The acute treatment with CBD (any tested dose) did not significantly change neither the glycemic levels nor the body weight gain of diabetic rats when compared to vehicle-treated diabetic rats (supplementary material, table 1).

3.2. CBD anti-allodynic effect is not dependent on CB_1 and CB_2 receptor direct activation.

When compared to the control group (VEH + VEH), diabetic animals (STZ groups) displayed a reduced mechanical threshold 28 days after diabetes induction, as shown in Figure 2A and 2B. Diabetic groups were treated with vehicle or the cannabinoid CB_1 and CB_2 receptors antagonists, AM251 or AM630 (1 $mg \cdot kg^{-1}$), respectively, 20 min before vehicle or CBD (at a dose of 3 $mg \cdot kg^{-1}$; the efficient anti-allodynic dose observed in the experiment 1). Mechanical threshold was reevaluated during four hours after CBD treatment.

As shown in the figure 2A, two-way ANOVA with repeated measures showed significant main effects of treatment [$F_{(4, 234)} = 63.12$; $p<0.0001$], time [$F_{(5, 234)} = 31.55$; $p<0.0001$], and also interaction [$F_{(20, 234)} = 5.232$; $p<0.0001$]. Bonferroni's multiple comparison tests indicated that treatment with AM251 did not block the anti-allodynic effect provided by CBD one hour after treatment (Figure 2A.).

Considering the effect of the CB2 receptor antagonist (Figure 2B), two-way ANOVA with repeated measures revealed significant main effects of treatment [$F_{(4, 39)} = 36.81$; $p<0.0001$], time [$F_{(5, 195)} = 44.42$, $p<0.0001$] and interaction [$F_{(20, 195)} = 6.515$; $p<0.001$]. The *post-hoc* test showed that the pre-treatment with AM630 did not block the anti-allodynic effect of CBD one hour after treatment (Figure 2B).

As observed previously, neither the treatment with vehicle plus CBD nor AM251 or AM630 plus CBD significantly changed the glycemic levels or the body weight gain of diabetic rats when compared to vehicle-treated diabetic rats (Table 1, supplementary material).

3.3. CBD anti-allodynic effect is not blocked by a competitive glycine receptor antagonist.

To evaluate a potential involvement of glycine receptors on the anti-allodynic effect of CBD, 28 days after diabetes induction, animals received a single i.t. injection of vehicle or STRYCH (10 μg·20 μL^{-1}) 10 min prior to vehicle or CBD (3 $mg \cdot kg^{-1}$, i.p.). Mechanical threshold was assessed again hourly during 4 hours after CBD treatment. Two-way ANOVA with repeated measures evidenced main effects of treatment [$F_{(4,240)} = 62.28$; $p<0.0001$], time [$F_{(5, 240)} = 31.84$; $p<0.0001$] and also interaction [$F_{(20, 240)} = 4.73$; $p<0.0001$]. Bonferroni's multiple comparison tests showed that i.t. injection of STRYCH did not block the anti-allodynic effect of CBD established one hour after treatment (Figure 3).

Neither the treatment with vehicle plus CBD nor STRYCH plus CBD significantly altered the glycemic levels or the body weight gain of diabetic rats when compared to vehicle-treated diabetic rats (Table 1, supplementary material).

3.4. CBD anti-allodynic effect is dependent on 5-HT1$_A$ receptor activation.

Diabetic animals were tested 28 days after diabetes induction to evaluate the involvement of serotonin receptors over the antinociceptive effect of CBD. For this, animals received i.t. injection of the vehicle or non selective serotonin receptor antagonist, MTS (30 µg·20 μL^{-1}) 10 min prior to vehicle or CBD treatment. Mechanical threshold was reevaluated hourly, during four hours after CBD injection. Two-way ANOVA with repeated measures showed significant effects of treatment [$F_{(4, 39)} = 39.05$; $p<0.0001$], time [$F_{(5, 195)} = 45.73$; $p<0.0001$] and interaction [$F_{(20, 195)} = 6.78$; $p<0.0001$]. Bonferroni's multiple comparison tests showed that MTS did not block the anti-allodynic effect of CBD exerted one hour after injection (Figure 4A.).

In the next set of experiments, a more selective 5-HT1A receptor antagonist was tested. Diabetic animals, received an i.t. injection of vehicle or WAY (3 µg·20 μL^{-1}) 10 min before the vehicle or CBD treatment, and their mechanical threshold was assessed again hourly after CBD treatment. Two-way ANOVA with repeated measures showed significant effects of treatment [$F_{(4, 234)} = 65.54$; $p<0.0001$], time [$F_{(5, 234)} = 37.76$; $p<0.0001$] and interaction [$F_{(20, 234)} = 5.31$; $p<0.0001$]. Nevertheless, Bonferroni's multiple comparison tests showed that pretreatment with the selective 5-HT_{1A} antagonist, WAY100135 completely prevented the antinociceptive effect of CBD (Figure 4B.).

Neither the treatment with vehicle plus CBD nor MTS or WAY100135 plus CBD significantly changed the glycemic levels or the body weight gain of diabetic rats when compared to vehicle-treated diabetic rats (Table 1, supplementary material).

3.5. CBD exerts anti-allodynic effect after sustained treatment.

Diabetic animals showed a reduced mechanical threshold since 14 days after diabetes induction when compared to the normoglycemic control group (VEH + VEH) as shown in Figure 5. A daily treatment with CBD (0.1, 0.3 and 3 $mg \cdot kg^{-1}$) started on day 14. Mechanical threshold was reassessed on day 21 and again on day 28, twenty-four hours after the last CBD treatment.

Two-way ANOVA with repeated measures showed significant effects of treatment [$F_{(4, 48)} = 28.26$, $p<0.0001$], time [$F_{(3, 144)} = 46.95$, $p<0.0001$] and interaction [$F_{(12, 144)} = 7.61$, $p<0.0001$]. Bonferroni's multiple comparison tests showed that repeated treatment with CBD (at doses of 0.3 and 3 $mg \cdot kg^{-1}$) was

able to produce an anti-allodynic effect in diabetic rats on day 21 and on day 28 when compared to the vehicle-treated diabetic group (STZ + VEH; Figure 5A).

The chronic treatment with CBD (any tested dose) did not significantly change neither the glycemic levels nor the body weight gain of diabetic rats when compared to vehicle-treated diabetic rats (Table 2, supplementary material).

3.6. Repeated treatment with CBD significantly enhances the spinal levels of serotonin.

Diabetic animals repeatedly treated with CBD (at the doses of 0.1, 0.3 and 3 $mg \cdot kg^{-1}$ during 14 days) had their lumbar samples of the spinal cord (L4-L6) dissected and HPLC was performed to assess the 5-HT and 5-HIAA levels.

Considering the spinal cord levels of 5-HT, one-way ANOVA showed a significant effect of treatment [$F_{(4, 43)} = 60.93$; $p<0.0001$]. Bonferroni's multiple comparison tests showed that diabetic animals have a significantly lower level of 5-HT in the spinal cord when compared to normoglycemic control group (VEH + VEH). The repeated treatment with CBD (only at the dose of 0.3 $mg \cdot kg^{-1}$) induced a significant increase in the level of 5-HT content in the spinal cord in diabetic rats (Figure 5B).

The levels of the 5-HT metabolite, the 5-HIAA were also evaluated as shown in the Figure 5C. One-way ANOVA showed significant effects of treatment in the 5-HIAA levels [$F_{(4,43)} = 6.992$; $p=0.0002$]. Bonferroni's multiple comparison tests showed that diabetic animals did not differ from normoglycemic rats considering the 5-HIAA spinal cord content. Only the diabetic rats treated with CBD (at a dose of 3 $mg \cdot kg^{-1}$) have a significant higher levels of spinal cord content of 5-HIAA when compared to vehicle-treated diabetic rats (STZ + VEH; Figure 5C).

Next, the [5-HIAA] / [5-HT] ratio was calculated to estimate the 5-HT turnover. As observed in the Figure 5D, one-way ANOVA showed a significant effect of the treatment [$F_{(4,43)} = 65.02$; $p<0.0001$]. Bonferroni's multiple comparison tests showed that all diabetic animals, except the diabetic group treated with repeated doses of CBD 0.3 $mg \cdot kg^{-1}$ significantly differ from the normoglycemic control group in this parameter. The treatment with CBD at doses of 0.3 and 3 $mg \cdot kg^{-1}$ significantly alter the [5-HIAA] / [5-HT] ratio in diabetic rats when compared to vehicle-treated diabetic rats (Figure 5D), being the ratio

significantly lower in diabetic group treated with 0.3 $mg \cdot kg^{-1}$ and significantly higher in diabetic rats treated with CBD at higher dose (3 $mg \cdot kg^{-1}$).

4. DISCUSSION

The present study demonstrated to our knowledge, for the first time that CBD exerts an antinociceptive effect over the mechanical allodynia associated to diabetic neuropathic pain in rats which does not seem to be dependent on activation of cannabinoid or glycine receptors but rather 5-HT_{1A} receptors. Taking into account the unsatisfactory available therapeutic approaches to treat painful diabetic neuropathy, cannabinoids may represent a promising alternative for the treatment of refractory cases of chronic pain. The effectiveness of endocannabinoids over chemical hyperalgesia induced by formalin has already been demonstrated in normoglycemic (Guindon *et al.*, 2006; 2007) or diabetic animals (Schreiber *et al*. 2012). In animal models of neuropathic pain induced by chronic constriction nerve injury or by chemotherapy, CBD alone or in combination with THC produced a pronounced anti-allodynic effect (Casey *et al.*, 2017; King *et al.*, 2017). In the present study, CBD induced an antinociceptive effect over mechanical allodynia in STZ-diabetic rats which was transient peaking as early as 1 hour post injection, still apparent at 2 hours and absent at the third hour. Interestingly, drugs recommended for the treatment of neuropathic pain such as duloxetine, pregabalin and amitriptyline exhibit similar antinociceptive temporal profile to that of CBD in the STZ-induced diabetes model, *i.e.* effective up to 2 hours post-injection (Tripathi *et al*., 2016). The antinociceptive effect of CBD seems not to be related to a locomotor impairment, since the treatment with CBD did not alter the number of crossings in the open field test. Interestingly, although both CDB and THC demonstrate beneficial effects in the inhibition of neuropathic pain, only THC has been associated with deleterious side effects such as motor incorordination, catalepsy and sedation (Casey *et al.,* 2017). In our study, even the diabetic state did not significantly change the locomotor parameter, contrasting to previous studies that have observed a decrease of locomotor activity in diabetic animals (Haider *et al.*, 2013; Redivo *et al.*, 2016). These seemingly divergent data may be related to the established time of experimental diabetes, or to the reduction in exploratory activity associated with a more expressive anxiety-like and depressive-like behaviors observed in these

animals (Siba et al., 2017; Gambeta et al., 2016).

In general, CBD exerts its therapeutic effects in different pathological conditions due to its broad spectrum of molecular targets. Although the CB_1 and CB_2 receptors do not seem to be directly activated by CBD, studies have reported its *in vitro* antagonist action which seems to be related to the lack of psychomimetic activity (Pertwee *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2007). However, CBD may be acting augmenting the endocannabinoid tone through fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition (see Mcpartland *et al.*, 2015 for review). The present study shows that the anti-allodynic effect of CBD in diabetic animals is not blocked by previous injection of cannabinoid receptor antagonists AM251 and AM630, consistent with studies in other models of neuropathic pain (Ward *et al.*, 2014; Casey *et al.*, 2017). In addition, neither CB_1 nor CB_2 antagonist itself exacerbated mechanical sensitivity in diabetic animals.

Glycine receptors, which make part of a fast inhibitory transmission, have also been described as targets of CBD. In this sense, previous studies have shown that CBD positively modulates allosterically more than one type of glycine receptor (Ahrens *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2012), explaining its analgesic effect in inflammatory and also in neuropathic pain models. It seems that CBD may interact with S296 segment in one of the transmembrane domains of α3 glycine receptors, the same segment was previously described as a site for THC analgesic effects (Xiong *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2012). Our results show that intrathecal injection of strychnine, a competitive antagonist at glycine receptors, did not alter its anti-allodynic over mechanical allodynia in STZ-diabetic rats. Furthermore, the treatment with glycine receptors blocker itself did not alter the mechanical sensitivity in diabetic animals. Curiously, the spinal content of glycine has already been reported to be reduced in STZ-induced diabetic animals. In the same way, it has been observed a significantly reduced frequency of miniature post-synaptic inhibitory currents mediated by glycine in neurons of the dorsal horn of diabetic rats (Chiu *et al.*, 2016). Taken together, these results show that diabetic state may impair the glycinergic inhibitory control in the spinal cord and this may account for an absence of glycine receptors involvement in the effect of CBD on diabetic neuropathic pain.

Previous studies have been determined the important role of $5\text{-}HT_{1A}$ receptors to the antidepressant, anxiolytic and also positive effects on cognitive

impairment of CBD (see Campos *et al.*, 2016 for review). It has been reported from *in vitro* studies that CBD may exert agonistic effect on 5-HT_{1A} receptors and inhibitory effect on serotonin reuptake which result in facilitatory effect of serotoninergic transmission (Russo *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2013). In a animal model of neuropathic pain induced by paclitaxel, it was also observed that the neuroprotective effect of CBD is putatively mediated through 5-HT_{1A} receptor activation (Ward *et al.*, 2014). In the present study, we firstly tested a non-selective 5-HT receptor antagonist, methysergide maleate (MTS) over the antinociceptive effect of CBD. Surprisingly, the pre-treatment with MTS did not block the anti-allodynic effect of CBD in diabetic animals. However, this effect was blocked after a more selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100135 treatment . These apparently contradictory data can be attributed to the MTS capacity of antagonize and also agonize some 5-HT1 receptor subtypes with lower affinity compared to 5-HT2 receptor, which were attributed to its therapeutic effect in migraine (Silberstein, 1998; Dahlöf and Maassen Van Den Brink, 2012). Together, these results suggest a more prominent involvement of 5-HT_{1A} receptor in the anti-allodynic effect of CBD in diabetic neuropathic pain. According to previous studies, 5-HT_{1A} receptors can be found in different regions of the rat nervous system, ranging from raphe nuclei and hippocampus to the dorsal horn of the spinal cord (Marlier *et al.*, 1991; Lanfumey and Hamon, 2004). The 5-HT_{1A} receptors are inhibitory G-protein coupled receptors, and at the supraspinal level may play a regulatory role in the control of 5-HT release to projection areas such as the spinal cord. At the supraspinal level, 5-HT_{1A} receptors are located pre-synaptically and exert autoreceptor function, whereas in the spinal cord these receptors are located postsynaptically and make part of the descending serotoninergic pathway. Exposure to agonists at supraespinal level leads to diminished inhibitory control of 5-HT release, enhancing signaling at postsynaptic receptors, which accounts for the antinociceptive effects of 5-HT_{1A} agonists (see Bardin, 2011 for review).

In the next set of experiments, it was investigated the cumulative effect of CBD after repeated treatment. Interestingly, daily treatment with CBD (0.3 and 3 $mg \cdot kg^{-1}$, i.p.) during 14 days (starting 14 days after STZ injection) induced a sustained attenuation of the mechanical allodynia in diabetic rats. The mechanical threshold of these diabetic animals that were treated 24 hours earlier

with CBD was not different from the normoglycemic group. This is the one of the major findings of the current study, considering that CBD has produced a reestablishment of mechanical threshold initially reduced by STZ injection. CBD-induced analgesia seems to involve the pain modulatory descending pathways, considering that it was significantly diminished after spinal cord or dorsal lateral funiculus lesions (Lichtman and Martin, 1991; Seyrek *et al.*, 2010). Supporting an involvement of the modulatory pain descending pathways in PDN, antidepressants that act inhibiting serotonin (5-HT) and norepinephrine reuptake are used as the first line for the treatment of this condition (Schreiber *et al.*, 2015). Thus, as it was observed in this study, an important role of serotonergic receptors in the acute antinociceptive effect of CBD, the next set of experiments aimed to quantify levels of 5-HT and its metabolite 5-HIAA in the spinal cord of sustained treated-diabetic animals with CBD. Our results point out a significant decrease of 5-HT levels in diabetic animals, which may be associated with the development of mechanical allodynia. Previous studies, however, have reported inconsistent results in regards to the levels of 5-HT in the nervous system of STZ-induced diabetic rats (Sandrini *et al.*, 1997; Shimazoe *et al.*, 2000). For instance, Morgado et al (2011) reported that STZ-induced diabetic rats developed mechanical hyperalgesia along with higher levels of 5-HT at spinal level evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay.

Considering the CBD effect over the spinal cord content of 5-HT, we observed that only the animals treated with lower dose of CBD (0.3 $mg \cdot kg^{-1}$) had a significant increase of spinal cord levels of 5-HT, and consequently lower [5-HIAA] / [5-HT] ratio, when compared to vehicle-treated diabetic rats. In fact, cannabinoids have shown to produce an increase in the level of 5-HT in the nervous system of rats (Avraham *et al.*, 2011). THC, for example, has shown to induce an increase in 5-HT level after systemic and intracerebral injection (Holtzman *et al.*, 1969; Egashira *et al.*, 2002). This finding has been somewhat surprising since repeated treatment with the CBD at both doses of 0.3 or 3 $mg \cdot kg^{-1}$ significantly induced a sustained antiallodynic effect. Therefore, it is possible to infer that the antinociceptive effect of CBD does not seem to be totally dependent upon the restoration of 5-HT spinal levels, but somehow involves the activation of 5-HT_{1A} receptors. About the spinal cord levels of 5-HIAA, no differences were observed between the vehicle-treated normoglycemic and

control diabetic animals. However, diabetic rats treated with the highest dose of CBD (3 $mg \cdot kg^{-1}$) exhibited a significant increase of this 5-HT metabolite, suggesting an increase of 5-HT metabolism, a hypothesis that was corroborated by the pronounced increase of [5-HIAA] / [5-HT] ratio in this experimental group. This fact may explain why no significant increase of this monoamine was detected in samples of spinal cord from this experimental group. The mechanisms involved in the antinociceptive effect of the higher dose of CBD (3 $mg \cdot kg^{-1}$) remain unknown. However, the diversity of molecular targets activated by this phytocannabinoid and the possibility of neuroadaptive changes after the persistent treatment, lead us to believe that in some way the mechanisms involved in the analgesia associated with this treatment may differ in relation to the doses considered.

In summary, our results have demonstrated for the first time that CBD exerts both acute and sustained anti-allodynic effect in a model of diabetes-induced neuropathic pain in rats. Furthermore, the acute effect of CBD in diabetic neuropathic pain was devoid of locomotor impairment, and it does not seem to be related to a direct action on cannabinoid or glycine receptors. In contrast, the results of this study specifically demonstrate that $5\text{-}HT_{1A}$ receptors are potentially involved in the effect of CBD. Moreover, diabetic animals showed a decrease in spinal cord 5-HT levels, which was significantly reestablished by CBD. Taken together, our data support the indication of CBD as an alternative for attenuation of diabetes-induced neuropathic pain, potentially through activation of the serotoninergic system.

Acknowledgments

CHA Jesus and DDB Redivo are recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowships. JAC is recipient of *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Brazil) productivity fellowship (1A). The present study was supported by a CNPq grant (CNPq/MS/SCTIE/DECIT N. 26/2014 – *Pesquisas sobre Distúrbios Neuropsiquiátricos*; 466805/2014-4). JAC has a grant from University Global Partnership Network (UGPN) –Global priorities in cannabinoid research excellence. BSPG-Pharm (Sandwich, UK) has kindly supplied CBD at no cost.

Conflict of interest statement

JE Hallak is co-inventor (Mechoulam R, JC, Guimarães FS, AZ, JH, Breuer A) of the patent “Fluorinated CBD compounds, compositions and uses thereof. Pub. No.: WO/2014/108899. International Application No.: PCT/IL2014/050023” Def. US no. Reg. 62193296; 29/07/2015; INPI on 19/08/2015 (BR1120150164927). The University of São Paulo has licensed the patent to Phytecs Pharm (USP Resolution No. 15.1.130002.1.1). The University of São Paulo has an agreement with Prati-Donaduzzi (Toledo, Brazil) to “develop a pharmaceutical product containing synthetic cannabidiol and prove its safety and therapeutic efficacy in the treatment of epilepsy, schizophrenia, Parkinson’s disease, and anxiety disorders”. JE Hallak has received travel support from and is medical advisor of BSPG-Pharm.

REFERENCES

Ahrens, J., Demir, R., Leuwer, M., de la Roche, J., Krampfl, K., Foadi, N.et al., 2009. The nonpsychotropic cannabinoid cannabidiol modulates and directly activates alpha-1 and alpha-1-Beta glycine receptor function. Pharmacology 83, 217–222. https://doi.org/10.1159/000201556

Avraham, Y., Grigoriadis, N., Poutahidis, T., Vorobiev, L., Magen, I., Ilan, Y. et al., 2011. Cannabidiol improves brain and liver function in a fulminant hepatic failure-induced model of hepatic encephalopathy in mice. Br J Pharmacol 162, 1650–1658. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01179.x

Bardin, L., 2011. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain. Behav. Pharmacol. Wolters Kluwer Heal. Behav. Pharmacol. 22. https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e328349aae4

Bisogno, T., Hanuš, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I. et al., 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. Br. J. Pharmacol. 134, 845–852. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327

Campos, A.C., de Paula Soares, V., Carvalho, M.C., Ferreira, F.R., Vicente,

M.A., Brandão, M.L. et al., 2013. Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. Psychopharmacol. 226, 13–24. https://doi.org/10.1007/s00213-012-2878-7

Campos, A.C., Fogaça, M. V., Sonego, A.B., Guimarães, F.S., 2016. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. Pharmacol. Res. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.033

Campos, A.C., Guimarães, F.S., 2008. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. Psychopharmacol. 199, 223–230. https://doi.org/10.1007/s00213-008-1168-x

Casey, S.L., Atwal, N., Vaughan, C.W., 2017. Cannabis constituent synergy in a mouse neuropathic pain model. Pain. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001051

Chiu, Y.C., Liao, W.T., Liu, C.K., Wu, C.H., Lin, C.R., 2016. Reduction of spinal glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain. Neurosci Lett 611, 88–93. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.10.072

da Silva Dias, I.C., Carabelli, B., Ishii, D.K., de Morais, H., de Carvalho, M.C., de Souza, L.E. et al., 2016. Indoleamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes. Mol Neurobiol 53, 6997–7009. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9617-0

Dahlöf, C., Maassen Van Den Brink, A., 2012. Dihydroergotamine, ergotamine, methysergide and sumatriptan - basic science in relation to migraine treatment. Headache 52, 707–714. https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2012.02124.x

de Morais, H., de Souza, C.P., da Silva, L.M., Ferreira, D.M., Baggio, C.H., Vanvossen, A.C. et al., 2016. Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: Role of CB1 receptors. Eur Neuropsychopharmacol 26, 1590–1600. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.08.007

Dermanovic Dobrota, V., Hrabac, P., Skegro, D., Smiljanic, R., Dobrota, S.,

Prkacin, I. et al., 2014. The impact of neuropathic pain and other comorbidities on the quality of life in patients with diabetes. Heal. Qual Life Outcomes 12, 171. https://doi.org/10.1186/s12955-014-0171-7

Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2002. Intracerebral microinjections of delta 9-tetrahydrocannabinol: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats. Brain Res 952, 239–245.

El-Alfy, A.T., Ivey, K., Robinson, K., Ahmed, S., Radwan, M., Slade, D. et al., 2010. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from Cannabis sativa L. Pharmacol Biochem Behav 95, 434–442. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.03.004

El-Remessy, A.B., Al-Shabrawey, M., Khalifa, Y., Tsai, N.T., Caldwell, R.B., Liou, G.I., 2006. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. Am J Pathol 168, 235–244. https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050500

El-Remessy, A.B., Khalifa, Y., Ola, S., Ibrahim, A.S., Liou, G.I., 2010. Cannabidiol protects retinal neurons by preserving glutamine synthetase activity in diabetes. Mol Vis 16, 1487–1495.

Freundt-Revilla, J., Kegler, K., Baumgärtner, W., and Tipold, A. (2017). Spatial distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1) in normal canine central and peripheral nervous system. PLoS One 12:.

Gambeta, E., Sestile, C.C., Fogaça, M. V., Guimarães, F.S., Audi, E.A., Da Cunha, J.M. et al., 2017. A serotonergic deficit in the dorsal periaqueductal gray matter may underpin enhanced panic-like behavior in diabetic rats. Behav. Pharmacol. 28, 558–564. https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000332

Genaro, K., Fabris, D., Arantes, A.L.F., Zuardi, A.W., Crippa, J.A.S., Prado, W.A., 2017. Cannabidiol Is a Potential Therapeutic for the Affective-Motivational Dimension of Incision Pain in Rats. Front Pharmacol 8, 391. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00391

Guindon, J., Desroches, J., Beaulieu, P., 2007. The antinociceptive effects of intraplantar injections of 2-arachidonoyl glycerol are mediated by cannabinoid CB 2 receptors. Br. J. Pharmacol. 150, 693–701. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706990

Guindon, J., LoVerme, J., De Léan, A., Piomelli, D., Beaulieu, P., 2006. Synergistic antinociceptive effects of anandamide, an endocannabinoid, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peripheral tissue: A role for endogenous fatty-acid ethanolamides? Eur. J. Pharmacol. 550, 68–77. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.08.045

Haider, S., Ahmed, S., Tabassum, S., Memon, Z., Ikram, M., Haleem, D.J., 2013. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. Acta Neurol Belg 113, 35–41. https://doi.org/10.1007/s13760-012-0121-2

Harris, H.M., Sufka, K.J., Gul, W., Elsohly, M.A., 2016. Effects of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Cisplatin-Induced Neuropathy in Mice. Planta Med. 82, 1169–1172. https://doi.org/10.1055/s-0042-106303

Hill, M.N., Gorzalka, B.B., 2005. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. Eur Neuropsychopharmacol 15, 593–599. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.03.003

Holtzman, D., Lovell, R.A., Jaffe, J.H., Freedman, D.X., 1969. 1-delta9-tetrahydrocannabinol: neurochemical and behavioral effects in the mouse. Science (80-.). 163, 1464–1467.

Javed, S., Petropoulos, I.N., Alam, U., Malik, R.A., 2015. Treatment of painful diabetic neuropathy. Ther. Adv. Chronic Dis. 6, 15–28. https://doi.org/10.1177/2040622314552071

Kim, P.S., Fishman, M.A., 2017. Cannabis for Pain and Headaches: Primer. Curr Pain Headache Rep 21, 19. https://doi.org/10.1007/s11916-017-0619-7

King, K.M., Myers, A.M., Soroka-Monzo, A.J., Tuma, R.F., Tallarida, R.J., Walker, E.A. et al., 2017. Single and combined effects of Δ(9) -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. Br J Pharmacol 174, 2832–2841. https://doi.org/10.1111/bph.13887

Kwon, M., Altin, M., Duenas, H., Alev, L., 2014. The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. Pain Pract. 14, 656–667. https://doi.org/10.1111/papr.12145

Lanfumey, L., Hamon, M., 2004. 5-HT1 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 3, 1–10.

Leweke, F.M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C.W., Hoyer, C. et al., 2012. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. Transl Psychiatry 2, e94. https://doi.org/10.1038/tp.2012.15

Lichtman, A.H., Martin, B.R., 1991. Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. J Pharmacol Exp Ther 258, 517–523.

Linge, R., Jiménez-Sánchez, L., Campa, L., Pilar-Cuéllar, F., Vidal, R., Pazos, A. et al., 2016. Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT1A receptors. Neuropharmacology 103, 16–26. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.12.017

Marlier, L., Teilhac, J.R., Cerruti, C., Privat, A., 1991. Autoradiographic mapping of 5-HT1, 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT2 receptors in the rat spinal cord. Brain Res 550, 15–23.

McPartland, J.M., Duncan, M., Di Marzo, V., Pertwee, R.G., 2015. Are cannabidiol and Δ(9) -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. Br J Pharmacol 172, 737–753. https://doi.org/10.1111/bph.12944

Morgado, C., Silva, L., Pereira-Terra, P., Tavares, I., 2011. Changes in serotoninergic and noradrenergic descending pain pathways during painful diabetic neuropathy: the preventive action of IGF1. Neurobiol Dis 43, 275–284. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.04.001

Pereira, F.C., Parisi, J.R., Maglioni, C.B., Machado, G.B., Barragán-Iglesias, P., Silva, J.R.T. et al., 2017. Antinociceptive effects of low-level laser therapy at 3 and 8 j/cm(2) in a rat model of postoperative pain: possible role of endogenous Opioids. Lasers Surg Med. https://doi.org/10.1002/lsm.22696

Pertwee, R.G., Ross, R.A., Craib, S.J., Thomas, A., 2002. (-)-Cannabidiol antagonizes cannabinoid receptor agonists and noradrenaline in the mouse vas deferens. Eur J Pharmacol 456, 99–106.

Pruitt, J., Moracho-Vilrriales, C., Threatt, T., Wagner, S., Wu, J., Romero-Sandoval, E.A., 2017. Identification, prevalence, and treatment of painful diabetic neuropathy in patients from a rural area in South Carolina. J Pain Res 10, 833–843. https://doi.org/10.2147/JPR.S129139

Rahn, E.J., Hohmann, A.G., 2009. Cannabinoids as pharmacotherapies for

neuropathic pain: from the bench to the bedside. Neurotherapeutics 6, 713–737. https://doi.org/10.1016/j.nurt.2009.08.002

Redivo, D.D., Schreiber, A.K., Adami, E.R., Ribeiro, D.E., Joca, S.R., Zanoveli, J.M. et al., 2016. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. Behav Brain Res 298, 57–64. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.058

Russo, E.B., Burnett, A., Hall, B., Parker, K.K., 2005. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. Neurochem. Res. 30, 1037–1043. https://doi.org/10.1007/s11064-005-6978-1

Saadé, N.E., Al Amin, H.A., Barchini, J., Tchachaghian, S., Shamaa, F., Jabbur, S.J. et al., 2012. Brainstem injection of lidocaine releases the descending pain-inhibitory mechanisms in a rat model of mononeuropathy. Exp Neurol 237, 180–190. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.021

Sandrini, M., Vitale, G., Vergoni, A. V, Ottani, A., Bertolini, A., 1997. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the rat brain. Life Sci 60, 1393–1397.

Santiago, R.M., Barbieiro, J., Lima, M.M., Dombrowski, P.A., Andreatini, R., Vital, M.A., 2010. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 34, 1104–1114. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.004

Schreiber, A.K., Nones, C.F.M., Reis, R.C., Chichorro, J.G., Cunha, J.M., 2015. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. World J. Diabetes 6, 432. https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.432

Schreiber, A.K., Neufeld, M., Jesus, C.H.A., Cunha, J.M., 2012. Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin-diabetic rats. Neuropharmacology 63, 1286–1297. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.08.009

Seyrek, M., Kahraman, S., Deveci, M.S., Yesilyurt, O., Dogrul, A., 2010. Systemic cannabinoids produce CB_1 -mediated antinociception by activation

of descending serotonergic pathways that act upon spinal 5-HT(7) and 5-HT(2A) receptors. Eur J Pharmacol 649, 183–194. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.039

Shimazoe, T., Ishida, J., Maetani, M., Yakabe, T., Yamaguchi, M., Miyasaka, K. et al., 2000. Entrainment function in the suprachiasmatic nucleus of streptozotocin-induced diabetic rats. Jpn J Pharmacol 83, 355–358.

Siba, I.P., Bortolanza, M., Frazão Vital, M.A.B., Andreatini, R., da Cunha, J.M., Del Bel, E.A. et al., 2017. Fish oil prevents rodent anxious states comorbid with diabetes: A putative involvement of nitric oxide modulation. Behav. Brain Res. 326, 173–186. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.03.008

Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., Pertwee, R.G., 2007. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. Br J Pharmacol 150, 613–623. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707133

Toth, C.C., Jedrzejewski, N.M., Ellis, C.L., Frey, W.H., 2010. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain. Mol Pain 6, 16. https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-16

Tripathi, C.D., Mehta, A.K., Yadav, A.M., 2016. Drug combinations in diabetic neuropathic pain: an experimental validation. J Basic Clin Physiol Pharmacol 27, 617–624. https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0163

Ward, S.J., McAllister, S.D., Kawamura, R., Murase, R., Neelakantan, H., Walker, E.A., 2014. Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT 1A receptors without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. Br. J. Pharmacol. 171, 636–645. https://doi.org/10.1111/bph.12439

Watanabe, K., Ogi, H., Nakamura, S., Kayano, Y., Matsunaga, T., Yoshimura, H. et al., 1998. Distribution and characterization of anandamide amidohydrolase in mouse brain and liver. Life Sci 62, 1223–1229.

Wei, H., Pertovaara, A., 2006. 5-HT(1A) receptors in endogenous regulation of neuropathic hypersensitivity in the rat. Eur J Pharmacol 535, 157–165. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.02.019

Xiong, W., Cheng, K., Cui, T., Godlewski, G., Rice, K.C., Xu, Y. et al., 2011. Cannabinoid potentiation of glycine receptors contributes to cannabis-

induced analgesia. Nat Chem Biol 7, 296–303. https://doi.org/10.1038/nchembio.552

Xiong, W., Cui, T., Cheng, K., Yang, F., Chen, S.R., Willenbring, D. et al., 2012. Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting α3 glycine receptors. J Exp Med 209, 1121–1134. https://doi.org/10.1084/jem.20120242

Zeng, L., Alongkronrusmee, D., van Rijn, R.M., 2017. An integrated perspective on diabetic, alcoholic, and drug-induced neuropathy, etiology, and treatment in the US. J Pain Res 10, 219–228. https://doi.org/10.2147/JPR.S125987

Zhang, J.Y., Gong, N., Huang, J.L., Guo, L.C., Wang, Y.X., 2013. Gelsemine, a principal alkaloid from Gelsemium sempervirens Ait., exhibits potent and specific antinociception in chronic pain by acting at spinal α3 glycine receptors. Pain 154, 2452–2462. https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.07.027

Zuardi, A.W., 2008. Cannabidiol : from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action Canabidiol : de um canabinóide inativo a uma droga com amplo espectro de ação. Rev. Bras. Psiquiatr. 30, 271–280. https://doi.org/10.1590/S1516-44462008000300015.

Figure Legends

Figure 1. Effect of acute treatment with CBD (0.1, 0.3 or 3 mg·kg^{-1}) on the mechanical allodynia (panel A) and on the locomotor activity (panel B) in STZ-induced diabetic animals. The data represent mean plus SEM, n = 7-9 per group. # indicates $p<0.05$ when compared to the normoglycemic group treated with vehicle (VEH+VEH). * indicates $p<0.05$ when compared to the diabetic group treated with VEH (STZ+VEH). Two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni post hoc test (panel A). One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test (panel B).

Figure 2. Effect of the pre treatment with CB_1 or CB_2 receptor antagonists (AM251 or AM630; panels A and B, respectively; both at a dose of 1 mg·kg^{-1}, i.p.) on CBD (3 mg·kg^{-1}, i.p) anti-allodynic effect in diabetic animals (STZ). The data represent mean plus SEM, n = 5-10 per group. # indicates $p<0.05$ when compared to the normoglycemic group treated with vehicle (VEH+VEH+VEH). * indicates $p<0.05$ when compared to the diabetic group treated with VEH (STZ+VEH+VEH). Two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni *post hoc* test.

Figure 3. Effect of the pre treatment with a competitive antagonist at glycine receptors, strychnine (STRYCH, 10 µg·20 µL^{-1}, i.t.) on CBD (3 mg·kg^{-1}, i.p.) anti-allodynic effect in diabetic animals (STZ). The data represent mean plus SEM, n = 7-10 per group. # indicates $p<0.05$ when compared to normoglycemic group treated with vehicle (VEH+VEH+VEH). * indicates $p<0.05$ when compared to the diabetic group treated with VEH (STZ+VEH+VEH). Two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni *post hoc* test.

Figure 4. Effect of the pre treatment with (A)non-selective (methysergide; MTS, 30 µg·20 µL^{-1}, i.t.) or (B) specific 5-HT_{1A} (WAY 100135; WAY, 3 µg·20 µL^{-1}, i.t.) serotonin receptor antagonists on CBD (3 mg·kg^{-1}, i.p) anti-allodynic effect in diabetic animals (STZ). The data represent mean plus SEM, n = 6-10 per group. # indicates $p<0.05$ when compared to the normoglycemic group treated with vehicle (VEH+VEH+VEH). * indicates $p<0.05$ when compared to the diabetic

group treated with VEH (STZ+VEH+VEH). Two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni *post hoc* test.

Figure 5. Effect of repeated CBD treatment (0.1, 0.3 or 3 $mg \cdot kg^{-1}$; during 14 days) on the mechanical allodynia (A) and on the spinal levels of 5-HT (B)or its metabolite 5-HIAA (C). The 5-HT turnover, calculated by the ratio of [5-HIAA]/[5-HT] is shown in the panel D. The data represent mean plus SEM, n = 6-11 per group. # indicates $p<0.05$ when compared to the normoglycemic control group treated with vehicle (VEH+VEH). * indicates $p<0.05$ when compared to the diabetic group treated with VEH (STZ+VEH). Two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni post hoc test (panel A). One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test (panels B, C and D).

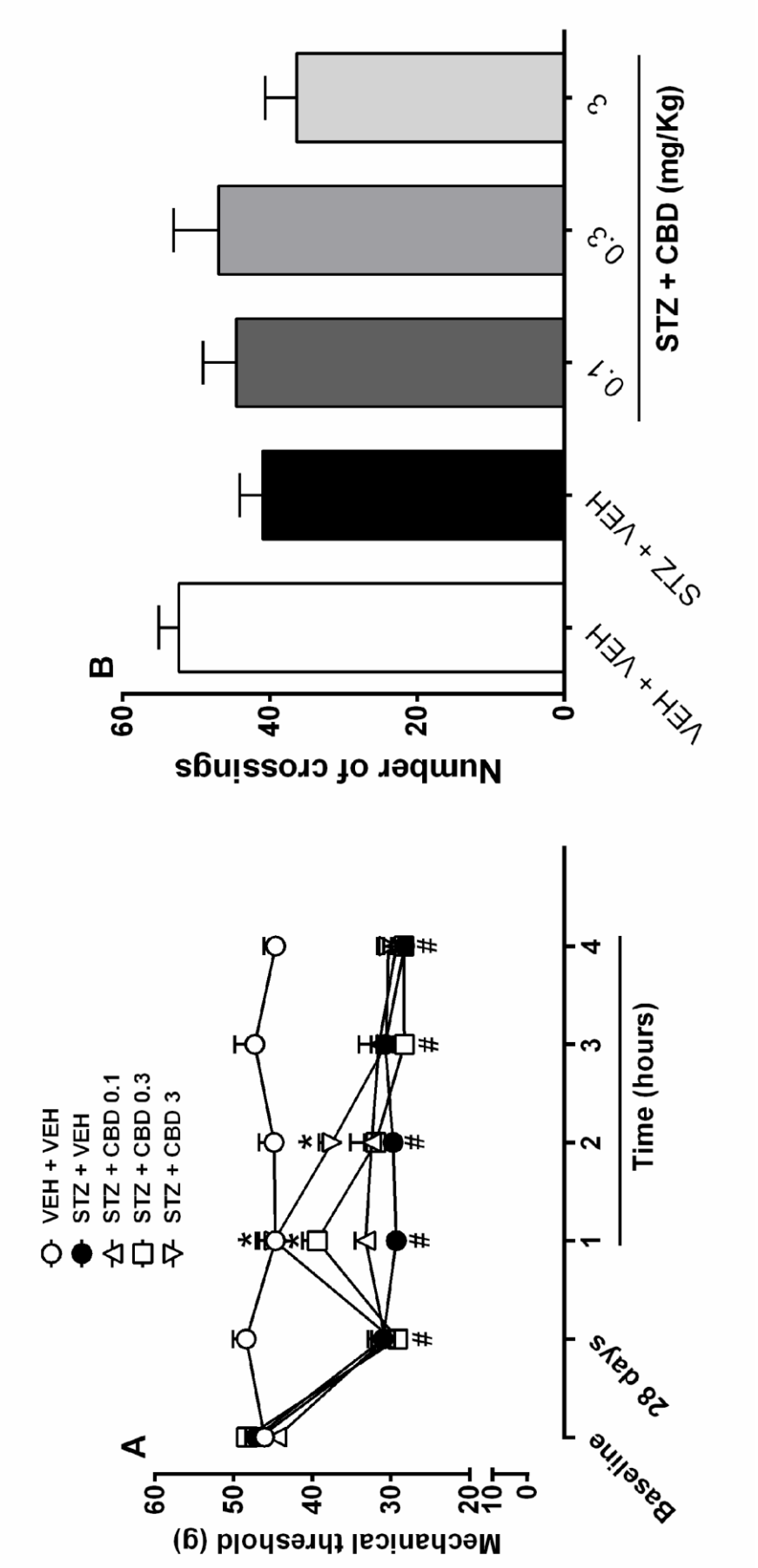
A
Mechanical threshold (g)
60
50
40
30
20
10
0
Baseline
28 days
1
2
3
4
Time (hours)
VEH + VEH
STZ + VEH
STZ + CBD 0.1
STZ + CBD 0.3
STZ + CBD 3
B
Number of crossings
60
40
20
0
VEH + VEH
STZ + VEH
0.1
0.3
3
STZ + CBD (mg/Kg)

FIGURE 1

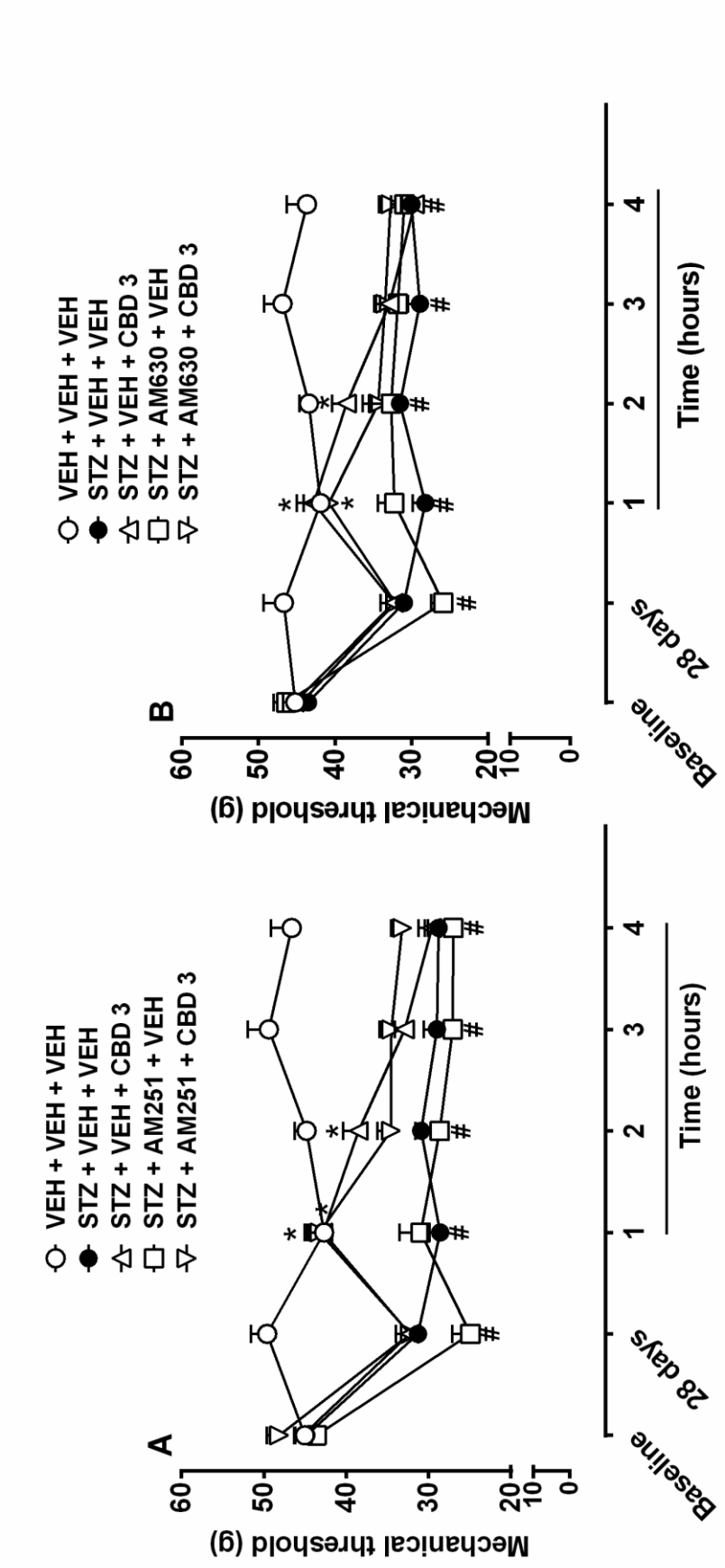
A
B
Mechanical threshold (g)
60
50
40
30
20
10
0
Baseline
28 days
1
2
3
4
Time (hours)
VEH + VEH + VEH
STZ + VEH + VEH
STZ + VEH + CBD 3
STZ + AM251 + VEH
STZ + AM251 + CBD 3
STZ + AM630 + VEH
STZ + AM630 + CBD 3

FIGURE 2

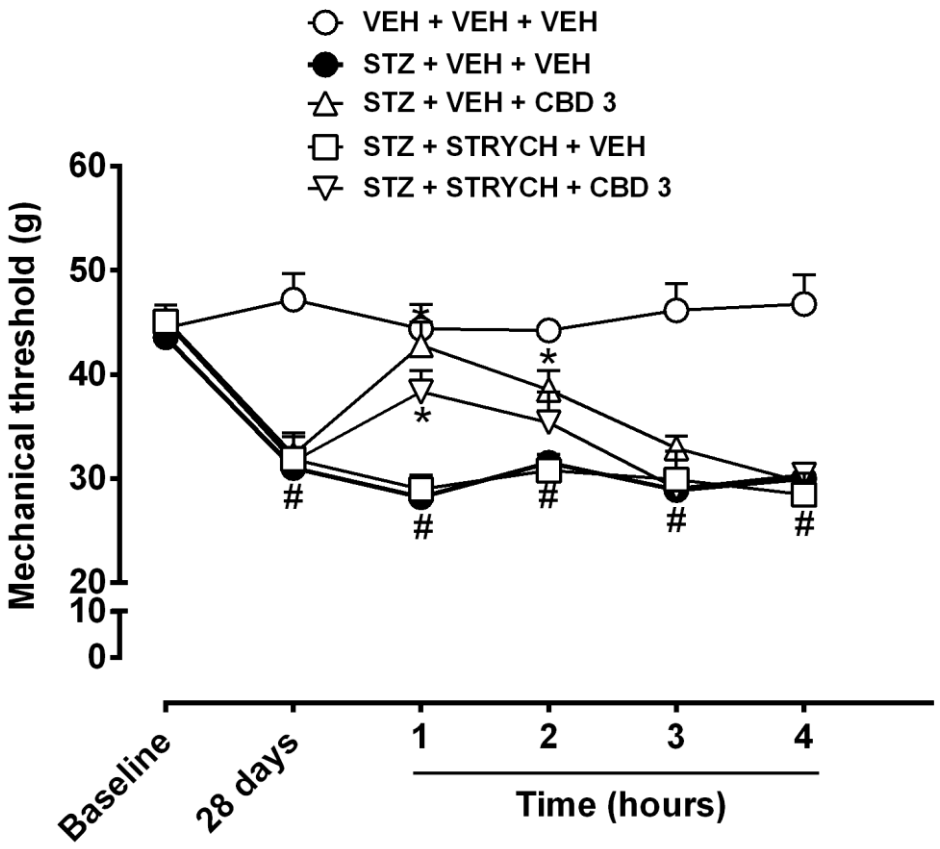
VEH + VEH + VEH
STZ + VEH + VEH
STZ + VEH + CBD 3
STZ + STRYCH + VEH
STZ + STRYCH + CBD 3
Mechanical threshold (g)
60
50
40
30
20
10
0
Baseline
28 days
1
2
3
4
Time (hours)
#
*

FIGURE 3

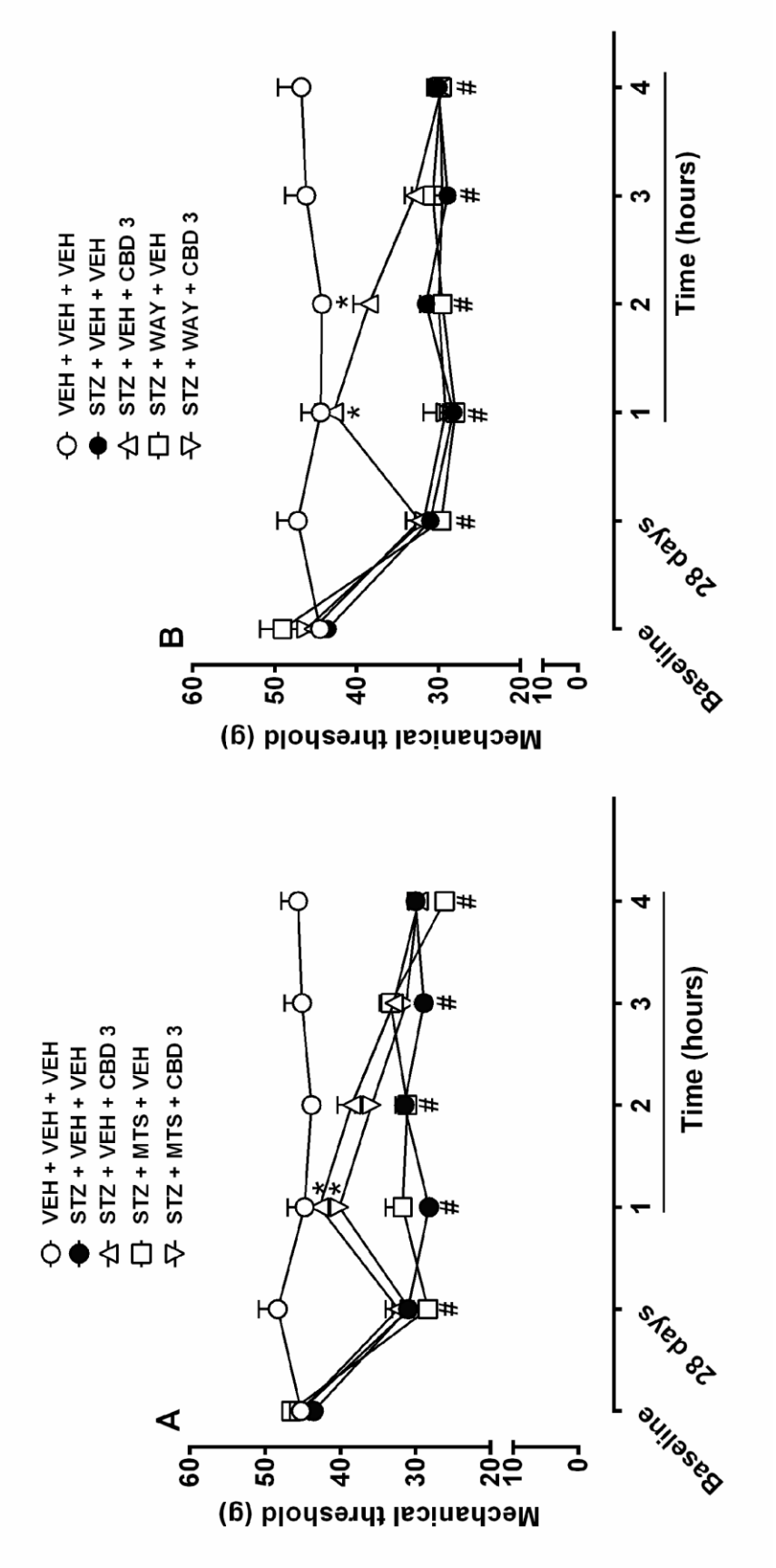
A
B
Mechanical threshold (g)
60
50
40
30
20
10
0
Baseline
28 days
1
2
3
4
Time (hours)
VEH + VEH + VEH
STZ + VEH + VEH
STZ + VEH + CBD 3
STZ + MTS + VEH
STZ + MTS + CBD 3
STZ + WAY + VEH
STZ + WAY + CBD 3
*
**
#

FIGURE 4

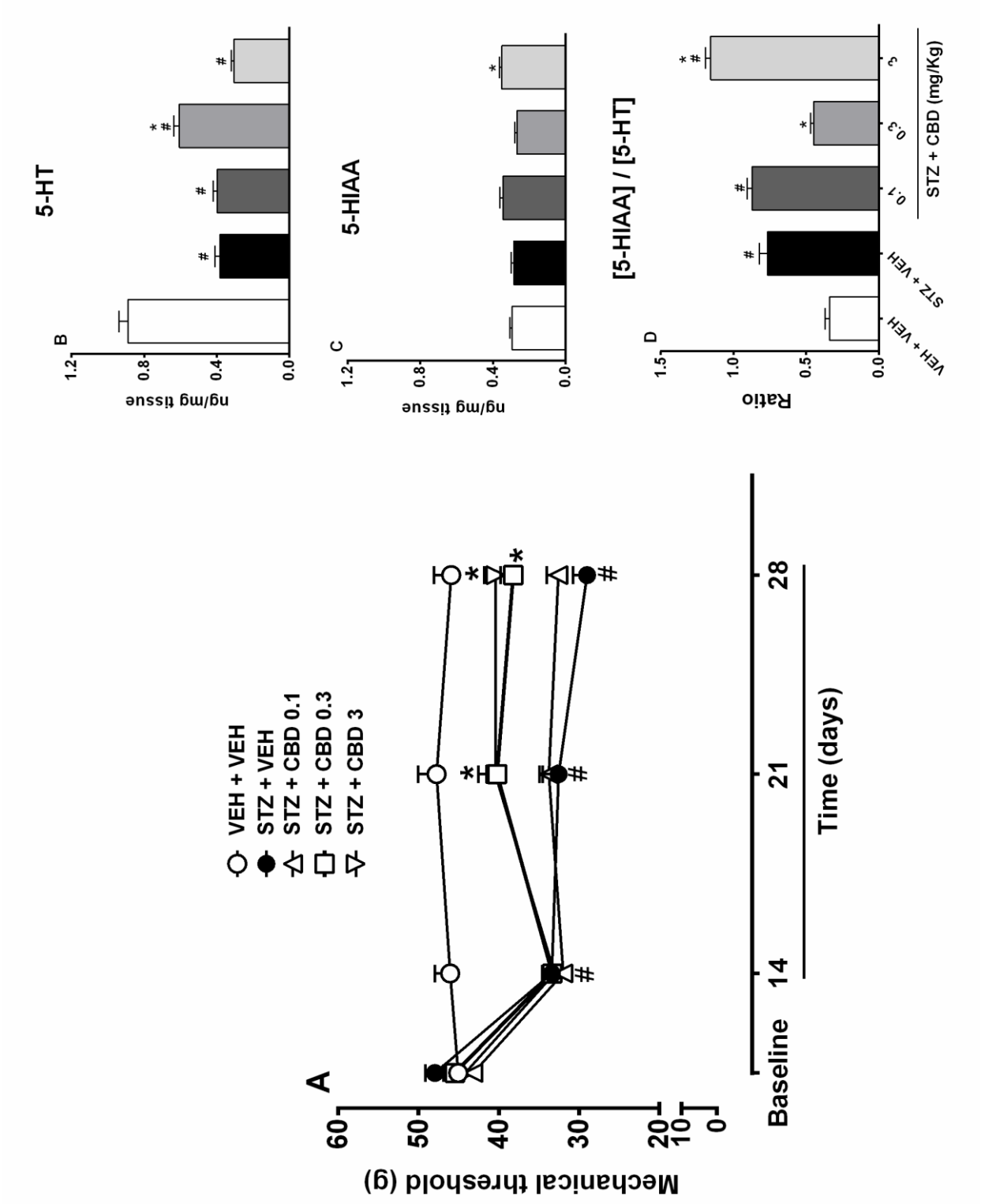
A
Mechanical threshold (g)
Time (days)
Baseline
14
21
28
VEH + VEH
STZ + VEH
STZ + CBD 0.1
STZ + CBD 0.3
STZ + CBD 3
B
5-HT
ng/mg tissue
C
5-HIAA
ng/mg tissue
D
[5-HIAA] / [5-HT]
Ratio
VEH + VEH
STZ + VEH
0.1
0.3
3
STZ + CBD (mg/Kg)

FIGURE 5

ANEXO 1 – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA

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

Nº 1007

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.153016/2016-11

APROVADO/APPROVAL: 13/09/2016 – R.O. 08/2016

TÍTULO: Avaliação do potencial antinociceptivo do canabidiol sobre a dor neuropática em ratos com diabetes induzido quimicamente por estreptozotocina.

TITLE: Evaluation of potential antinociceptive effect of cannabidiol on neuropathic pain in rats with diabetes chemically induced by streptozotocin.

AUTORES/AUTHORS: Joice Maria da Cunha, Carlos Henrique Alves Jesus.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia

Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Coordenadora da CEUA