

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISADORA ELISA CRISTIANE DE ANDRADE

**EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO NA ALODINIA MECÂNICA E NA DEPRESSÃO
ASSOCIADAS AO DIABETES**

CURITIBA

2019

ISADORA ELISA CRISTIANE DE ANDRADE

**EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO NA ALODINIA MECÂNICA E NA DEPRESSÃO
ASSOCIADAS AO DIABETES**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha.
Colaboradora: M. Sc. Rosanne Bortolazzo Pinto.

CURITIBA

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por me dar forças e coragem para continuar e por me dar a oportunidade de cada dia mais aprender, conhecer e realizar.

Aos meus pais, Gilmar e Cecília, sem os quais eu não teria nem mesmo o privilégio da vida, e ao meu irmão, Murillo. Agradeço imensamente todo o incentivo, o apoio e a força em sempre me proporcionar o melhor possível. Lembro-me com ternura até de pequenos atos que demonstraram seu amor por mim. Eu amo vocês infinitamente!

Ao meu filho, Matheus, que foi uma das maiores razões pelas quais eu persisti e encarei todos os desafios. Sou grata por ser mãe de uma criança tão especial e maravilhosa, que me faz lembrar todos os dias do sentido de todas as coisas. Meu amor por você é impossível de ser medido e é eterno!

Ao Wilson, pelo apoio imensurável, por todos os momentos de grande luta enfrentados comigo, por toda a paciência e tranquilidade que me transmitiu em situações que pareciam sem solução. A você, não tenho palavras para expressar tamanha gratidão, por me ter amparado e me possibilitado estar aqui hoje. Te admiro e te amo muito!

À minha orientadora, Profa. Dra. Joice Maria da Cunha, por sempre ter deixado as portas do laboratório abertas pra mim, pelos ensinamentos, pela confiança, pela compreensão quando necessitei e pela capacitação para realização deste trabalho. Meu muito obrigada!

Aos colegas de laboratório, por todo o auxílio prestado durante a pesquisa. Em especial, à Alexia, que me ajudou em diversos momentos, sempre com muita atenção e vontade em colaborar.

Às minhas queridas amigas que tive o privilégio de conhecer na Universidade, Milena, Bruna e Beatriz, que fizeram com que o processo fosse mais tranquilo e me deram suporte quando necessitei. Mi, nunca esquecerei do nosso apoio mútuo no meio de tantos sentimentos que somente nós entendíamos. Bru, você me transmitiu coragem em muitos momentos com suas palavras, talvez até em situações que você não imagine. Obrigada!

À Rosanne Bortolazzo, que deu início a este estudo e me deu a oportunidade de continuar sua pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos durante a minha iniciação científica e pela sua amizade!

À Universidade Federal do Paraná e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

RESUMO

O diabetes mellitus é uma doença crônica e multifatorial, que resulta em diversas complicações, dentre elas a dor neuropática e a depressão. A dor neuropática é uma dor crônica, sendo uma complicação de extrema importância no diabetes. A depressão é um transtorno excessivamente debilitante que acarreta em problemas pessoais e sociais. O tratamento da dor neuropática e da depressão associadas ao diabetes é um desafio clínico. Assim, novas alternativas devem ser investigadas. O ácido elágico é um polifenol natural que conta com diversas ações terapêuticas, incluindo o efeito antioxidante, que é interessante pois o estresse oxidativo pode ser um dos mecanismos desencadeantes comuns na fisiopatologia dessas complicações. Sugere-se que um dos mecanismos antioxidantes do ácido elágico seja pela ativação do fator de transcrição Nrf2, que regula genes citoprotetores. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito do tratamento crônico com ácido elágico sobre a dor neuropática e depressão associadas ao diabetes. Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos divididos em: normoglicêmicos tratados com veículo (volume equivalente, v.o.), diabéticos tratados com veículo (volume equivalente, v.o.), diabéticos tratados com antidepressivo imipramina (10 mg/kg i.p.) e diabéticos tratados com ácido elágico (75, 100 e 150 mg/kg, v.o.). Os animais foram tratados por 19 dias, que começou duas semanas após o estabelecimento do diabetes experimental por administração única de estreptozotocina (60 mg/kg i.p.). O teste de Von Frey Eletrônico foi utilizado para avaliar alodinia mecânica, o teste de nado forçado para avaliar o comportamento tipo-depressivo e o teste de campo aberto para analisar atividade locomotora. O envolvimento da inibição do estresse oxidativo e da expressão de Nrf2 foi avaliado por meio de *western blotting* e pela determinação dos níveis de lipídeos peroxidados (LPO). Foi observado que os animais diabéticos apresentam uma redução significativa do limiar de retirada da pata na terceira semana após indução do diabetes, e o pico ocorre na quinta semana. Esses animais também apresentaram um aumento significativo do tempo de imobilidade, em comparação aos normoglicêmicos, na quinta semana após indução do diabetes. O tratamento com imipramina ou com ácido elágico (75 ou 100 mg/kg) foi capaz de reverter a alodinia mecânica nos animais, evidenciado pelo aumento do limiar de retirada da pata; e imipramina ou ácido elágico (75 mg/kg) causou um efeito do tipo-antidepressivo nos animais, pela diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Não houve prejuízo motor no teste de campo aberto. Os animais diabéticos também apresentaram uma redução significativa da expressão de Nrf2 no hipocampo e no cordão espinhal. Os animais tratados com imipramina tiveram uma expressão de Nrf2 significativamente maior nos dois tecidos, enquanto que os tratados com ácido elágico (75 mg/kg) tiveram aumento da expressão apenas no cordão espinhal. Sobre os níveis de hidroperóxidos lipídicos, estes ficaram significativamente aumentados nos diabéticos-veículo. O tratamento com ácido elágico foi capaz de diminuir significativamente esses níveis na dose de 75 mg/kg no córtex pré-frontal, e na dose de 100 mg/kg no ciático. Esses resultados evidenciam uma atividade antioxidante do ácido elágico, que parece ocorrer pela ativação da via Keap1-Nrf2, e que o ácido elágico pode representar uma alternativa para o tratamento da dor neuropática e da depressão associadas ao diabetes.

Palavras-chave: ácido elágico, estreptozotocina, dor neuropática, depressão, neuropatia, Nrf2.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. JUSTIFICATIVA.....	10
2. OBJETIVOS	10
2.1. OBJETIVO GERAL	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. DIABETES E SUAS COMPLICAÇÕES.....	11
3.2. DOR NEUROPÁTICA ASSOCIADA AO DIABETES	12
3.3. DEPRESSÃO ASSOCIADA AO DIABETES.....	13
3.4. TRATAMENTOS PARA DOR NEUROPÁTICA E DEPRESSÃO ASSOCIADAS AO DIABETES.....	13
3.5. ESTRESSE OXIDATIVO COMO MECANISMO FISIOPATOLÓGICO COMUM ENTRE DOR NEUROPÁTICA E DEPRESSÃO ASSOCIADAS AO DIABETES.....	15
3.6. ÁCIDO ELÁGICO	16
3.7. A VIA KEAP1-NRF2.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. ANIMAIS	18
4.2. DROGAS	18
4.3. INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO DIABETES.....	19
4.4. TESTE DE NADO FORÇADO.....	19
4.5. TESTE DE CAMPO ABERTO.....	20
4.6. ESTIMULAÇÃO MECÂNICA (TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO)	20
4.7. EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS.....	21
4.8. WESTERN BLOTTING (WB).....	21
4.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS NÍVEIS DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS (LOOH).....	22
4.10. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	22
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1 ALODINIA MECÂNICA E COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ	24
5.2 EFEITO DA IMIPRAMINA SOBRE A ALODINIA MECÂNICA, COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ.....	25

5.3 EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A ALODINIA MECÂNICA, COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ	29
5.4 EFEITO DA IMIPRAMINA E DO ÁCIDO ELÁGICO NA EXPRESSÃO DE NRF2 NO CORDÃO ESPINHAL E NO HIPOCAMPO DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ	32
5.5 EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE OS NÍVEIS DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ	33
5.6 EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO E IMIPRAMINA SOBRE O PESO E A GLICEMIA DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ	34
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	39

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma patologia crônica e multifatorial, caracterizada por níveis de glicose sanguínea aumentados (Yanar et al., 2019). Esse distúrbio causa resistência à insulina, fazendo com que haja uma demanda crescente do hormônio, que mantém a homeostase da glicemia, o que leva a uma disfunção nas células β -pancreáticas (Julia Sbierski-Kind et al., 2019). As complicações crônicas do DM são diversas, como retinopatia, nefropatia, doenças cardiovasculares e neuropatia, causadas principalmente pelo estresse oxidativo e inflamação (Yanar et al., 2019).

A dor neuropática (DN) ocorre como resultado de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial. Os sintomas da DN podem permanecer mesmo após tratamento da lesão inicial e a terapêutica clássica utilizada, como antidepressivos, antiepilépticos e analgésicos que não é efetiva para tratar a dor a longo prazo (Jain et al., 2013). É descrito portanto que apenas um terço dos pacientes atinge alívio da dor superior a 50% (Jensen et al., 2007). A dor afeta gravemente a qualidade de vida do paciente, considerando que até mesmo o toque de um lençol pode tornar-se doloroso. A DN possui diversos processos fisiopatológicos, e são caracterizados principalmente o estresse oxidativo e inflamação, com estudos demonstrando que a diminuição destes processos leva a atenuação da dor em ratos diabéticos (Dong et al., 2019).

Outra complicação que está relacionada ao DM é a depressão, caracterizada como uma síndrome em que há uma associação de cinco ou mais sintomas, em que ao menos um deve ser humor deprimido ou perda de interesse e prazer (Semenkovich et al., 2015). Estudos demonstram que a taxa de depressão é significativamente maior em pacientes diabéticos, em comparação com indivíduos normoglicêmicos (Weyerer et al., 1989; Anderson et al., 2001; Ali et al., 2006). O tratamento da depressão nos pacientes diabéticos parece ser igualmente um desafio clínico pela alta taxa de refratariedade, pelos inúmeros efeitos adversos e pelo fato de que muitos fármacos alteram o metabolismo de carboidratos e causam ganho de peso (Bystritsky et al., 2014; Zanoveli et al., 2015).

Em vista disso, a necessidade de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da DN e da depressão em pacientes diabéticos é cada vez maior. Considerando que parece haver uma relação entre os mecanismos fisiopatológicos da DN e da depressão em pacientes diabéticos, envolvendo o estresse oxidativo e

inflamação (Kim et al., 2004; Yowtak et al., 2011; Obrosova et al., 2005; Ramos et al., 2007), a terapia com o ácido elágico pode ser de grande auxílio para esses pacientes, pois é sabido que este composto tem efeito anti-inflamatório e antioxidante (BenSaad et al., 2017; Marín et al., 2013; Derosa et al., 2016), e pode assim, representar uma alternativa para o tratamento destas complicações do diabetes.

1.1. JUSTIFICATIVA

O diabetes é uma doença de alta prevalência, sendo as suas complicações extremamente debilitantes. A dor neuropática e a depressão associadas ao diabetes comprometem significativamente a qualidade de vida dos pacientes, por afetarem até mesmo tarefas simples do dia a dia, além de diminuir as chances de controle do diabetes. Ademais, os fármacos utilizados atualmente não são completamente eficientes para o tratamento destas complicações nos diabéticos. Dessa forma, se faz necessária a busca por novas terapias, com maior efetividade e menores efeitos adversos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ácido elágico na alodinia mecânica e no comportamento do tipo-depressivo em ratos com DM induzido por estreptozotocina (STZ).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito do tratamento com ácido elágico, em diferentes doses, na alodinia mecânica e no comportamento do tipo-depressivo em ratos com DM induzido por STZ;
- b) Avaliar o efeito do tratamento com ácido elágico sobre a expressão de Nrf2;
- c) Avaliar o efeito do tratamento com ácido elágico sobre os níveis de lipídeos peroxidados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. DIABETES E SUAS COMPLICAÇÕES

Segundo a *American Diabetes Association*, o DM é uma disfunção metabólica que apresenta hiperglicemia crônica, por defeitos na produção ou na ação da insulina, ou ambos, que leva a diversos danos a longo prazo. Em 2010, a estimativa de prevalência de DM em adultos foi de 6,6% da população mundial e espera-se um aumento para 7,8% até o ano de 2030 (Ribeiro et al., 2017).

De acordo com a *International Diabetes Federation*, a doença afeta 463 milhões de pessoas no mundo, destas 79% estão em países em desenvolvimento e estima-se uma morte a cada sete segundos. Estima-se também que o número de diabéticos em 2045 cresça para 629 milhões.

No Brasil, a prevalência foi de 7,6% na população adulta, em 1980. Já em 2017, a prevalência subiu para 9,6%, com estimativa de 12,5 milhões de pessoas diagnosticadas, com faixa etária de 20 a 79 anos. A taxa de mortalidade por DM na América do Sul, em 2017, foi de 209.717 pessoas entre 20 e 79 anos, onde 49,9% foram de pessoas com menos de 60 anos. Metade dessas mortes aconteceram no Brasil. Atualmente, estima-se que há mais de 16,5 milhões de diabéticos no Brasil.

O DM é responsável por diversas complicações, como consequência da hiperglicemia, que atingem diferentes órgãos, principalmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Essas complicações estão relacionadas a alterações em vias metabólicas, principalmente pela formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs), aumento na expressão de receptores de AGEs (RAGEs), e aumento do metabolismo da glicose pela via dos polióis, que levam a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROS) (Coughlan et al., 2009; Nishikawa; Araki, 2006). A produção de EROS em excesso concomitantemente a redução da atividade antioxidante endógena leva ao estresse oxidativo nas células causando danos ao DNA, onde ocorre oxidação da desoxirribose, quebra da fita e uma variedade de modificações nas bases; peroxidação lipídica, pelo ataque de radicais livres aos ácidos graxos poli-insaturados, que gera radicais peróxido instáveis e reativos, capaz de propagar a reação em cadeia, o que leva ao aumento da fluidez e permeabilidade da membrana; alterações em proteínas, principalmente por modificações diretas, como a carbonilação de proteínas e fragmentação da cadeia polipeptídica, aumentando também a taxa de degradação (Sharma et al., 2012); além de alterar a

expressão gênica, modificando a atividade de fatores de transcrição (Apel; Hirt, 2004). Essas alterações em biomoléculas causadas pelo estresse oxidativo tem sido associadas a fisiopatologia da DN e depressão (Kim et al., 2004; Yowtak et al., 2011; Bittar et al., 2017; Eren et al., 2007), que merecem destaque pois diminuem significativamente a qualidade de vida dos pacientes.

3.2. DOR NEUROPÁTICA ASSOCIADA AO DIABETES

A DN é uma dor crônica que pode ocorrer em caso de alguma lesão ou disfunção no sistema nervoso somatossensorial, como consequência da ativação anormal da via nociceptiva. Essa dor se difere de uma dor crônica nociceptiva por apresentações clínicas e tratamentos diferentes (muitos fármacos utilizados para o tratamento da dor crônica não são eficientes para o tratamento de DN) (Baron et al., 2016). Diferentemente da dor nociceptiva, a DN possui sintomas positivos (ganho de função somatossensorial) e negativos (perda de função somatossensorial). Os sintomas positivos são caracterizados por sensações de queimadura, picadas, formigamento ou dor, sendo que as respostas comumente incluem hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos dolorosos) e alodinia (dor a estímulos não dolorosos), enquanto que nos sintomas negativos há uma diminuição ou ausência da sensação (Hébert et al., 2017; Zilliox et al., 2017).

A DN é uma importante complicação do DM, considerando que afeta mais de 50% dos pacientes com neuropatia, sendo um dos problemas mais comuns e mais debilitantes do DM (Bouhassira et al., 2013; Abbott et al., 2011). A qualidade de vida destes pacientes é afetada de forma significativa, considerando que a dor dificulta até mesmo as atividades diárias dos indivíduos, além de predispor ansiedade e depressão. A DN diabética é de difícil tratamento, principalmente por ser refratária aos diversos tratamentos disponíveis, mesmo em combinação. Ademais, são relatados muitos efeitos colaterais e baixa efetividade (Zilliox et al., 2017). Os mecanismos que desencadeiam a DN ainda não são completamente conhecidos, porém já estão bem caracterizados o envolvimento da sensibilização periférica, aumento da função de canais de sódio (Na_v 1.7, Na_v 1.8 e Na_v 1.9) e cálcio e brotamento de neurônios simpáticos no gânglio da raiz dorsal (Zilliox et al., 2017; Sloan et al., 2018).

3.3. DEPRESSÃO ASSOCIADA AO DIABETES

O transtorno depressivo maior afeta mais de 300 milhões de pessoas, sendo uma das condições de saúde mental mais preponderante do mundo. É caracterizado por períodos em que a pessoa experimenta tristeza, culpa e perda de interesse ou prazer que persistem por longos períodos e não são provocados por drogas ou outros estímulos (Zhao Wenming et al., 2019). Este transtorno é demasiadamente debilitante, pois acarreta muitos problemas pessoais e sociais. Há também, uma alta taxa de recorrência, com mais de 50% dos indivíduos apresentando recidiva (Zhao Wenming et al., 2019; Hamilton et al., 2019; Smith et al., 2014).

A causa da depressão pode ser por fatores genéticos ou ambientais, porém a etiologia ainda não é bem definida (Zhao Wenming et al., 2019). A ocorrência de depressão em pacientes diabéticos é de 8,5-27,3%, e estudos mostram que o diabetes aumenta o risco de depressão (Zhang et al., 2018; Zanoveli et al., 2016; Blazer et al., 2002). Também há evidências de que a depressão piora determinadas condições do DM, como o controle da glicemia, perda de produtividade, aumento do risco de infarto e risco de morte, além de diminuir a adesão ao tratamento do DM (Lustman et al., 2000; Egede et al., 2010; Gonzalez et al., 2008; Petrak et al., 2015). Sugere-se ainda, que há uma correlação entre DM e depressão, com o DM levando a depressão e a depressão levando ao DM (Zanoveli et al., 2016; Mezuk et al., 2008; Anderson et al., 2001; Knol et al., 2006; Mukherjee et al., 2019, Zhuang et al., 2017).

3.4. TRATAMENTOS PARA DOR NEUROPÁTICA E DEPRESSÃO ASSOCIADAS AO DIABETES

O controle da DN diabética tem o controle glicêmico como medida profilática e é feito pelo uso de medicamentos de diversas classes farmacológicas (Schreiber et al., 2015). Atualmente, os fármacos de primeira linha para o tratamento da DN são anticonvulsivantes, principalmente a pregabalina, gabapentina e lamotrigina, e os antidepressivos, especialmente os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (SNRIs), como duloxetina e venlafaxina, além dos tricíclicos, amitriptilina e nortriptilina, por exemplo. Também são utilizados opioides, como tramadol e a morfina em associação com os fármacos de primeira linha para um controle mais efetivo (Akter et al., 2019). Outros estudos ainda sugerem que o uso de

lidocaína tem um efeito de alívio da DN a curto prazo (Kanai et al., 2009). Ainda foi demonstrado efeito na DN com a administração de canabinoides, incluindo spray de *Sativex* (Nurmikko et al., 2007). No entanto, o efeito é modesto e outro estudo teve resultado conflitante (Selvarajah et al., 2010).

O grande desafio do tratamento com estes medicamentos são os efeitos colaterais, que no caso dos antidepressivos incluem forte sonolência, sedação, hipotensão ortostática, arritmias e, de grande importância, hiperglicemia, que piora ainda mais as complicações associadas ao DM (Goldstein et al., 2005; Jongen et al., 2013). Para os anticonvulsivantes, os efeitos mais comuns são dor de cabeça, problemas gastrointestinais, tonturas e ganho de peso (Jongen et al., 2013; Akter et al., 2019). Os opioides também apresentam diversos efeitos, como constipação, náuseas e dor de cabeça (Schreiber et al., 2015; Baron et al., 2010).

Além dos problemas causados pelos efeitos adversos, a melhora da dor é muito limitada, considerando que apenas uma pequena parcela dos pacientes tem alívio efetivo da dor (Finnerup et al., 2010), com menos de um terço dos pacientes obtendo alívio superior a 50% da DN diabética (Jensen et al., 2007), mostrando a necessidade de novas estratégias para o manejo da DN associada ao diabetes.

O tratamento da depressão associada ao DM consiste basicamente no uso de antidepressivos. A depressão é um dos sintomas mais negligenciados do diabetes, e o tratamento para esses pacientes é, muitas vezes, ineficiente e refratário (Zanovelli et al., 2016). Os fármacos mais utilizados atualmente para a depressão são os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs) (Mukherjee et al., 2019; Semencovich et al., 2015), que têm um importante efeito colateral para os diabéticos, de hipoglicemia (Mukherjee et al., 2019). Outros antidepressivos que podem ser utilizados para o tratamento são os tricíclicos, que causam hiperglicemia e ganho de peso como os principais efeitos adversos para os diabéticos (Mukherjee et al., 2019, Zanovelli et al., 2015). Apesar dos tratamentos disponíveis, cerca de 70% dos pacientes não obtém uma melhora efetiva com as terapias (Semencovich et al., 2015), sendo de grande importância a busca por terapias alternativas para esta complicação.

3.5. ESTRESSE OXIDATIVO COMO MECANISMO FISIOPATOLÓGICO COMUM ENTRE DOR NEUROPÁTICA E DEPRESSÃO ASSOCIADAS AO DIABETES

Devido as interrelações entre DM, DN e depressão, é possível hipotetizar que o desenvolvimento destas patologias e complicações possam dividir mecanismos fisiopatológicos desencadeadores comuns. O estresse oxidativo pode ser um destes mecanismos, uma vez que a sua prevenção pode alterar estes parâmetros.

O estresse oxidativo ocorre quando há uma hiperprodução de radicais livres, que excede a capacidade antioxidante endógena. Esse processo leva à oxidação de biomoléculas, o que resulta em perda de suas funções e desequilíbrio homeostático (Barbosa et al., 2010). O sistema antioxidante endógeno inclui enzimas capazes de controlar o dano oxidativo nas células, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Júnior et al., 2001).

A SOD catalisa a reação de superóxido (O_2^*) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A partir disto, a CAT e a GPx agem para impedir o acúmulo de H_2O_2 (Barbosa et al., 2010).

A GPx é responsável por reduzir H_2O_2 em H_2O , e sua atividade depende da conversão de glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSH). A glutathione reductase (GRd) tem uma importante função de reduzir GSSH em GSH, que permite a manutenção do ciclo redox da glutathione (Huber et al., 2008).

Estudos demonstram que a atenuação do estresse oxidativo pela administração de antioxidantes exógenos é benéfica para a diminuição da DN diabética (Kiasalari et al., 2017; Dong, 2019; Pacher et al., 2005), assim como há evidências de aumento da peroxidação lipídica, redução da atividade da SOD e depleção de glutathione em nervos de ratos diabéticos (Cunha et al., 2008; Olukman et al., 2018). Quanto a depressão, estudos mostram anormalidades nos níveis de produtos de peroxidação lipídica, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (marcador de dano oxidativo do DNA) e vitaminas C e E; e também na atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT, GPx e GRd (Nabavi et al., 2015; Maes et al., 2009).

Outros fatores como carbonilação de proteínas, metabólitos de óxido nítrico, hidroperóxidos lipídicos e diminuição do potencial antioxidante total, têm sido associados com a depressão maior, além do aumento de níveis urinários de F2-isoprostanos, um importante marcador de estresse oxidativo. Também há uma correlação entre a gravidade da depressão e níveis de peróxido e xantina oxidase e o

aumento da oxidação de lipoproteínas. E ainda há relatos de correlação positiva entre o estresse oxidativo e a escala de avaliação de depressão de Hamilton, utilizada para determinar a gravidade da depressão (Nabavi, 2015; Maes et al., 2012). O cérebro possui uma pobre defesa antioxidante, tem um consumo elevado de oxigênio e é rico em ácidos graxos poli-insaturados que sofrem oxidação, se tornando assim, muito propenso aos danos causados pelo estresse oxidativo (Shichiri, 2014; Wang; Michaelis, 2010), que afeta áreas relacionadas a depressão, como o hipocampo e o córtex pré-frontal (Ways et al., 2013; De Moraes et al., 2014).

3.6. ÁCIDO ELÁGICO

O ácido elágico é um polifenol natural, encontrado em diversas frutas, particularmente romã, framboesa, morango, pêssigo, caqui, nozes e legumes (Derosa et al., 2016).

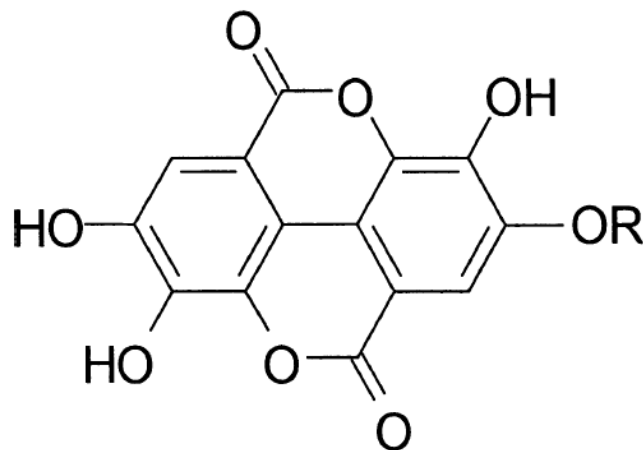


Figura 1. ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ELÁGICO. **FONTE:** Adaptado de UEDA et al. (2004).

Estudos mostram que o ácido elágico impede a peroxidação lipídica, tem efeito antioxidante (Derosa et al., 2016); anti-inflamatório (BenSaad et al., 2017; Marín et al., 2013); anticarcinogênico (Vattem; Shetty, 2005), melhora a função cardiovascular (Jordão et al., 2017), possui propriedades antinociceptivas (Naghizadeh et al., 2016), além de ser um potencial agente hipoglicemiante, um fator de grande interesse para o tratamento dos diabéticos (Jadhav; Puchchakayala, 2012; Amin; Arbid, 2017; Fatima et al., 2017). Além disso, sugere-se que o ácido elágico tenha um efeito antidepressivo

por modular a neurotransmissão monoaminérgica no sistema nervoso central (Pathak et al., 2013).

Considerando o exposto, o ácido elágico mostra-se um potencial composto para o tratamento das complicações do diabetes, como a dor e a depressão.

3.7.A VIA KEAP1-NRF2

A via Keap1-Nrf2 participa da proteção celular e seu papel está ligado principalmente a diminuição do estresse oxidativo e defesa contra xenobióticos. Atualmente, esta via é caracterizada como um dos principais sistemas de defesa celular (Lin, 2019). O Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor*) é um fator de transcrição que atua ativando genes que possuem elementos de resposta antioxidante em sua região promotora (Kobayashi; Yamamoto, 2005; Maes, 2012). O Nrf2 regula diversos genes citoprotetores que codificam proteínas antioxidantes e desintoxicantes de fase II, tais como glutathione S-transferase e NAD(P)H desidrogenase, CAT, SOD, GPx, UDP-glicuronil transferase e epóxido hidrolase microsomal (Yama, 2016; Kobayashi, 2005).

Em condições normais, o Nrf2 é regulado negativamente pela proteína citoplasmática Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), que se liga ao fator de transcrição Nrf2, sequestrando-o no citoplasma e levando a sua degradação pela via ubiquitina-proteassoma. Contudo, em situações de dano celular por estresse oxidativo ou presença de eletrófilos, o Nrf2 é dissociado da Keap1, através de uma mudança na conformação da proteína, provocada pela ligação dos radicais livres ou dos eletrofilos em grupos tiol de resíduos de cisteína presentes na proteína, assim o fator é estabilizado nos núcleos, formando heterodímeros com proteínas sMaf (*small Maf*), os quais se ligam a elementos de resposta eletrofílica (EpRE) ou a elementos de resposta antioxidante (ARE), ativando os genes-alvo para citoproteção (Taguchi et al., 2011; Kobayashi, 2005). Interessantemente, estudos mostraram que a via Keap1-Nrf2 está envolvida também com respostas anti-inflamatórias (Kundu; Surh, 2010; Kim et al., 2010).

A via Keap1-Nrf2 é ativada pela administração de diversos compostos naturais, dentre eles o ácido elágico. Vários estudos tem relacionado o efeito antioxidante do ácido elágico a sua ação sobre a via Keap1-Nrf2 (Wang et al., 2019; Polce et al., 2018;

Baluchnejadmojarad et al., 2017; Ding et al., 2014; Gu et al., 2014; Panchal et al., 2013). Exemplo disso, é a demonstração *in vitro* de que o ácido elágico diminui os níveis de Keap1 e aumenta os níveis de Nrf-2, causando redução significativa da produção de EROS e aumento da atividade da SOD (Ding et al., 2019). Ademais, Hseu e colaboradores (2012), avaliaram o efeito antioxidante do ácido elágico sobre células HaCat, e evidenciaram o papel da via Keap1-Nrf2 pelo aumento da expressão de Nrf2 e SOD, juntamente com a diminuição de Keap1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar pesando entre 180 a 220 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação, com água e ração *ad libitum*. Os animais diabéticos foram mantidos em número reduzido por caixa e a maravalha foi trocada diariamente. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas e legislações estabelecidas e aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR (CEUA-UFPR) e só foram iniciados após a aprovação do protocolo experimental, sob número do CEUA 725.

4.2. DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas: ácido elágico (AE; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), imipramina (IMI; Indústria Farmacêutica Novartis, Brasil) estreptozotocina (STZ; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) e tiopental sódico (Indústria Farmacêutica Cristália, Brasil). O ácido elágico foi preparado como uma suspensão em carboximetilcelulose 0,5% e administrado diariamente por via oral (v.o) nas doses de 75, 100 ou 150 mg/Kg. A imipramina, um antidepressivo tricíclico que foi utilizado como controle positivo para o efeito tipo-antidepressivo e antinociceptivo, foi dissolvida em soro fisiológico estéril e administrada diariamente por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 10 mg/Kg. Os tratamentos foram iniciados após a avaliação dos parâmetros comportamentais na segunda semana após a indução do diabetes experimental por estreptozotocina (STZ) e mantidos por 19 dias (do 17º ao

35º dia após a indução do diabetes). A STZ foi diluída em tampão citrato 10 mM, pH 4,5 e administrada em uma única dose de 60 mg/Kg por via i.p. no dia da indução do diabetes experimental. O tiopental sódico foi administrado em uma única dose de 100 mg/Kg i.p. no dia da eutanásia. Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes da aplicação e administradas em um volume de 1 ml/kg. As doses e vias foram estabelecidas com base em estudos prévios (Zanoveli et al., 2005; Joca et al., 2003; Uzar et al., 2012; Jin et al., 2013; Schreiber et al., 2012;).

4.3. INDUÇÃO EXPERIMENTAL DO DIABETES

A indução do diabetes foi realizada por administração única de estreptozotocina (STZ, 60 mg/Kg, i.p., diluída em tampão citrato, 10 mM, pH 4,5) em ratos previamente submetidos a jejum de 12 horas. A confirmação do diabetes foi realizada três dias após a injeção de STZ, 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 Active™*, Roche). Somente animais com glicemia igual ou superior a 250 mg/dL foram considerados diabéticos e mantidos nos experimentos. Grupos controles normoglicêmicos receberam somente tampão citrato (10 mM, pH 4,5, volume equivalente).

4.4. TESTE DE NADO FORÇADO

Neste procedimento, realizado conforme Porsolt e colaboradores (1979), os animais foram colocados individualmente para nadar em cilindros de plástico com 20 cm de diâmetro por 50 cm de altura, contendo 30 cm de água na temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 15 minutos (pré-teste). Vinte e quatro horas após o pré-teste, os animais foram submetidos a uma sessão de 5 minutos de nado forçado (sessão teste). Durante esta sessão foi avaliado o tempo de imobilidade total durante 5 minutos. O teste é baseado no tempo de imobilidade total dos animais, que são obrigados a nadar em cilindro do qual não podem escapar. O comportamento do tipo depressivo é relacionado ao aumento no tempo de imobilidade, quando os animais cessam as tentativas de escapar, mantendo apenas pequenos movimentos para que a cabeça

fique acima da água, enquanto o possível efeito tipo-antidepressivo é relacionado a uma redução no tempo de imobilidade.

Entre um animal e outro, a água foi reposta e o cilindro limpo adequadamente. Após cada sessão de pré-teste e teste, os animais foram submetidos à secagem com panos limpos e secos em uma caixa separada antes de retornarem para suas caixas originais.

4.5. TESTE DE CAMPO ABERTO

O procedimento foi realizado de acordo com Sielgel (1946), em que animais são colocados individualmente no centro de uma caixa redonda dividida em 19 quadrantes, onde andam livremente por 5 minutos. A análise da atividade locomotora é realizada pela quantificação do número total de cruzamentos entre um quadrante e outro durante este período.

4.6. ESTIMULAÇÃO MECÂNICA (TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO)

O teste de Von Frey foi utilizado para avaliação de alodinia mecânica, por meio de pressão crescente aferida na pata dos ratos, com o auxílio de um aparelho analgesímetro eletrônico (*INSIGHT* Ltda, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O Von Frey Eletrônico possui um transdutor de força, e o seu contato com a pata do animal é feito por meio de uma ponteira de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, com assoalho de rede de malha igual a 5 mm², feita de arame não maleável de 1 mm de espessura, por 15 minutos antes do experimento, para adaptação. Em seguida, foi aplicada força linearmente crescente no centro da planta da pata do rato e o estímulo foi cessado quando o animal apresentou resposta de retirada ou sacudida da pata. Foram realizadas repetições do estímulo até o animal apresentar três respostas de retirada.

A intensidade da alodinia mecânica foi quantificada pela média dos três valores expressos em gramas observada antes da administração de STZ (estado basal), na terceira semana após a indução do diabetes e após o tratamento (quinta semana após a indução do diabetes).

4.7. EUTANÁSIA E COLETA DOS TECIDOS

Um dia após a última medida de alodinia mecânica (36 dias após a indução do diabetes), os ratos foram eutanasiados por overdose de tiopental (100 mg/kg, i.p.) seguida por deslocamento cervical. O quadrante anterior do cordão espinhal (na altura das vértebras L4-L6), o hipocampo, o córtex pré-frontal, o nervo ciático e gânglios da raiz dorsal (L4-L6, bilateralmente) foram coletados e armazenados em freezer a -80°C até a realização das análises de *western blotting* e testes bioquímicos de estresse oxidativo.

4.8. WESTERN BLOTTING (WB)

Para analisar a expressão de Nrf2 nos tecidos coletados, foi realizado o WB, que identifica proteínas específicas com o uso de anticorpos. As amostras foram homogeneizadas em solução tampão RIPA contendo TRIS (50 mmol/L), NaCl (150 mmol/L), SDS (1%), deoxicolato de sódio (0,5%), PMSF (0,1 mM) e EDTA (0,1 mM). Os homogenatos foram mantidos em gelo por 30 minutos e sonicados duas vezes por 20 segundos no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 12.000 rpm. Os sobrenadantes foram separados e diluídos 10 vezes em tampão PBS 1X e a quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), de acordo com instruções do fabricante. Logo após, 40ug de proteína de cada amostra foi separada em géis de poliacrilamida a 10% por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e submetidas à reação de WB. Para o procedimento, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (PVDF, BioRad) por 1 hora sob corrente constante de 15V em tampão de transferência gelado (39mM de glicina, 48mM de Tris-base, 0,037% de SDS e 20% metanol) pelo aparato Trans-Blot Semi-Dry (Bio-Rad). Depois da transferência, a membrana foi bloqueada por 1 hora a temperatura ambiente, com tampão de bloqueio TBST (120mM de NaCl, 20mM de Tris-base e 0,05% de Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo policlonal de coelho anti-Nrf2 (1:300, Santa Cruz Biotechnology) previamente diluído em tampão de bloqueio. A reação com o anticorpo primário foi realizada a 4°C por 16 horas sob constante agitação. As membranas foram lavadas com TBST, três vezes por 5 minutos cada, e

incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG acoplado a HRP (1:6000, Sigma-Aldrich), diluído em tampão de bloqueio, por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram submetidas a novas lavagens com TBST e incubadas com substrato adequado para reação quimioluminescência (Westar Supernova-Cyanagen), expondo-as a filme radiográfico (Carestream) até obtenção de sinal adequado, para verificação da presença da banda de interesse. A proteína β -actina foi utilizada para normalização e comparação dos resultados. Os filmes foram analisados por densitometria com o software ImageJ (NIH).

4.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS NÍVEIS DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS (LOOH)

As amostras foram homogeneizadas em 200 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,5). O homogenato foi utilizado para determinar os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), que são os produtos primários da peroxidação lipídica. O conteúdo foi determinado pelo método descrito por Jiang, Hunt e Wolff (1992), a partir do ensaio de oxidação do íon ferroso/laranja de xilenol (FOX2). Adiciona-se 10 μ L de metanol 90% à 100 μ L do homogenato. A mistura foi sonicada e centrifugada a 9000 g por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi então misturado ao reagente FOX2 e encubado por 30 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi lida por meio de leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808), à 560 nm, e os resultados foram expressos como mmol/g de tecido.

4.10. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Conforme delineado na figura 2, os animais foram levados do biotério central até o biotério do laboratório de farmacologia da dor e tiveram dois dias para ambientação. Após, foi realizado o teste de Von Frey Eletrônico (medida basal). Em seguida, após 12 horas de jejum, os animais para os grupos de diabéticos receberam STZ (60 mg/kg, i.p.) e os animais normoglicêmicos receberam tampão citrato (10 mM, pH 4,5, volume equivalente). A indução do diabetes experimental foi confirmada após 3 dias e foi caracterizada pela glicemia maior ou igual a 250 mg/dl.

Após 14 dias da indução do diabetes, os animais dos diferentes grupos experimentais (DBT e NGL) foram submetidos ao pré-teste do nado forçado e no dia seguinte aos testes de campo aberto seguido do teste de nado forçado. Dois dias depois (dia 17), os mesmos foram submetidos novamente ao teste de Von Frey a fim de analisar o limiar mecânico. Neste mesmo dia foram iniciados os diferentes tratamentos (ácido elágico, nas doses de 75, 100 ou 150 mg/Kg; v.o.), imipramina (10 mg/Kg, i.p.) ou seus respectivos veículos (carboximetil celulose 0,5% ou salina), os quais tiveram a duração de 19 dias, sendo tratados até o 35º dia após a diabetização.

No 32º dia, os ratos foram submetidos novamente ao pré-teste do nado forçado e no 33º dia, aos testes de campo aberto e de nado forçado, sendo que dois dias após (35º dia), foi realizado novamente o teste de Von Frey. No dia seguinte à análise comportamental de alodinia mecânica, a glicemia foi aferida e os ratos foram eutanasiados, o hipocampo e a medula espinhal foram imediatamente dissecados e armazenados no freezer a -80°C para análise da expressão do Nrf2 por meio de *western blotting* e o nervo ciático, os gânglios da raiz dorsal (L4-L6, bilateralmente) e córtex pré-frontal foram igualmente dissecados para realização de testes bioquímicos para estresse oxidativo.

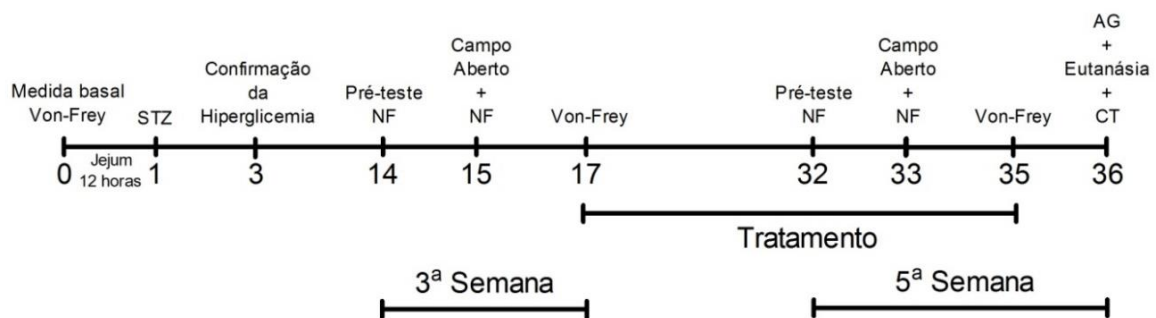


Figura 2: DELINEAMENTO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS. Tratamento com o veículo (CMC 0,5% p.o.) ou com ácido elágico (AE; 75, 100 ou 150 mg/Kg, v.o.) ou com imipramina (10 mg/Kg, i.p.) será feito diariamente por 19 dias. CMC: carboximetilcelulose; AE: ácido elágico; NF: Nado forçado; AG: aferição da glicemia; CT: coleta de tecidos.

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de grupos contendo de 7 a 9 animais. Os resultados obtidos após os testes

comportamentais de nado forçado ou de campo aberto, assim como os resultados de ganho de peso e glicemia dos animais foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via. Os resultados dos níveis de hidroperóxidos lipídicos foram analisados por Teste t de Student entre os grupos controle, seguido por análise de variância (ANOVA) de uma via entre os demais grupos. Os dados obtidos a partir do teste de Von Frey foram analisados por ANOVA duas vias com medidas repetidas. Quando houve diferença estatisticamente significativa após a realização dos testes de ANOVA, estes foram seguidos pelo pós-teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 ALODINIA MECÂNICA E COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ

A Figura 3, painel A, mostra que na terceira semana após indução do diabetes, os ratos diabéticos tiveram uma redução significativa do limiar de retirada da pata, em comparação com os normoglicêmicos. O pico da alodinia ocorreu na quinta semana. Quanto ao tempo de imobilidade, demonstrado no painel B, não foram observadas diferenças significativas entre os diabéticos e os normoglicêmicos na terceira semana, porém na quinta semana, os diabéticos apresentaram um aumento significativo de tempo de imobilidade, em comparação aos normoglicêmicos, indicando aparecimento do comportamento tipo-depressivo.

Para investigação da relação entre dor e depressão, os grupos foram submetidos à análises de correlação. Conforme a Figura 5, painel C, houve uma correlação positiva entre o limiar de retirada da pata e o tempo de imobilidade dos animais diabéticos.

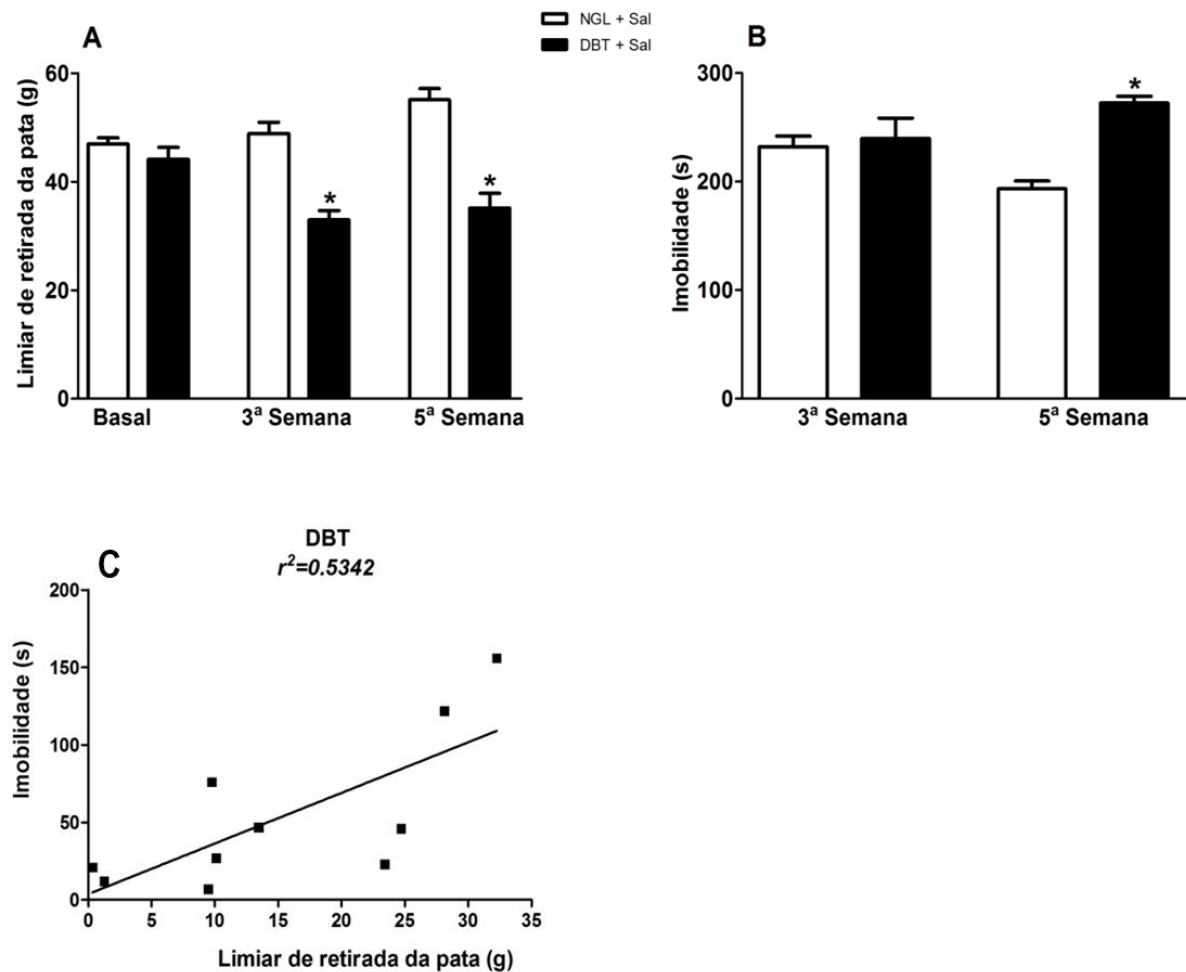


Figura 3: AVALIAÇÃO DA ALODINIA MECÂNICA (A) E DO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO (B) EM RATOS NORMOGLICÊMICOS (NGL) E DIABÉTICOS (DBT). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. $n = 7-9$. As diferenças entre os grupos na avaliação da alodinia mecânica foi analisada por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls; e as diferenças entre os grupos na avaliação do comportamento tipo-depressivo foi analisada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. * Diferença significativa em comparação ao grupo NGL+Sal. $p \leq 0,05$. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE O LIMIAR DE RETIRADA DA PATA E O TEMPO DE IMOBILIDADE EM ANIMAIS DIABÉTICOS (C). A análise foi realizada pelo teste de coeficiente de correlação de Pearson e regressão linear multi-variada. A intensidade de dor representa o Δ entre valores de limiar de retirada da pata observados na medida basal (obtidos antes dos procedimentos experimentais) e valores da quinta semana após a indução do diabetes.

5.2 EFEITO DA IMIPRAMINA SOBRE A ALODINIA MECÂNICA, COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ

Conforme mostra a Figura 4, os ratos diabéticos tiveram uma redução significativa no limiar de retirada da pata, em comparação aos normoglicêmicos. Essa

redução teve início na terceira semana após indução do diabetes e permaneceu na quinta semana.

O tratamento com imipramina (10 mg/kg, i.p.) teve um efeito antinociceptivo na quinta semana, causando uma diminuição da alodinia mecânica, evidenciada pelo aumento do limiar de retirada da pata (Figura 4). Houve também uma redução significativa do tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado (Figura 5).

A Tabela 1 demonstra que, no teste de campo aberto, os animais diabéticos-veículo apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos, em comparação aos animais normoglicêmicos, na terceira semana após indução do diabetes. Essa diferença não foi mais observada na quinta semana. Porém o tratamento crônico com imipramina causou uma redução significativa no número de cruzamentos dos diabéticos, comparados aos normoglicêmicos e aos diabéticos-veículo.

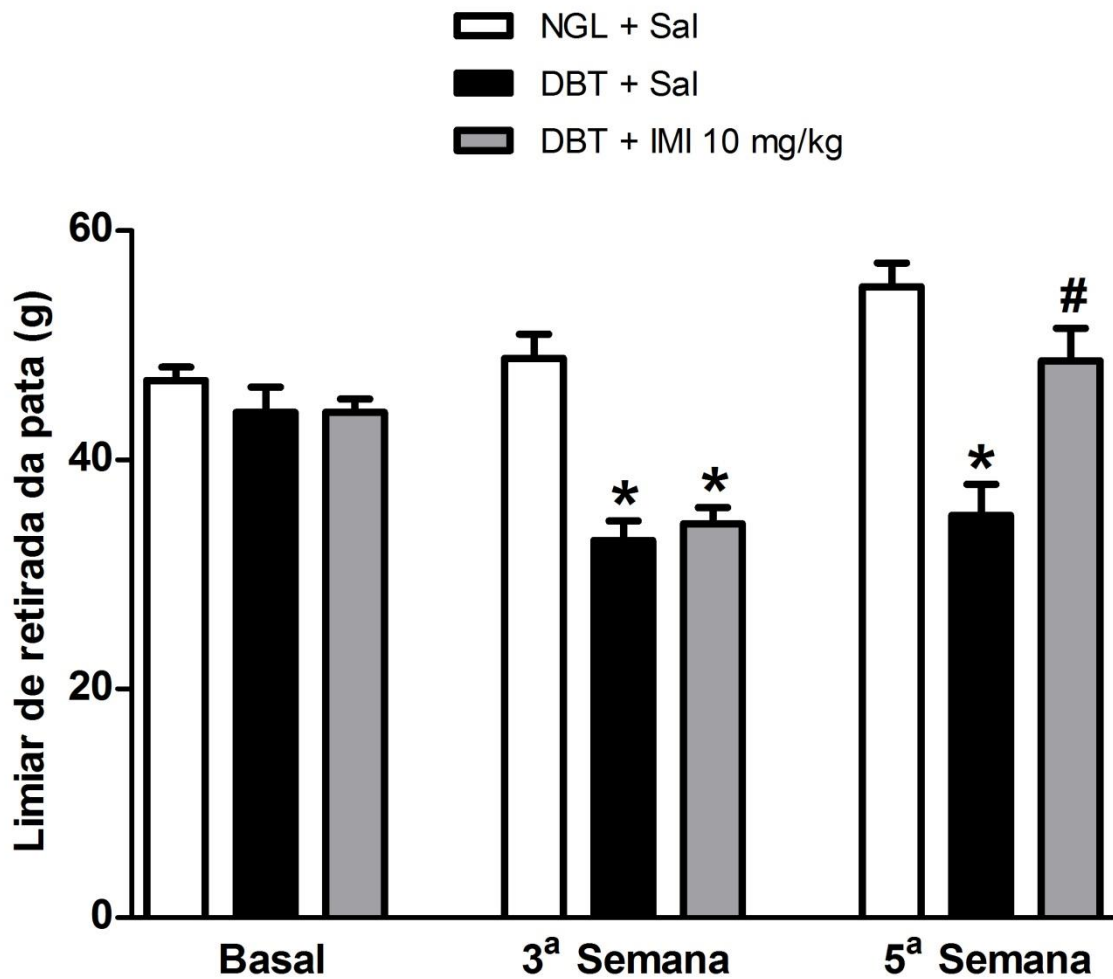


Figura 4: EFEITO DA IMIPRAMINA SOBRE O LIMIAR DE RETIRADA DA PATA EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE ALODINIA MECÂNICA BASAL, 3 E 5 SEMANAS APÓS INDUÇÃO DO DIABETES. Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com salina i.p. (NGL + Sal), diabéticos tratados com salina i.p. (DBT + sal) e diabéticos tratados com imipramina na dose de 10 mg/Kg, i.p. (DBT + IMI 10 mg/Kg). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. na avaliação do aumento ou diminuição do limiar de retirada da pata, expresso em gramas. $n=7-9$. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. * Diferença significativa em relação ao grupo NGL+Sal; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT+Sal. $p \leq 0,05$.

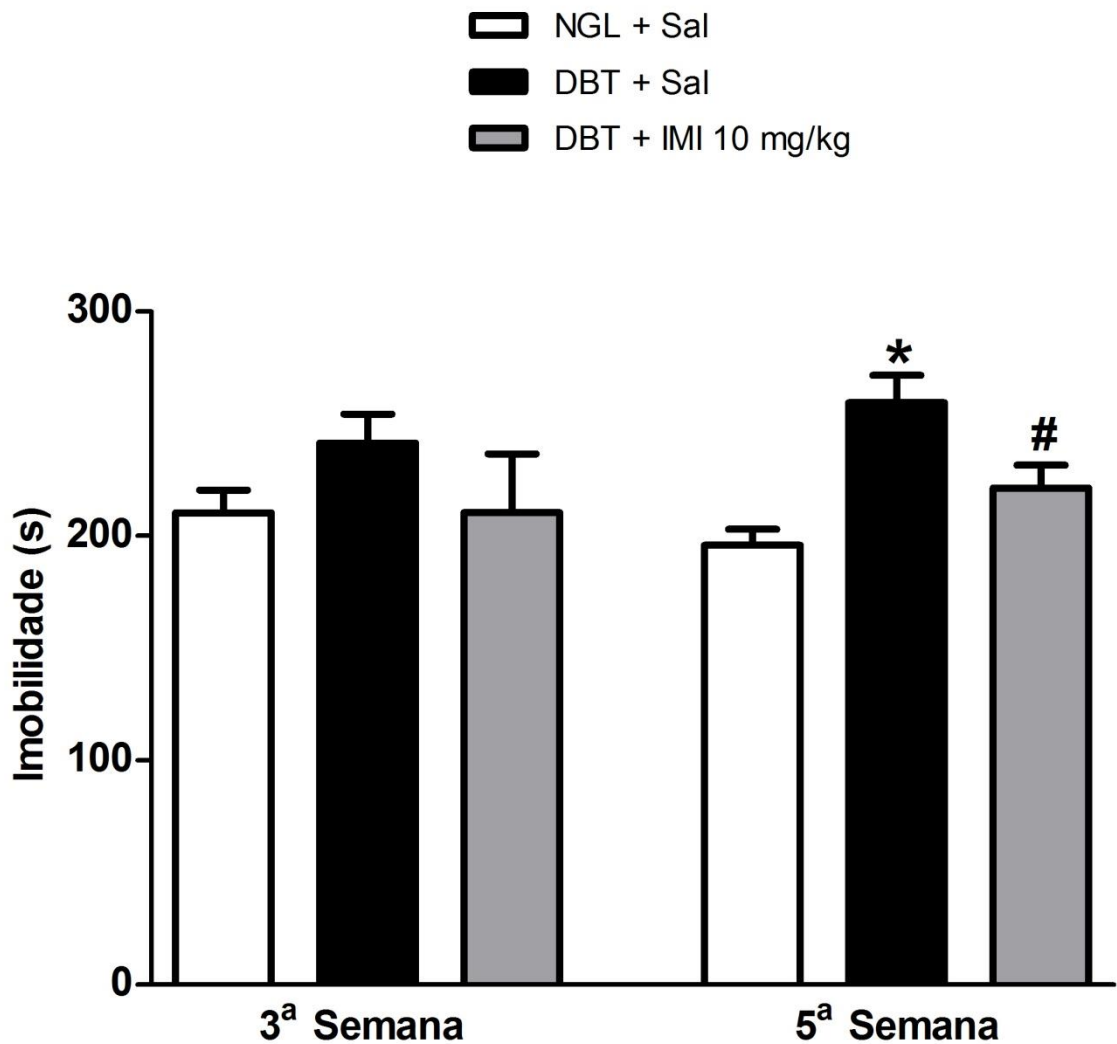


Figura 5: EFEITO DA IMIPRAMINA SOBRE O TEMPO DE IMOBILIDADE EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE NADO FORÇADO 3 E 5 SEMANAS APÓS INDUÇÃO DO DIABETES. Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com salina i.p. (NGL + Sal), diabéticos tratados com salina i.p. (DBT + sal), diabéticos tratados com imipramina na dose de 10 mg/Kg, i.p. (DBT + IMI 10 mg/Kg). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. do tempo de imobilidade total, contado em período de 5 minutos, expresso em segundos. $n=7-9$. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. * Diferença significativa em relação ao grupo NGL+CMC. # Diferença significativa em relação ao grupo DBT+CMC. $p \leq 0,05$.

Tabela 1: EFEITO DA IMIPRAMINA SOBRE O NÚMERO DE CRUZAMENTOS EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE CAMPO ABERTO 3 E 5 SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES.

Grupos experimentais	Número de cruzamentos	
	3ª Semana	5ª Semana
NGL + Sal	91,86 ± 14,86	92,75 ± 21,82
DBT + Sal	59,75 ± 20,89 *	69,38 ± 32,14
DBT + imipramina	69,00 ± 17,52 *	38,57 ± 21,86 * #

Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com salina i.p. (NGL + Sal), diabéticos tratados com salina i.p. (DBT + sal), diabéticos tratados com imipramina na dose de 10 mg/Kg, i.p. (DBT + IMI 10 mg/Kg). Os dados foram expressos como média ± E.P.M do número de cruzamentos contado durante um período de 5 minutos. n=7-9. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-keuls. * Diferença significativa em relação ao grupo NGL + Sal; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT + Sal, p≤0,05.

5.3 EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE A ALODINIA MECÂNICA, COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO E ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ

Na Figura 6, pode-se observar que os animais diabéticos-veículo tiveram uma redução significativa no limiar de retirada da pata em comparação aos normoglicêmicos, na terceira semana após indução do diabetes. Na quinta semana, foi observado que o tratamento com ácido elágico reverteu significativamente a alodinia mecânica dos animais diabéticos, nas doses de 75 e 100 mg/kg, v.o., sendo que a dose de 75 mg/kg teve um efeito mais pronunciado. A dose de 150 mg/kg não teve um efeito estatisticamente significativo.

Quanto ao tempo de imobilidade dos animais, a dose de 75 mg/kg foi efetiva em diminuir o tempo de imobilidade, indicando um efeito do tipo-antidepressivo (Figura 7). Esse efeito não foi observado nas doses de 100 e 150 mg/kg.

No teste de campo aberto (Tabela 2), foi observado que os animais diabéticos apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos, comparados aos normoglicêmicos, na terceira semana após indução do diabetes. Na quinta semana, os animais tratados com 75 e 100 mg/kg apresentaram atividade locomotora normal, sem diferença estatística dos normoglicêmicos, enquanto que os animais tratados com 150 mg/kg mantiveram a redução no número de cruzamentos.

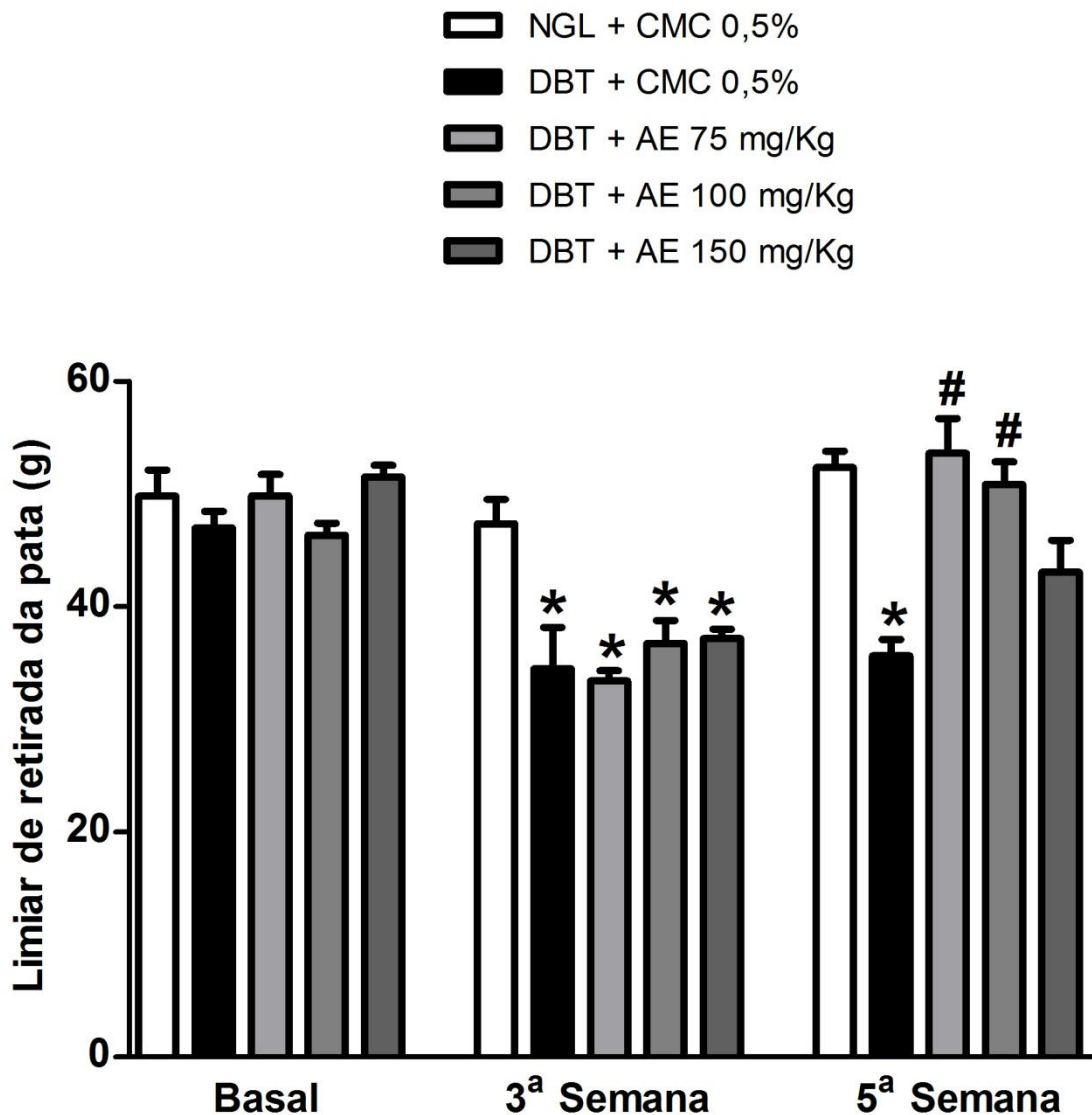


Figura 6: EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE LIMIAR DE RETIRADA DA PATA EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE ALODINIA MECÂNICA BASAL, 3 E 5 SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES. Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com carboximetilcelulose 0,5% v.o. (NGL + CMC 0,5%), diabéticos tratados com carboximetilcelulose 0,5% v.o. (DBT + CMC 0,5%), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 75 mg/Kg v.o. (DBT + AE 75 mg/Kg), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 100 mg/Kg v.o. (DBT+AE 100 mg/Kg) e diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 150 mg/Kg v.o.(DBT + AE 150mg/Kg). Os dados foram expressos como média + E.P.M. na avaliação do aumento ou diminuição do limiar de retirada da pata, expresso em gramas. n= 7-9. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. * Diferença significativa em relação ao grupo NGL+CMC 0,5%; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT+CMC 0,5%, p≤0,05.

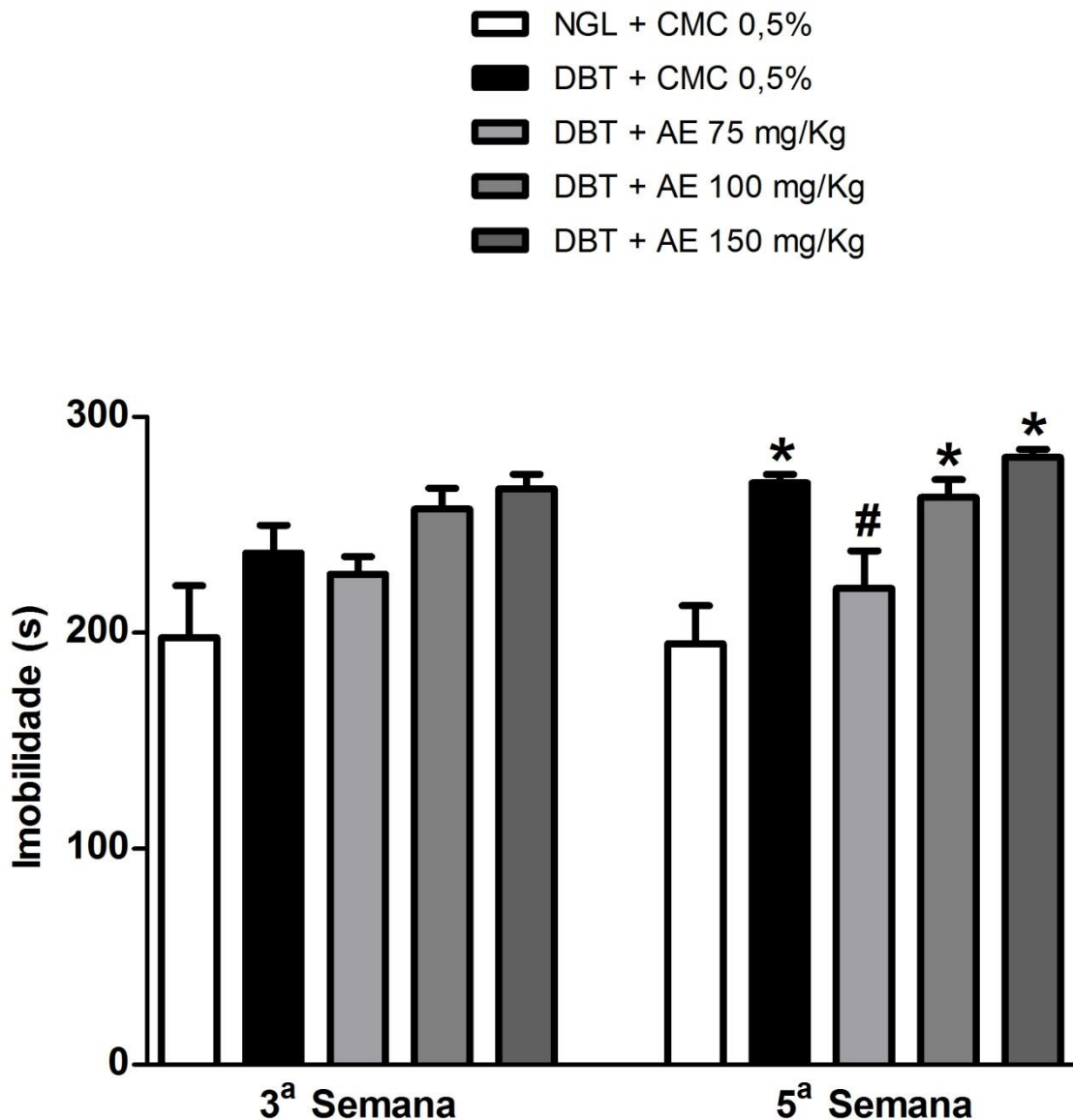


Figura 7: EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE O TEMPO DE IMOBILIDADE EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE NADO FORÇADO 3 E 5 SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES. Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com carboximetilcelulose 0,5% v.o. (NGL + CMC 0,5%), diabéticos tratados com carboximetilcelulose 0,5% v.o. (DBT + CMC 0,5%), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 75 mg/Kg v.o. (DBT + AE 75 mg/Kg), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 100 mg/Kg v.o. (DBT+AE 100 mg/Kg) e diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 150 mg/Kg v.o.(DBT + AE 150mg/Kg). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. do tempo de imobilidade total, contado em período de 5 minutos, expresso em segundos. n=7-9. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. * Diferença significativa em relação ao grupo NGL+CMC 0,5%; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT+CMC 0,5%, $p \leq 0,05$.

Tabela 2. EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE O NÚMERO DE CRUZAMENTOS EM RATOS SUBMETIDOS AO TESTE DE CAMPO ABERTO 3 E 5 SEMANAS APÓS A INDUÇÃO DO DIABETES.

Grupos experimentais	Número de cruzamentos	
	3ª Semana	5ª Semana
NGL + CMC	107,0 ± 21,97	78,29 ± 13,44
DBT + CMC	75,38 ± 16,55*	75,75 ± 28,53
DBT + AE 75 mg/Kg	78,5 ± 12,98*	58,25 ± 18,09
DBT + AE 100 mg/Kg	80,13 ± 15,35*	66,13 ± 21,36
DBT + AE 150 mg/Kg	50,86 ± 26,87*#	16,14 ± 4,10*#

Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com carboximetilcelulose 0,5% v.o. (NGL + CMC 0,5%), diabéticos tratados com carboximetilcelulose 0,5% v.o. (DBT + CMC 0,5%), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 75mg/Kg v.o.(DBT + AE 75 mg/Kg), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 100 mg/Kg v.o.(DBT + AE 100 mg/Kg) e diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 150 mg/Kg v.o. (DBT + AE 150mg/Kg). Os dados foram expressos como média ± E.P.M do número de cruzamentos contado durante um período de 5 minutos. n=7-9. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-keuls. * Diferença significativa em relação ao grupo NGL+CMC 0,5%; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT+CMC 0,5%, $p \leq 0,05$.

5.4 EFEITO DA IMIPRAMINA E DO ÁCIDO ELÁGICO NA EXPRESSÃO DE NRF2 NO CORDÃO ESPINHAL E NO HIPOCAMPO DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ

Os ratos diabéticos apresentaram uma redução significativa na expressão de Nrf2 no cordão espinhal (Figura 8, painéis A e C) e no hipocampo (Figura 8, painéis B e D), quando comparados aos normoglicêmicos. O tratamento com imipramina aumentou significativamente a expressão de Nrf2 no cordão espinhal (Figura 8, painel A) e no hipocampo (Figura 8, painel B) dos animais diabéticos em comparação aos diabéticos-veículo. O tratamento com ácido elágico também aumentou significativamente a expressão de Nrf2 no cordão espinhal (Figura 8, painel C), porém não no hipocampo (Figura 8, painel D).

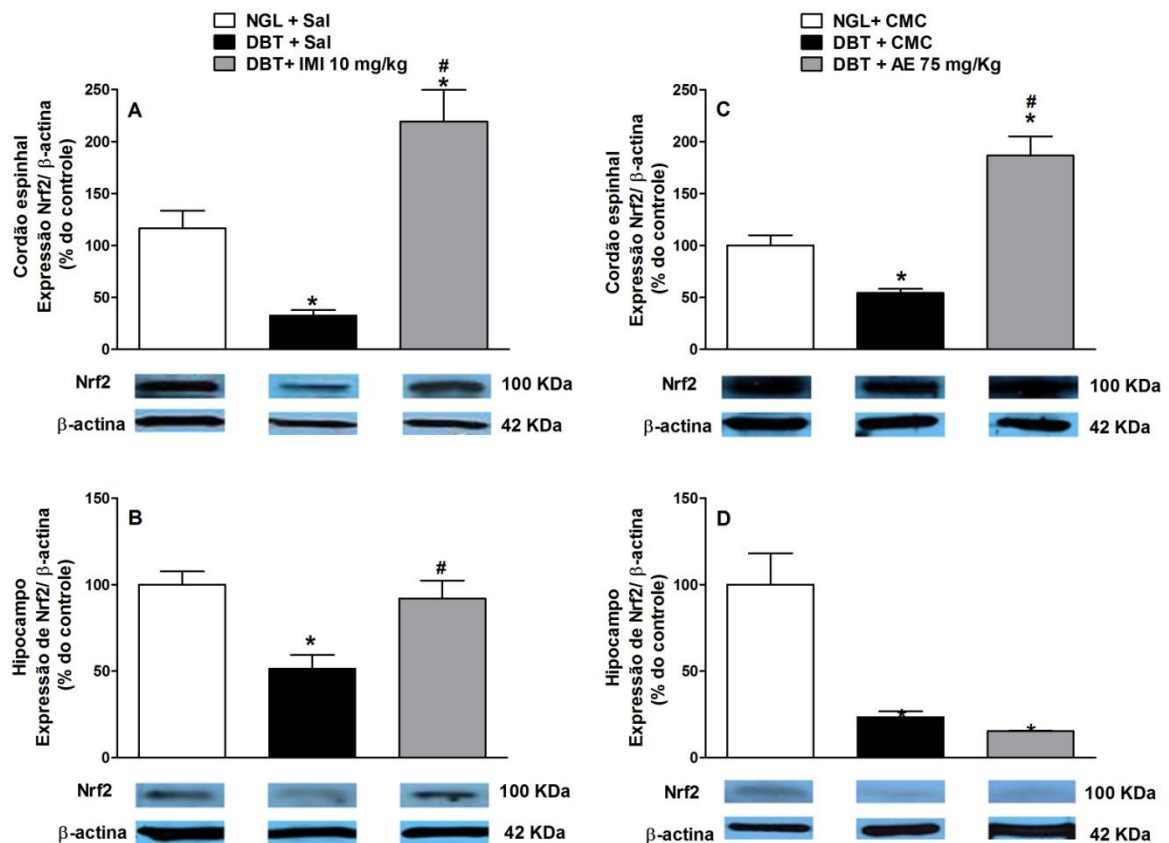


Figura 8: EFEITO DA IMPRAMINA (PAINÉIS A E B) E DO ÁCIDO ELÁGICO (PAINÉIS C E D) NA EXPRESSÃO DE NRF2 NO CORDÃO ESPINHAL (PAINÉIS A E C) E NO HIPOCAMPO (PAINÉIS B E D) 36 DIAS APÓS INDUÇÃO DO DIABETES. Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com carboximetilcelulose 0,5% v.o. (NGL + CMC 0,5%), diabéticos tratados com carboximetilcelulose 0,5% v.o. (DBT + CMC 0,5%), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 75mg/Kg v.o.(DBT + AE 75 mg/Kg) e diabéticos tratados com imipramina na dose de 10 mg/Kg i.p. (DBT + IMI 10 mg/Kg). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. n=4. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newlman-keuls. * Diferença significativa em relação ao grupo NGL+CMC; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT+CMC. $p \leq 0,05$.

5.5 EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE OS NÍVEIS DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS EM RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ

Conforme mostra a figura 9, o tratamento com ácido elágico na dose de 100 mg/kg diminuiu significativamente os níveis de hidroperóxidos lipídicos no ciático (Painel A), enquanto que no córtex pré-frontal (Painel B) houve uma diminuição significativa com a dose de 75 mg/kg, em comparação ao grupo de diabéticos-veículo; além de os diabéticos apresentarem maiores níveis de hidroperóxidos lipídicos, em comparação aos normoglicêmicos.

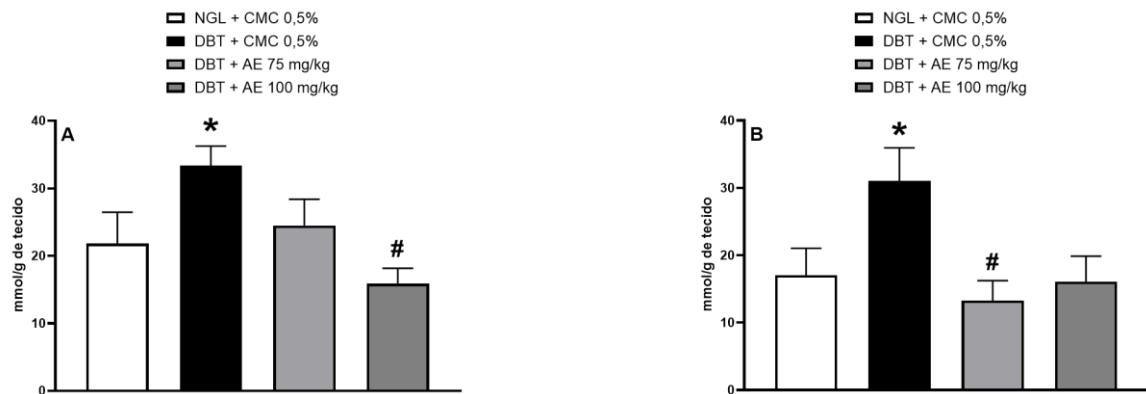


Figura 9: EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO SOBRE OS NÍVEIS DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS NO CIÁTICO (PAINEL A) E NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL (PAINEL B). Os grupos representam ratos normoglicêmicos tratados com carboximetilcelulose 0,5% v.o. (NGL + CMC 0,5%), diabéticos tratados com carboximetilcelulose 0,5% v.o. (DBT + CMC 0,5%), diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 75 mg/Kg v.o. (DBT + AE 75 mg/Kg) e diabéticos tratados com ácido elágico na dose de 100 mg/Kg v.o. (DBT+AE 100 mg/Kg). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por Teste t de Student, seguido por análise de variância (ANOVA) de uma via e pelo pós-teste de Newman-Keuls. * Diferença significativa em relação ao grupo NGL+CMC; # Diferença significativa em relação ao grupo DBT+CMC. $p \leq 0,05$.

5.6 EFEITO DO ÁCIDO ELÁGICO E IMPRAMINA SOBRE O PESO E A GLICEMIA DE RATOS COM DIABETES EXPERIMENTAL INDUZIDO POR STZ

A Tabela 3 mostra que todos os animais diabéticos tiveram um ganho de peso significativamente menor em comparação aos animais normoglicêmicos. Sobre a glicemia, observa-se que todos os grupos de diabéticos apresentaram hiperglicemia até o fim dos experimentos e os tratamentos não interferiram significativamente na glicemia dos animais.

TABELA 3. GANHO DE PESO (G) E NÍVEIS DE GLICOSE SANGUÍNEA (mg/dL) DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

Grupos experimentais	Ganho de peso (g)	Glicemia (mg/dL)	
		3 dias após STZ	36 dias após STZ
NGL + Sal	111.1 ± 6.7	n.d.	n.d.
DBT + Sal	30.7 ± 6.4*	476.9 ± 10.4	527.1 ± 14.4
DBT + imipramina	31.4 ± 5.0*	521.7 ± 8.3	483.4 ± 17.8
NGL + CMC	152.0 ± 27.9	n.d.	n.d.
DBT + CMC	26.4 ± 10.2*	501.4 ± 23.0	582.7 ± 8.9
DBT + AE 75 mg/Kg	42.6 ± 6.9*	461.1 ± 19.7	517.4 ± 20.2
DBT + AE 100 mg/Kg	32.6 ± 3.7*	500.4 ± 22.5	518.2 ± 14.1
DBT + AE 150 mg/Kg	-12.2 ± 7.2*	484.5 ± 7.6	524.6 ± 15.5

O ganho de peso foi calculado subtraindo-se o peso inicial (dia zero) do peso final (dia 36) dos animais. A glicemia foi aferida 3 dias após a injeção i.p. de STZ a fim de se confirmar a indução do diabetes, e novamente no fim dos experimentos (36 dias após a aplicação de STZ). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. n.d.: não determinado; NGL: normoglicêmicos; DBT: diabéticos; Sal: salina; CMC: carboximetilcelulose; AE: ácido elágico. * Diferença significativa em relação ao grupo NGL. $p \leq 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram um efeito antinociceptivo pelo tratamento crônico com o ácido elágico nas doses de 75 e 100 mg/kg, v.o., e um efeito do tipo-antidepressivo na dose de 75 mg/kg, v.o., em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina.

De acordo com os nossos resultados, os ratos diabéticos apresentaram uma redução do limiar mecânico de retirada da pata na terceira semana após a indução do diabetes por estreptozotocina, em comparação com os ratos normoglicêmicos, que permaneceu até na quinta semana com os animais diabéticos-veículo. Essa resposta representa um comportamento de alodinia. Outros estudos também sugerem que essa resposta pode durar semanas (Badescu et al., 2014; Baluchnejadmojarad et al., 2012).

Também foi observado um comportamento do tipo-depressivo nos ratos diabéticos, caracterizado pelo aumento do tempo de imobilidade dos animais, quando em comparação com os ratos normoglicêmicos. Esse comportamento permaneceu

ainda no fim da quarta semana após a indução do diabetes, corroborando com estudos do nosso grupo realizados anteriormente (Redivo et al., 2016; De Moraes et al., 2016; Pereira et al., 2018)

Sobre a atividade locomotora dos animais, os resultados mostram que os diabéticos-veículo apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos dos quadrantes, em comparação com os animais normoglicêmicos, no teste de campo aberto, na terceira semana após indução do diabetes. Entretanto, na quinta semana, a diferença de cruzamentos entre os diabéticos e normoglicêmicos não foi significativa. Esses resultados corroboram com Redivo e colaboradores (2016), Haider e colaboradores (2013) e Grzeda e colaboradores (2007), que observaram uma diminuição no número de cruzamentos duas semanas após administração de STZ. E com outros estudos que mostram que não houve alteração locomotora na quarta semana após indução do diabetes (Da Silva Dias et al., 2015; Aswar et al., 2017).

Muitos estudos demonstraram uma relação entre dor crônica e depressão (Zis et al., 2017; Bair et al., 2003; Walker et al., 2014; Rosemann et al., 2007). Os nossos resultados sugerem que há uma relação entre a alodinia e o comportamento tipo-depressivo em ratos diabéticos. O estresse oxidativo tem sido apontado como um possível mecanismo fisiopatológico desencadeador de DN e depressão (Kiasalari et al., 2017; Dong, 2019; Lindqvist, 2017; Cunha et al., 2008; Olukman et al., 2018; Nabavi et al., 2015), e sabe-se que alguns antidepressivos atuam por mecanismos antioxidantes (Hritcu, 2017; Herken et al., 2007). Desta forma, foi utilizado imipramina como controle positivo, um antidepressivo que possui propriedades antioxidantes (De Moraes et al., 2014; Cline et al., 2015; Lin et al., 2012). Foi demonstrado que a administração de imipramina pode inibir a apoptose de células ganglionares da retina causada por estresse oxidativo (Han et al., 2016). Outro estudo realizado por Réus e colaboradores (2010) mostra que a administração crônica de imipramina tem efeito antioxidante no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos.

No presente estudo, o tratamento com imipramina (10 mg/kg, i.p.) reduziu a alodinia e teve um efeito do tipo-antidepressivo nos ratos diabéticos tratados, em comparação aos diabéticos tratados com veículo. No teste de campo aberto, os animais tratados com imipramina tiveram uma diminuição no número de cruzamentos,

quando comparados com os diabéticos-veículo e com os normoglicêmicos, o que não influenciou no efeito tipo-antidepressivo.

O tratamento com ácido elágico teve um efeito antinociceptivo, impedindo a redução do limiar mecânico de retirada da pata nos ratos diabéticos tratados nas doses de 75 e 100 mg/kg, mas não na dose de 150 mg/kg. Esses resultados corroboram com estudos anteriores. Naghizadeh e colaboradores (2015) observaram que animais submetidos ao teste de contorção com ácido acético e tratados com ácido elágico, apresentaram uma redução nas contorções abdominais, além de ter apresentado um efeito sinérgico com a carbamazepina neste mesmo teste. Gianok e colaboradores (2011) demonstraram que houve um efeito antinociceptivo com administração do ácido elágico em ratos submetidos ao teste de dor inflamatória, pela administração de carragenina na pata. Esse efeito também foi observado no teste de formalina. Além de outros estudos que demonstram um efeito antinociceptivo pelo tratamento agudo e crônico com ácido elágico (Singh et al., 2017; BenSaad, 2017; Mansouri, 2015; Ghorbanzadeh, 2014).

Além disso, com a dose de 75 mg/kg, foi observado uma redução significativa do tempo de imobilidade dos ratos diabéticos tratados, em comparação com os diabéticos-veículo. Os resultados corroboram outros estudos que demonstram que a administração de ácido elágico causou uma redução no tempo de imobilidade de animais com comportamento tipo-depressivo, no teste de nado forçado (Bedel et al., 2017; Lorigooini et al., 2019; Girish et al., 2012; Dhingra e Chhillar, 2012).

No teste de campo aberto, observou-se que os animais tratados com as doses de 75 e 100 mg/kg não sofreram alterações locomotoras, enquanto que os tratados com a dose de 150 mg/kg apresentaram um número reduzido de cruzamentos. Estudos mostram que a administração de ácido elágico não causa alterações locomotoras (Bedel et al., 2017; Girish et al., 2012; Mansouri et al., 2014).

O ácido elágico possui uma importante propriedade antioxidante (Han et al., 2006; Derosa et al., 2016; Ríos et al., 2018; Jordão et al., 2017). Nossos resultados sugerem que o efeito antinociceptivo e tipo anti-depressivo do ácido elágico ocorre por um mecanismo antioxidante, com a ativação da via Keap1-Nrf2.

A análise da expressão de Nrf2, no cordão espinhal e no hipocampo dos animais, mostra que os animais diabéticos-veículo, que apresentaram alodinia e comportamento tipo-depressivo, tiveram uma redução significativa na expressão do

fator, em comparação aos normoglicêmicos. Enquanto que os animais que receberam o tratamento com imipramina tiveram um aumento significativo na expressão de Nrf2. Esse resultado corrobora com outros estudos que demonstraram que a administração de antidepressivos tricíclicos aumenta a expressão de Nrf2 (Zaafan et al., 2019; Lin et al., 2012).

Os animais tratados com ácido elágico na dose efetiva de 75 mg/kg, tiveram um aumento significativo da expressão de Nrf2 no cordão espinhal, mas não no hipocampo. Diversos estudos vêm demonstrando o papel antioxidante do ácido elágico, com a ativação da via Keap1-Nrf2 (Wang et al., 2019; Ding et al., 2019; Polce et al., 2018; Baluchnejadmojarad et al., 2017; Ding et al., 2014; Kim et al., 2013). Era esperado que houvesse um aumento na expressão de Nrf2 também no hipocampo dos animais, já que o tratamento com ácido elágico reverteu o comportamento tipo-depressivo, a diminuição de Nrf2 é relacionada ao comportamento tipo-depressivo (Yao et al., 2016; Martín-de-Saavedra et al., 2013) e estudos mostram um potencial neuroprotetor relacionado ao aumento da expressão de Nrf2 (Chiu et al., 2019; Cuadrado et al., 2018; Baluchnejadmojarad et al., 2017; Kiasalari et al., 2017; Uzar et al., 2012; Bouvier et al., 2017). Com isso, pode-se sugerir que houve uma degradação das amostras, um resultado falso negativo ou ainda que o efeito antidepressivo tenha ocorrido por um outro mecanismo, considerando que o ácido elágico também atua por outros mecanismos de ação, como pelo receptor excitatório NMDA (Larigooni et al., 2019) e pelo aumento de níveis de BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) (Bedel et al., 2018). Assim sendo, é necessário que se repita o experimento para a avaliação desse parâmetro.

Quanto ao ensaio de estresse oxidativo, os níveis de hidroperóxidos lipídicos foram significativamente maiores nos animais diabéticos-veículo, em comparação ao grupo dos normoglicêmicos. O tratamento com ácido elágico foi capaz de reverter esses níveis, sendo que foram significativamente menores nos animais tratados com a dose de 100 mg/kg, no ciático, e nos animais tratados com a dose de 75 mg/kg, no córtex pré-frontal, em comparação ao grupo controle. Isso sugere um efeito antioxidante, pela diminuição da peroxidação lipídica. Esse resultado corrobora com outros estudos que demonstram a diminuição da peroxidação lipídica com a administração de ácido elágico (Yonar, 2019; Sepand et al., 2016; Goudarzi et al., 2019). Além de outros estudos na literatura que evidenciam o papel antioxidante

desse composto (Liu et al., 2019; Ebrahimi et al., 2019; El-Missiry et al., 2019; Arab et al., 2019; Zeb et al., 2018; Hemmati et al., 2017; Rozentsvit et al., 2017; Derosa et al., 2016; Sepand et al., 2016; Yu et al., 2005; Yüce, 2007).

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho propõe que a administração crônica de ácido elágico é efetiva para o tratamento da dor neuropática e depressão associadas ao diabetes, em ratos com diabetes experimental induzido por estreptozotocina. O tratamento com ácido elágico foi capaz de aumentar os níveis de Nrf2 no cordão espinhal, mas não no hipocampo. Nossos resultados sugerem que o ácido elágico pode representar uma alternativa ao tratamento da dor neuropática e da depressão associadas ao diabetes, e que seu mecanismo de ação pode ocorrer pela ativação da via Keap1/Nrf2.

REFERÊNCIAS

ALI, S.; STONE, M. A.; PETERS, J. L.; DAVIES, M. J.; KHUNTI, K. The prevalence of co-morbid depression in adults with Type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. **Diabetic Medicine**, 2006.

AMIN, M. M.; ARBID, M. S. Estimation of ellagic acid and/or repaglinide effects on insulin signaling, oxidative stress, and inflammatory mediators of liver, pancreas, adipose tissue, and brain in insulin resistant/type 2 diabetic rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, 2017.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, 2012.

ANDERSON, R. J.; FREEDLAND, K. E.; CLOUSE, R. E.; LUSTMAN, P. J. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: A meta-analysis. **Diabetes Care**, 2001.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual review of plant biology**, 2004.

ARAB, H. H.; GAD, A. M.; FIKRY, E. M.; EID, A. H. Ellagic acid attenuates testicular disruption in rheumatoid arthritis via targeting inflammatory signals, oxidative perturbations and apoptosis: Ellagic acid mitigates RA testicular impairment. **Life Sciences**, 2019.

ASWAR, U.; CHEPURWAR, S.; SHINTRE, S.; ASWAR, M. Telmisartan attenuates diabetes induced depression in rats. **Pharmacological Reports**, 2017.

BAIR, M. J.; ROBINSON, R. L.; KATON, W.; KROENKE, K. Depression and Pain Comorbidity. **Archives of Internal Medicine**, 2003.

BĂDESCU, LAURENTIU et al. Modulation of neuropathic pain in experimental diabetes mellitus. **Journal of physiology and biochemistry**, 2014.

BALUCHNEJADMOJARAD, T.; RABIEE, N.; ZABIHNEJAD, S.; ROGHANI, M. Ellagic acid exerts protective effect in intrastriatal 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease: Possible involvement of ER β /Nrf2/HO-1 signaling. **Brain Research**, 2017.

BALUCHNEJADMOJARAD, T.; ROGHANI, M. Chronic oral epigallocatechin-gallate alleviates streptozotocin-induced diabetic neuropathic hyperalgesia in rat: involvement of oxidative stress. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, 2012.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutricao**, 2010.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet Neurology**, 2010.

BARON, R.; GIERTHMÜHLEN, J. Neuropathic Pain. **Seminars in Neurology**, 2016.

BEDEL, H. A.; KENCEBAY MANAS, C.; ÖZBEY, G.; USTA, C. The antidepressant-like activity of ellagic acid and its effect on hippocampal brain derived neurotrophic factor levels in mouse depression models. **Natural Product Research**, 2018.

BENSAAD, L. A.; KIM, K. H.; QUAH, C. C.; KIM, W. R.; SHAHIMI, M. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2017.

BITTAR, A.; JUN, J.; LA, J. H.; et al. Reactive oxygen species affect spinal cell type-specific synaptic plasticity in a model of neuropathic pain. **Pain**, 2017.

BLAZER, D. G., MOODY-AYERS, S., CRAFT-MORGAN, J., BURCHETT, B. Depression in diabetes and obesity. **Journal of Psychosomatic Research**, 2002.

BOUVIER, E.; BROUILLARD, F.; MOLET, J.; et al. Nrf2-dependent persistent oxidative stress results in stress-induced vulnerability to depression. **Molecular Psychiatry**, 2017.

BYSTRITSKY, A.; DANIAL, J.; KRONEMYER, D. Interactions between diabetes and anxiety and depression: Implications for treatment. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, 2014.

CHIU, K. M.; LIN, T. Y.; LEE, M. Y.; et al. Dexmedetomidine protects neurons from kainic acid-induced excitotoxicity by activating BDNF signaling. **Neurochemistry**

International, 2019.

CLINE, B. H.; ANTHONY, D. C.; LYSKO, A.; et al. Lasting downregulation of the lipid peroxidation enzymes in the prefrontal cortex of mice susceptible to stress-induced anhedonia. **Behavioural Brain Research**, 2015.

COUGHLAN, M. T.; THORBURN, D. R.; PENFOLD, S. A.; et al. RAGE-Induced Cytosolic ROS Promote Mitochondrial Superoxide Generation in Diabetes. **Journal of the American Society of Nephrology**, 2009.

CUADRADO, A.; KÜGLER, S.; LASTRES-BECKER, I. Pharmacological targeting of GSK-3 and NRF2 provides neuroprotection in a preclinical model of tauopathy. **Redox Biology**, 2018.

CUNHA, J. M.; JOLIVALT, C. G.; RAMOS, K. M.; et al. Elevated lipid peroxidation and DNA oxidation in nerve from diabetic rats: effects of aldose reductase inhibition, insulin, and neurotrophic factors. **Metabolism: Clinical and Experimental**, 2008.

DA SILVA DIAS, I. C. et al. Indoleamine-2, 3-dioxygenase/kynurenine pathway as a potential pharmacological target to treat depression associated with diabetes. **Molecular neurobiology**, 2016.

DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C. P.; DA SILVA, L. M.; FERREIRA, D. M.; WERNER, M. F.; ANDREATINI, R.; DA CUNHA, J. M.; ZANOVELI, J. M. Pivotal role of oxidative stress in hippocampus and pre-frontal cortex on development of depressive-like behaviors in streptozotocin-diabetic rats. **Behav Brain Res**, 2014.

DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C. P.; DA SILVA, L. M.; et al. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. **Behavioural Brain Research**, 2014.

DE MORAIS, H.; DE SOUZA, C. P.; DA SILVA, L. M.; et al. Anandamide reverses depressive-like behavior, neurochemical abnormalities and oxidative-stress parameters in streptozotocin-diabetic rats: Role of CB1 receptors. **European Neuropsychopharmacology**, 2016.

DEROSA, G.; MAFFIOLI, P.; SAHEBKAR, A. Ellagic acid and its role in chronic diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2016.

DHINGRA, D.; CHHILLAR, R. Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice. **Pharmacological Reports**, 2012.

DING, X., JIAN, T., WU, Y., ZUO, Y., LI, J., LV, H., CHEN, J. Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2019.

DING, Y.; ZHANG, B.; ZHOU, K.; et al. Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis: Role of Nrf2 activation. **International Journal of Cardiology**, 2014.

DONG, J., ZUO, Z., YAN, W., LIU, W., ZHENG, Q., LIU, X. Berberine ameliorates diabetic neuropathic pain in a rat model: involvement of oxidative stress, inflammation, and μ -opioid receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, 2019.

EBRAHIMI, R. et al. Ellagic acid reduces methotrexate-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction via up-regulating Nrf2 expression and inhibiting the $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{NF}\kappa\text{B}$ in rats. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2019.

EGEDE, L. E., ELLIS, C. Diabetes and depression: Global perspectives. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2010.

EL-MISSIRY, M. A. et al. Nanoformulated ellagic acid ameliorates pentylentetrazol-induced experimental epileptic seizures by modulating oxidative stress, inflammatory cytokines and apoptosis in the brains of male mice. **Metabolic brain disease**, 2019.

EREN, I.; NAZIROĞLU, M.; DEMIRDAŞ, A.; et al. Venlafaxine modulates depression-induced oxidative stress in brain and medulla of rat. **Neurochemical Research**, 2007.

FATIMA, N.; HAFIZUR, R. M.; HAMEED, A.; et al. Ellagic acid in *Emblica officinalis* exerts anti-diabetic activity through the action on β -cells of pancreas. **European Journal of Nutrition**, 2017.

FAZEL NABAVI, S., M DEAN, O., TURNER, A., SUREDA, A., DAGLIA, A., MOHAMMAD NABAVI, S. Oxidative stress and post-stroke depression: possible therapeutic role of polyphenols?. **Current medicinal chemistry**, 2015.

GAINOK, J.; DANIELS, R.; GOLEMBIOWSKI, D.; et al. Investigation of the anti-

inflammatory, antinociceptive effect of ellagic acid as measured by digital paw pressure via the randall-selitto meter in male sprague-dawley rats. **AANA Journal**, 2011.

GIRISH, C.; RAJ, V.; ARYA, J.; BALAKRISHNAN, S. Evidence for the involvement of the monoaminergic system, but not the opioid system in the antidepressant-like activity of ellagic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, 2012.

GHORBANZADEH, B. et al. Involvement of L-arginine/NO/cGMP/KATP channel pathway in the peripheral antinociceptive actions of ellagic acid in the rat formalin test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2014.

GOLDSTEIN, D. J.; LU, Y.; DETKE, M. J.; LEE, T. C.; IYENGAR, S. Duloxetine vs. placebo in patients with painful diabetic neuropathy. **Pain**, 2005.

GOUDARZI, M. et al. Neuroprotective effects of Ellagic acid against acrylamide-induced neurotoxicity in rats. **Neurological research**, 2019.

GU, L.; DENG, W. S.; LIU, Y.; et al. Ellagic acid protects Lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute hepatic injury in mice. **International Immunopharmacology**, 2014.

HAIDER, S.; AHMED, S.; TABASSUM, S.; MEMON, Z.; IKRAM, M.; HALEEM, D. J. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. **Acta Neurol Belg**, 2013.

HAMILTON, J. L., STANGE, J. P., BURKE, T. A., FRANZEN, P. L., ALLOY, L. B. Sleep disturbance and physiological regulation among young adults with prior depression. **Journal of Psychiatric Research**, 2019.

HAN, D. H.; LEE, M. J.; KIM, J. H. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. **Anticancer Research**, 2006.

HAN, M. L.; LIU, G. H.; GUO, J.; YU, S. J.; HUANG, J. Imipramine protects retinal ganglion cells from oxidative stress through the tyrosine kinase receptor B signaling pathway. **Neural Regeneration Research**, 2016.

HÉBERT, H. L.; VELUCHAMY, A.; TORRANCE, N.; SMITH, B. H. Risk factors for neuropathic pain in diabetes mellitus. **PAIN**, 2017.

HEMMATI, A. A.; OLAPOUR, S.; VARZI, H. N.; et al. Ellagic acid protects against arsenic trioxide–induced cardiotoxicity in rat. **Human and Experimental Toxicology**, 2018.

HERKEN, H.; GUREL, A.; SELEK, S.; et al. Adenosine Deaminase, Nitric Oxide, Superoxide Dismutase, and Xanthine Oxidase in Patients with Major Depression: Impact of Antidepressant Treatment. **Archives of Medical Research**, 2007.

HRITCU, L.; IONITA, R.; POSTU, P. A.; et al. Antidepressant flavonoids and their relationship with oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

HSEU, Y. C.; CHOU, C. W.; SENTHIL KUMAR, K. J.; et al. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes. **Food and Chemical Toxicology**, 2012.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, Â. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. **Quimica Nova**, 2008.

JADHAV, R.; PUCHCHAKAYALA, G. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: Boswellic acid, Ellagic acid, Quercetin, Rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2012.

JAIN, V.; PAREEK, A.; BHARDWAJ, Y. R.; SINGH, N. Attenuating effect of standardized fruit extract of punica granatum L in rat model of tibial and sural nerve transection induced neuropathic pain. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

JENSEN, T. S.; BACKONJA, M.-M.; JIMÉNEZ, S. H.; et al. New perspectives on the management of diabetic peripheral neuropathic pain. **Diabetes and Vascular Disease Research**, 2007.

JIN, H. Y.; KIM, S. H.; YU, H. M.; BAEK, H. S.; PARK, T. S. Therapeutic Potential of Dioscorea Extract (DA-9801) in Comparison with Alpha Lipoic Acid on the Peripheral Nerves in Experimental Diabetes . **Journal of Diabetes Research**, 2013.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Activation of post-synaptic 5-

HT1A receptors in the dorsal hippocampus prevents learned helplessness development. **Brain Research**, 2003.

JONGEN, J. L. M., HANS, G., BENZON, H. T., HUYGEN, F., HARTRICK, C. T. Neuropathic Pain and Pharmacological Treatment. **Pain Practice**, 2013.

JORDÃO, J. B. R.; PORTO, H. K. P.; LOPES, F. M.; BATISTA, A. C.; ROCHA, M. L. Protective Effects of Ellagic Acid on Cardiovascular Injuries Caused by Hypertension in Rats. **Planta Medica**, 2017.

JÚNIOR, L. R.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, 2001.

KANAI, A.; SEGAWA, Y.; TAKASHI OKAMOTO; MASANORI KOTO; HIROTSUGU OKAMOTO. The analgesic effect of a metered-dose 8% lidocaine pump spray in posttraumatic peripheral neuropathy: a pilot study. **Anesthesia and Analgesia**, 2009.

KIASALARI, Z.; RAHMANI, T.; MAHMOUDI, N.; BALUCHNEJADMOJARAD, T.; ROGHANI, M. Diosgenin ameliorates development of neuropathic pain in diabetic rats: Involvement of oxidative stress and inflammation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2017.

KIM, H. K.; PARK, S. K.; ZHOU, J. L.; et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, 2004.

KIM, Y. S.; ZERIN, T.; SONG, H. Y. Antioxidant action of ellagic acid ameliorates paraquat-induced A549 cytotoxicity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2013.

KIM, J.; CHA, Y. N.; SURH, Y. J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2010.

KNOL, M. J.; TWISK, J. W. R.; BEEKMAN, A. T. F.; et al. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. **Diabetologia**, 2006.

KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, M. Molecular Mechanisms Activating the Nrf2-Keap1 Pathway of Antioxidant Gene Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2005.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Nrf2-keap1 signaling as a potential target for chemoprevention of inflammation-associated carcinogenesis. **Pharmaceutical Research**, 2010.

LIN, X., BAI, D., WEI, Z., ZHANG, Y., HUANG, Y., DENG, H., HUANG, X. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. **PLOS ONE**, 2019.

LIN, H. Y.; YEH, W. L.; HUANG, B. R.; et al. Desipramine Protects Neuronal Cell Death and Induces Heme Oxygenase-1 Expression in Mes23.5 Dopaminergic Neurons. **PLoS ONE**, 2012.

LINDQVIST, D.; DHABHAR, F. S.; JAMES, S. J.; et al. Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. **Psychoneuroendocrinology**, 2017.

LIU, Q. et al. Ellagic Acid Ameliorates Renal Ischemic-Reperfusion Injury Through NOX4/JAK/STAT Signaling Pathway. **Inflammation**, 2019.

LORIGOOINI, Z., SALIMI, N., SOLTANI, A., AMINI-KHOEI, H. Implication of NMDA-NO pathway in the antidepressant-like effect of ellagic acid in male mice. **Neuropeptides**, 2019.

LUSTMAN, P. J.; ANDERSON, R. J.; FREEDLAND, K. E.; et al. Depression and poor glycemic control: A meta-analytic review of the literature. **Diabetes Care**, 2000.

MAES, M.; FIŠAR, Z.; MEDINA, M.; et al. New drug targets in depression: Inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. and new drug candidates-Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. **Inflammopharmacology**, 2012.

MAES, M., MIHAYLOVA, I., KUBERA, M., UYTTERHOEVEN, M., VRYDAGS, N., BOSMANS, E. Increased 8-hydroxy-deoxyguanosine, a marker of oxidative damage to DNA, in major depression and myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. **Neuroendocrinology Letters**, 2009.

MANSOURI, M. T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B. Ellagic acid enhances the antinociceptive action of venlafaxine in mouse acetic acid-induced pain: An isobolographic analysis. **Pharmacological Reports**, 2015.

MARÍN, M.; MARÍA GINER, R.; RÍOS, J. L.; CARMEN RECIO, M. Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. **Journal of Ethnopharmacology**, 2013.

MARTÍN-DE-SAAVEDRA, M. D.; BUDNI, J.; CUNHA, M. P.; et al. Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. **Psychoneuroendocrinology**, 2013.

MEZUK, B.; EATON, W. W.; ALBRECHT, S.; GOLDEN, S. H. Depression and type 2 diabetes over the lifespan: A meta-analysis. **Diabetes Care**, 2008.

NAGHIZADEH, B.; MANSOURI, M. T.; GHORBANZADEH, B. Ellagic acid enhances the antinociceptive action of carbamazepine in the acetic acid writhing test with mice. **Pharmaceutical Biology**, 2016.

NISHIKAWA, T.; ARAKI, E. Impact of Mitochondrial ROS Production in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus and Its Complications. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2006.

NURMIKKO, T. J.; SERPELL, M. G.; HOGGART, B.; et al. Sativex successfully treats neuropathic pain characterised by allodynia: A randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Pain**, 2007.

OBROSOVA, I. G.; PACHER, P.; SZABÓ, C.; et al. Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. **Diabetes**, 2005.

OLUKMAN, M.; ÖNAL, A.; ÇELENK, F.; et al. Treatment with NADPH oxidase inhibitor apocynin alleviates diabetic neuropathic pain in rats. **Neural Regeneration Research**, 2018.

PACHER, P.; OBROSOVA, I. G.; MABLEY, J. G.; SZABÓ, C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. **Current medicinal chemistry**, 2005.

PANCHAL, S. K.; WARD, L.; BROWN, L. Ellagic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. **European Journal of Nutrition**, 2013.

PATHAK, L.; AGRAWAL, Y.; DHIR, A. Natural polyphenols in the management of major depression. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 2013.

PEREIRA, M. M.; DE MORAIS, H.; DOS SANTOS SILVA, E.; et al. The antioxidant gallic acid induces anxiolytic-, but not antidepressant-like effect, in streptozotocin-induced diabetes. **Metabolic Brain Disease**, 2018.

POLCE, S. A.; BURKE, C.; FRANÇA, L. M.; et al. Ellagic acid alleviates hepatic oxidative stress and insulin resistance in diabetic female rats. **Nutrients**, 2018.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; BLAVET, N.; DENIEL, M.; JALFRE, M. Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, 1979.

RAMOS, K. M.; JIANG, Y.; SVENSSON, C. I.; CALCUTT, N. A. Pathogenesis of spinally mediated hyperalgesia in diabetes. **Diabetes**, 2007.

REDIVO, D. D. B.; SCHREIBER, A. K.; ADAMI, E. R.; et al. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. **Behavioural Brain Research**, 2016.

RÉUS, G. Z.; STRINGARI, R. B.; DE SOUZA, B.; et al. Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2010.

RIBEIRO, A. J.; LOPES, M.; MONTEIRO, R.; et al. Diabetes. **Nanomedicine for Inflammatory Diseases**, 2017.

RÍOS, J. L.; GINER, R. M.; MARÍN, M.; RECIO, M. C. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. **Planta Medica**, 2018.

ROSEMANN, T.; BACKENSTRASS, M.; JOEST, K.; et al. Predictors of depression in a sample of 1,021 primary care patients with osteoarthritis. **Arthritis Care and Research**, 2007.

ROZENTSVIT, A.; VINOKUR, K.; SAMUEL, S.; et al. Ellagic Acid Reduces High Glucose-Induced Vascular Oxidative Stress Through ERK1/2/NOX4 Signaling

Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 2017.

SBIERSKI-KIND, J., SCHMIDT-BLEEK, K., STREITZ, M., KATH, J., SPRANGER, J., VOLK, H. D. An Advanced Murine Model for Nonalcoholic Steatohepatitis in Association with Type 2 Diabetes. **Journal of visualized experiments: JoVE**, 2019.

SCHREIBER, A. K. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. **World Journal of Diabetes**, 2015.

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

SELVARAJAH, D.; GANDHI, R.; EMERY, C. J.; TESFAYE, S. Randomized placebo-controlled double-blind clinical trial of cannabis-based medicinal product (Sativex) in painful diabetic neuropathy: Depression is a major confounding factor. **Diabetes Care**, 2010.

SEMENKOVICH, K.; BROWN, M. E.; SVRAKIC, D. M.; LUSTMAN, P. J. Depression in type 2 diabetes mellitus: Prevalence, impact, and treatment. **Drugs**, 2015.

SEPAND, M. R.; GHAREMANI, M. H.; RAZAVI-AZARKHIAVI, K.; et al. Ellagic acid confers protection against gentamicin-induced oxidative damage, mitochondrial dysfunction and apoptosis-related nephrotoxicity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2016.

SINGH, H.; ARORA, R.; ARORA, S.; SINGH, B. Ameliorative potential of *Alstonia scholaris* (Linn.) R. Br. against chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2017.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, 2012.

SHICHIRI, M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 2014.

SMITH, K. Mental health: A world of depression. **Nature**, 2014.

TAGUCHI, K.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. **Genes to Cells**, 2011.

UZAR, E.; ALP, H.; CEVIK, M. U.; et al. Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. **Neurological Sciences**, 2012.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: A review. **Journal of Food Biochemistry**, 2005.

WALKER, A. K.; KAVELAARS, A.; HEIJNEN, C. J.; DANTZER, R. Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. **Pharmacological Reviews**, 2014.

WANG, G.; HE, X.; ZHU, G.; et al. Ellagic acid supports neuron by regulating astroglia Nrf2. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2019.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 2010.

WAYS, C. A.; MESCKA, C. P.; VANZIN, C. S.; RIBAS, G. S.; GUERREIRO, G., et al. Brain effect of insulin and clonazepam in diabetic rats under depressive-like behavior. **Metab Brain Dis**, 2013.

WEYERER, S., HEWER, W., PFEIFER-KURDA, M., DILLING, H. Psychiatric disorders and diabetes—results from a community study. **Journal of psychosomatic research**, 1989.

YAMA, K.; SATO, K.; MURAO, Y.; TATSUNAMI, R.; TAMPO, Y. Epalrestat upregulates heme oxygenase-1, superoxide dismutase, and catalase in cells of the nervous system. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 2016.

YANAR, K., COSKUN, Z. M., BEYDOGAN, A. B., AYDIN, S., BOLKENT, S. The effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on Krüppel-like factor-4 expression, redox homeostasis, and inflammation in the kidney of diabetic rat. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2019.

YAO, W.; ZHANG, J. C.; ISHIMA, T.; et al. Role of Keap1-Nrf2 signaling in depression and dietary intake of glucoraphanin confers stress resilience in mice. **Scientific Reports**, 2016.

YONAR, S. M. Growth performance, haematological changes, immune response, antioxidant activity and disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diet supplemented with ellagic acid. **Fish & shellfish immunology**, 2019.

YOWTAK, J.; LEE, K. Y.; KIM, H. Y.; et al. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain by reducing spinal GABA release. **Pain**, 2011.

YU, Y. M.; CHANG, W. C.; WU, C. H.; CHIANG, S. Y. Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2005.

YÜCE, A.; ATEŞŞAHİN, A.; ÇERİBAŞI, A. O.; AKSAKAL, M. Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, 2007.

ZAAFAN, M. A.; HARIDY, A. R.; ABDELHAMID, A. M. Amitriptyline attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis: modulation of the expression of NF- κ B, iNOS, and Nrf2. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2019.

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

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: Evidence from the elevated T-maze test of anxiety. **Behavioural Pharmacology**, 2005.

ZEB, A.; AKBAR, A. Ellagic acid suppresses the oxidative stress induced by dietary-oxidized tallow. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

ZILLIOX, L. A. Neuropathic Pain. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, 2017.

ZIS, P.; DASKALAKI, A.; BOUNTOUNI, I.; et al. Depression and chronic pain in the elderly: Links and management challenges. **Clinical Interventions in Aging**, 2017.

ZHANG, Y.; CHEN, Y.; MA, L. Depression and cardiovascular disease in elderly: Current understanding. **Journal of Clinical Neuroscience**, 2018.

ZHAO, W., ZHU, D., ZHANG, Y., ZHANG, C., WANG, Y., YANG, Y., YU, Y. Pineal gland abnormality in major depressive disorder. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, 2019.

ZHUANG, Q.-S.; SHEN, L.; JI, H.-F. Quantitative assessment of the bidirectional relationships between diabetes and depression. **Oncotarget**, 2017.