

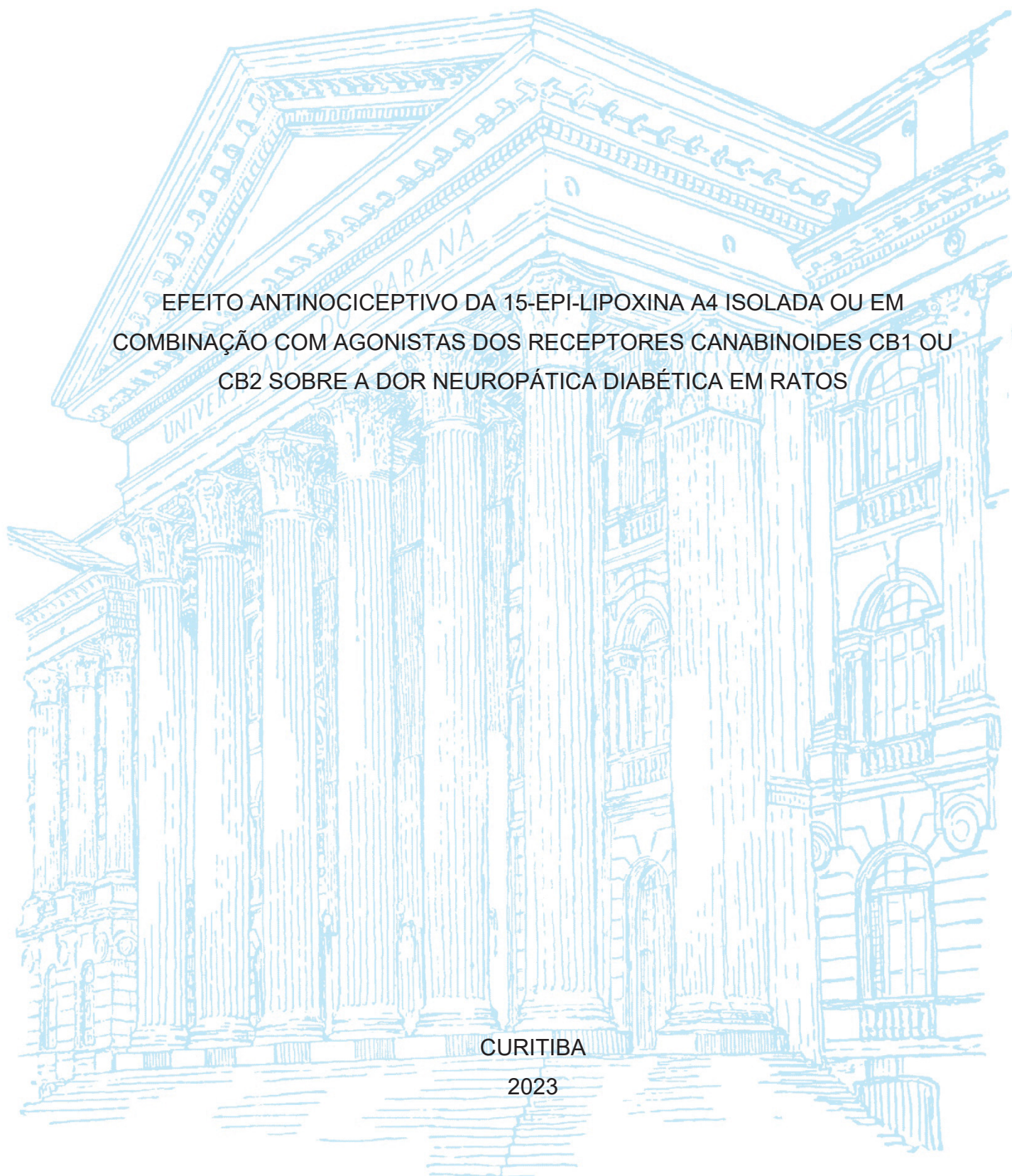
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MATHEUS VINICIUS FERREIRA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA 15-EPI-LIPOXINA A4 ISOLADA OU EM
COMBINAÇÃO COM AGONISTAS DOS RECEPTORES CANABINOIDES CB1 OU
CB2 SOBRE A DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA EM RATOS

CURITIBA

2023



MATHEUS VINICIUS FERREIRA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA 15-EPI-LIPOXINA A4 ISOLADA OU EM
COMBINAÇÃO COM AGONISTAS DOS RECEPTORES CANABINOIDES CB1 OU
CB2 SOBRE A DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA EM RATOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha

Coorientador(a): Prof^a. Dr^a. Janaína Menezes Zanoveli

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ferreira, Matheus Vinicius

Efeito antinociceptivo da 15-epi-lipoxina A4 isolada ou em combinação com agonistas dos receptores canabinoides CB1 ou CB2 sobre a dor neuropática diabética em ratos / Matheus Vinicius Ferreira. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

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

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

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Janaína Menezes Zanoveli.

1. Estreptozotocina. 2. Canabinoides. 3. Neuropatia. 4. Ansiedade. I. Cunha, Joice Maria da, 1973-. II. Zanoveli, Janaina Menezes. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

ATA Nº328

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA**

No dia quatorze de março de dois mil e vinte e três às 14:00 horas, na sala 105, Auditório do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **MATHEUS VINICIUS FERREIRA**, intitulada: **EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA 15-EPI-LIPOXINA A4 ISOLADA OU EM COMBINAÇÃO COM AGONISTAS DOS RECEPTORES CANNABINOIDES CB1 OU CB2 SOBRE A DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA EM RATOS**, sob orientação da Profa. Dra. JOICE MARIA DA CUNHA. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: JOICE MARIA DA CUNHA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), LUANA FISCHER (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), BRUNO JACSON MARTYNHAK (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela **APROVAÇÃO**. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, JOICE MARIA DA CUNHA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 14 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

15/03/2023 10:18:32.0

JOICE MARIA DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

16/03/2023 19:54:30.0

LUANA FISCHER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/03/2023 09:04:32.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 264062

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 264062



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MATHEUS VINICIUS FERREIRA** intitulada: **EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA 15-EPI-LIPOXINA A4 ISOLADA OU EM COMBINAÇÃO COM AGONISTAS DOS RECEPTORES CANABINOIDES CB1 OU CB2 SOBRE A DOR NEUROPÁTICA DIABÉTICA EM RATOS**, sob orientação da Profa. Dra. JOICE MARIA DA CUNHA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

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

CURITIBA, 14 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

15/03/2023 10:18:32.0

JOICE MARIA DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

16/03/2023 19:54:30.0

LUANA FISCHER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/03/2023 09:04:32.0

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Aos meus amados Lúcia, Cláudia, José e Anderson dedico essa grande conquista a vocês, que estiveram sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando a seguir meus sonhos e objetivos.

AGRADECIMENTOS

Primeiro, à minha família; minha falecida mãe Cláudia, de onde você estiver espero estar deixando você orgulhosa! Minha querida Vó Lúcia, que sempre cuidou de mim e sempre esteve ao meu lado. Ao meu Padrinho José, obrigado pela família Calixto me acolher e sempre me apoiar e incentivar aos estudos. E é claro, ao meu melhor amigo e “brother from another mother” Anderson, que desde 2010 sempre esteve ao meu lado me apoiando independente da situação, ao meu amigo Thales, que mesmo distante na maior parte deste trabalho sempre me apoiou e acreditou em mim!

À minha orientadora, Professora Joice Maria da Cunha, que abriu a porta do laboratório e acreditou em mim desde o princípio. E que em um dos episódios mais drásticos da minha vida soube me aconselhar e entender minha situação. A pessoa mais humana e acolhedora que conheço, nada de mim seria como pessoa e cientista!

Ao meu querido ex-companheiro de laboratório Carlos, que teve toda paciência de me ensinar quando cheguei no departamento, e que mesmo com o pouco tempo que passamos juntos, tenho muito apreço por você;

Aos amigos que fiz durante essa jornada, Gabrielle, Jaderson, Raquiline, Bruno, Rafaela, Kauê, Ana e Álvaro, vocês me ajudaram em cada passo dessa trajetória, tanto em experimentos quanto em boas conversas! Obrigado por trazerem sorrisos aos meus momentos tristes e principalmente pelos sorrisos nos momentos felizes!

Aos animais utilizados nesse estudo, que deram sua vida sem que sequer fossem dados direito de escolha;

A todos os professores do Departamento de Farmacologia, os ensinamentos que trouxeram me fizeram crescer como cientista;

a todas as pessoas, mesmo que passageiras, tiveram um impacto nesse trabalho, me fazendo evoluir como pessoa;

À Universidade Federal do Paraná por fornecer toda estrutura física para os estudos e pesquisa;

À CAPES pelo apoio financeiro.

*“So, when the saints go marching in
They won’t be singing for your sins
They just hope to hell
You’ve learn’t something living and breathing”*

Four Walls – While She Sleeps

RESUMO

A neuropatia é uma complicação comum do diabetes que pode se manifestar como dor espontânea, hiperalgesia e alodinia. Ela está frequentemente associada a uma maior prevalência de transtornos psiquiátricos, como depressão e ansiedade. As abordagens farmacológicas atuais para gerenciar essas complicações não são eficazes. Nosso estudo teve como objetivo investigar os efeitos da 15-epi-lipoxina A4 (ATL), um mediador lipídico especializado pró-resolução, na dor neuropática, e comportamentos do tipo-depressivo e ansioso associados ao diabetes experimental. Além disso, exploramos os benefícios potenciais da combinação de ATL com agonistas canabinoides (ACEA e JWH-133). Este estudo visa lançar luz sobre o potencial do ATL no tratamento das comorbidades do diabetes e o papel do sistema endocanabinoide nesse processo. A diabetes experimental foi induzida por uma única injeção de estreptozotocina (STZ; 60mg/kg; i.p) em ratos Wistar machos (pesando 180-240g). A alodinia mecânica foi avaliada por meio de um teste eletrônico de Von Frey (VF) e foi realizada um dia antes da injeção de STZ e novamente do 14º ao 27º dia após STZ. O teste de campo aberto (TCA), o labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste modificado de natação forçada (NFm) foram realizados no 28º, 29º ou 30º dia após STZ, respectivamente. Quando comparados aos ratos NGL-VEI, os animais DBT-VEI desenvolveram: 1) uma redução significativa do limiar mecânico no VF, começando no 14º dia após a indução do diabetes, atingindo o pico no 27º dia; 2) uma redução significativa no número de cruzamentos no TCA; 3) uma redução significativa no tempo e nas entradas nos braços abertos, no teste LCE; 4) um aumento significativo no tempo de imobilidade e também uma redução significativa no número médio de nado e escaladas no NFm. Nossos resultados demonstram que o tratamento com ATL (0,3, 1, 3, 10 e 30ng/rato i.p) atenuou a alodinia mecânica e o comportamento do tipo ansioso sem prejudicar a atividade locomotora. No entanto, o tratamento não foi eficaz na redução do comportamento do tipo-depressivo. Além disso, o estudo revelou pela primeira vez que a combinação de ATL com ACEA (10µg e 30µg/10µL; i.t.), um agonista do receptor CB1, melhorou o limiar mecânico em ratos diabéticos. Além disso, a associação de ATL com JWH-133 (10µg e 30µg/10µL; i.t.), um agonista seletivo do receptor CB2, também melhorou o limiar mecânico em ratos Wistar machos diabéticos. Essas descobertas sugerem que o ATL pode ter potencial terapêutico para tratar a alodinia mecânica e o comportamento semelhante à ansiedade associados ao diabetes.

Palavras-chave: Estreptozotocina; 15-epi-lipoxina A4; Canabinoides; Neuropatia; Ansiedade.

ABSTRACT

Neuropathy is a common complication of diabetes that can manifest as spontaneous pain, hyperalgesia, and allodynia. It is often associated with a higher prevalence of psychiatric disorders such as depression and anxiety. Current pharmacological approaches to manage these complications are not effective. Our study aimed to investigate the effects of 15-epi-lipoxin A4 (ATL), a specialized pro-resolving lipid mediator, on neuropathic pain and depressive- and anxiety-like behaviors associated with experimental diabetes. Additionally, we explored the potential benefits of combining ATL with cannabinoid agonists (ACEA and JWH-133). This study aims to shed light on the potential of ATL in treating diabetes comorbidities and the role of the endocannabinoid system in this process. Experimental diabetes was induced by a single injection of streptozotocin (STZ; 60mg/kg; i.p) in male Wistar rats (weighing 180-240g). Mechanical allodynia was assessed using an electronic Von Frey (VF) test and was performed one day before STZ injection and again from day 14 to day 27 after STZ. The open field test (OFT), elevated plus maze (EPM), and modified forced swimming test (FSTm) were performed on day 28, 29, or 30 after STZ, respectively. When compared to NGL-VEI rats, DBT-VEI animals developed: 1) a significant reduction in mechanical threshold on VF, starting on day 14 after diabetes induction, peaking on day 27; 2) a significant reduction in the number of crossings in OFT; 3) a significant reduction in time and entries in open arms in EPM; 4) a significant increase in immobility time and a significant reduction in the average number of swimming and climbing in FSTm. Our results demonstrate that treatment with ATL (0.3, 1, 3, 10, and 30ng/rat i.p) attenuated mechanical allodynia and anxiety-like behavior without impairing locomotor activity. However, treatment was not effective in reducing depressive-like behavior. Furthermore, the study revealed for the first time that the combination of ATL with ACEA (10 μ g and 30 μ g/10 μ L; i.t.), a CB1 receptor agonist, improved mechanical threshold in diabetic rats. Additionally, the combination of ATL with JWH-133 (10 μ g and 30 μ g/10 μ L; i.t.), a selective CB2 receptor agonist, also improved mechanical threshold in male Wistar diabetic rats. These findings suggest that ATL may have therapeutic potential to treat mechanical allodynia and anxiety-like behavior associated with diabetes.

Keywords: Streptozotocin; 15-epi-lipoxin A4; Cannabinoids; Neuropathy; Anxiety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – EFEITO AGUDO DA ATL SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS	35
Figura 2 - EFEITO CUMULATIVO DA ATL SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS	37
Figura 3 - EFEITO DA ATL SOBRE LOCOMOÇÃO E OUTROS PARAMETROS NO TESTE DE CAMPO ABERTO.....	40
Figura 4 - EFEITO DA ATL SOBRE COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	42
Figura 5 - EFEITO DA ATL SOBRE COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO NO TESTE MODIFICADO DE NADO FORÇACO	44
Figura 6 - EFEITO DA COMBINAÇÃO DE ATL E ACEA 30µg SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS.....	48
Figura 7 - EFEITO DA COMBINAÇÃO DE ATL E JWH-133 30µg SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS.....	50
Figura 8 - EFEITO DA COMBINAÇÃO DE ATL ACEA E JWH-133 10µg SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 - EFEITO DA ATL SOBRE PESO E GLICEMIA DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR STZ.....	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

2-AG - 2-Araquidonoil-Glicerol
5-LOX - 5-Lipooxigenase
12/15-LOX - 12/15-Lipooxigenase
ACEA - Araquidonil-2'-cloroetilamida
AEA - Anandamida
AGEs - Produtos de Glicação Avançada
AT - Aspirin-triggered
ATL - Aspirin-triggered Lipoxin-A4
BL - Baseline
CB1 - Receptor Canabinoide do Tipo 1
CB2 - Receptor Canabinoide do Tipo 2
CBs - Canabinoides
GPCR - Receptor Acoplado a Proteína G
CCI - Lesão de constrição Crônica
DAGL- α - Diacilglicerol α
DAGL- β - Diacilglicerol β
DBT - Diabético
DRG - Gânglio da Raiz Dorsal
DHA - Ácido docosahexaenóico
DPA - Ácido docosapentaenóico
dPAG - Substância Cinzenta Periaqueductal Dorsal
DM - Diabetes Mellitus
EPA - ácido eicosapentaenoico
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
FAAH - Amida Hidrolase de Ácido Graxos GS - Glicose Sérica
HPA - Eixo Hipófise- Pituitária-Adrenal
IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase
IL-1 β - Interleucina-1 β
IL-6 - Interleucina-6
IFN- γ - Interferon- γ
I.P. - Injeção Intraperitoneal
I.T. - Injeção Intratecal

JWH-133 - Dimethylbutyl-deoxy-Delta-8-THC
LCE - Teste de Labirinto em Cruz Elevado
LPS - Lipopolissacarideo
LXA-A4 - Lipoxina-A4
LXA-B4 - Lipoxina B4
MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MGL - Monoacil Glicerol Lipase
mTORC1 - Alvo mamífero do complexo 1 de rapamicina
NAPE - N-acilfosfatidiletanolamina
NAPE PLD - N-acilfosfatidiletanolamina fosfolipase D
ND - Neuropatia Diabética
NF- κ B - Fator Nuclear κ B
NFm - Teste Modificado de Nado Forçado
NGL - Normoglicêmico
NNT - Número Necessário para Tratar
PDS - Polineuropatia Crônica Distal Simétrica
PT-NFm - Pré teste do Nado Forçado Modificado
PUFAs - Ácidos Graxos Poli-insaturados
RvD - Resolvinas série D
RvE - Resolvinas série E
SNC - Sistema Nervoso Central
SPMs - Mediadores Lipídicos Pró-Resolutivos
SSRIs - Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
STAT 1 - Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1
STAT 3 - Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3
STZ - Estreptozotocina
TCA - Teste de Campo Aberto
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α
VEI - Veículo
VF- Teste Eletrônico de Von Frey

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 DIABETES.....	17
1.2 NEUROPATIA DIABÉTICA	18
1.3 ANSIEDADE E DEPRESSÃO ASSOCIADAS AO DIABETES	20
1.4 NEUROINFLAMAÇÃO NAS COMPLICAÇÕES DO DIABETES	22
1.5 SISTEMA ENDOCANABINOIDE.....	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.3 ANIMAIS.....	28
2.4 DROGAS.....	28
2.5 INDUÇÃO DO DIABETES.....	28
2.6 TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO	29
2.7 TESTE DE CAMPO ABERTO	30
2.8 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	30
2.9 TESTE MODIFICADO DE NADO FORÇADO.....	30
2.10 INJEÇÃO INTRATECAL.....	31
2.11 DESENHO EXPERIMENTAL	32
2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3 RESULTADOS	34
3.1 ATL ATENUA A ALODINIA MECÂNICA NO TESTE ELETRÔNICO DE VON FREY.....	34
3.2 ATL DEMONSTROU UM EFEITO ANTINOCICEPTIVO CUMULATIVO NO TESTE ELETRÔNICO DE VON FREY	36
3.3 O TRATAMENTO COM ATL NÃO ALTERA O COMPORTAMENTO LOCOMOTOR E ATENUA MEDIDAS ETOLÓGICAS RELACIONADAS AO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DE CAMPO ABERTO	39
3.4 ATL DIMINUI COMPORTAMENTO DO TIPO- ANSIOSO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	41

3.5 ATL NÃO FOI CAPAZ DE REDUZIR O COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO NO TESTE DE NADO FORÇADO MODIFICADO	43
3.6 O TRATAMENTO COM ATL NÃO FOI CAPAZ DE REVERTER A HIPERGLICEMIA E BAIXO GANHO DE PESO EM ANIMAIS DIABÉTICOS POR STZ.....	46
3.7 O TRATAMENTO COM ATL AUMENTA O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO AGONISTA CANABINOIDE CB1 EM RATOS DIABÉTICOS POR STZ.....	47
3.8 O TRATAMENTO COM ATL AUMENTA O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO AGONISTA CANABINOIDE CB2 EM RATOS DIABÉTICOS POR STZ.....	49
3.9 A COMBINAÇÃO DOS CANABINOIDES NA MENOR DOSE NÃO APRESENTA POTENCIALIZAÇÃO NA PRESENÇA DO PRÉ-TRATAMENTO COM ATL.....	51
4 DISCUSSÃO	54
5 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO 1 – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica que ocorre devido a um déficit na produção ou na ação do hormônio insulina, resultando em níveis elevados de glicose no sangue. Atualmente, mais de 537 milhões de pessoas sofrem com essa condição e se estima que até 2045 esse número chegue a 783 milhões. A DM é uma questão de saúde relevante e tem um impacto financeiro significativo, sendo responsável por cerca de um trilhão de dólares em despesas (ATLAS DA FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DO DIABETES, 2021).

O DM é classificado em dois tipos principais: tipo 1, que acomete cerca de de 5% dos indivíduos e é o resultado de uma reação autoimune que afeta as células beta do pâncreas e leva à deficiência de insulina e tipo 2, mais prevalente que representa cerca de 90% dos casos e é causado por produção insuficiente de insulina e/ou incapacidade do corpo em responder à insulina produzida (resistência à insulina; (Cole & Florez, 2020).

Mesmo sendo de menor prevalência, a dificuldade na prevenção e o avanço autoimune da doença coloca o DM tipo 1 como um dos focos na atenção epidemiológica. A 10^a. Edição do Atlas produzido pela IDF mostra que mais de 1,2 milhão de crianças e adolescentes convivam com o DM do tipo 1 e que a cada ano estima-se que mais de 184.100 mil casos novos sejam diagnosticados na população em geral. No Brasil cerca de 8,9 mil crianças e adolescentes de 0-19 anos são diagnosticadas por ano, sendo o terceiro maior país com essa incidência, atrás apenas de Estados Unidos e Índia (ATLAS DA FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DO DIABETES, 2021).

A hiperglicemia a longo prazo resulta em disfunções celulares e bioquímicas e independentemente do tipo de diabetes, pacientes com hiperglicemia estão vulneráveis ao desenvolvimento de complicações crônicas similares, embora a velocidade da progressão possa diferir. As complicações do DM são divididas em macrovasculares (e.g. doença arterial coronária, doença cerebrovascular e a doença arterial periférica) e microvasculares (e.g. nefropatia, retinopatia, polineuropatia) (Calcutt, 2020; Feldman et al., 2019; Schreiber, 2015; Selvarajah et al., 2019).

1.2 NEUROPATIA DIABÉTICA

A neuropatia diabética (ND) é uma complicação frequente da diabetes mellitus, com uma prevalência de aproximadamente 50% em pacientes diagnosticados com a doença (Iqbal et al., 2018). Além disso, cerca de um terço dos pacientes com ND apresentam dor neuropática, uma condição que pode ser muito debilitante (Calcutt, 2020).

A neuropatia é definida como um distúrbio de função ou alteração patológica em fibras nervosas (Colloca et al., 2017). A ND é caracterizada por danos nos sistemas nervosos periféricos e autonômicos, causada por alterações metabólicas decorrentes da exposição crônica à hiperglicemia (Bönhof et al., 2019; Brownlee, 2001), em que a polineuropatia distal simétrica (PDS) é a forma mais comum desse distúrbio (Feldman et al., 2019). A PDS é uma condição que afeta cerca de 30% dos pacientes diabéticos, e é caracterizada como uma polineuropatia sensório-motora dependente de comprimento (Calcutt, 2020; Selvarajah et al., 2019).

A ND afeta o sistema nervoso periférico, e embora não se saiba exatamente onde ocorre o primeiro dano neuronal, os neurônios sensoriais na periferia são mais vulneráveis a danos associados à hiperglicemia do que os neurônios motores (O'Brien et al., 2015). A informação sensorial é recebida através de fibras sensoriais, denominadas como fibras A ou C, no qual são classificadas por tamanho e velocidade de condução elétrica, sendo as fibras C de pequeno calibre e lenta velocidade de condução, por não serem mielinizadas, enquanto fibras A, são de média a grande calibre e têm rápida condução elétrica por serem fibras com alguma ou grande quantidade de mielina (Basbaum et al., 2009). É sabido que o estado hiperglicêmico pode causar desmielinização e/ou dano direto aos axônios, através de danos diretos ou indiretos às células de Schwann, responsáveis pela produção e manutenção da mielina que envolve os axônios dos neurônios periféricos, permitindo a rápida condução de sinais elétricos ao longo do sistema nervoso periférico (Gumy et al., 2008).

Embora ainda não caracterizada, a fisiopatologia da ND parece envolver inúmeros fatores aparentemente indissociáveis. Sabe-se que a hiperglicemia resulta em um aumento na produção de superóxido mitocondrial, o que, por sua vez, leva a um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs desencadeiam uma série de eventos, incluindo a hiperatividade da via da aldose

redutase e da hexosaminases, a ativação da proteína quinase C e o aumento de produtos de glicosilação avançada (AGEs). Isso acontece devido ao aumento do metabolismo da glicose, já que a via glicolítica é inibida pelo dano ao DNA causado pelas EROs. Estes eventos são os principais complicadores para a progressão das complicações do DM, como a ND (Brownlee, 2001; Dewanjee et al., 2018).

Além disso, a inflamação crônica também desempenha um papel importante na fisiopatologia do DN (Feldman et al., 2019; Pop-Busui et al., 2016). A hiperglicemia crônica pode, através da produção de EROs ativar vias inflamatórias, resultando no aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β). O TNF- α e a IL-1 β causam danos aos nervos periféricos, resultando em desmielinização e morte neuronal. Além disso, a inflamação pode ativar células gliais, como astrócitos e células de Schwann, que podem produzir citocinas pró-inflamatórias adicionais e aumentar a neuro inflamação (Bönhof et al., 2019; da Silva Dias et al., 2016; Gummy et al., 2008; Maes, 2011; Pop-Busui et al., 2016; K. Wang et al., 2019b).

Essas disfunções bioquímicas causam sintomas clássicos da ND como mudanças na percepção sensorial de estímulos de diversas naturezas, como mecânicos, térmicos e/ou químicos, e dor (Schreiber, 2015). Por sua vez, a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano atual ou potencial, e que a experiência de vida do indivíduo e seu contexto social são importantes para a definição de dor, definido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*, 2020). A dor neuropática diabética é caracterizada por sensações de dormência, dor, queimação, formigamento e coceira nos pés e mãos, sendo a dor muitas vezes mais intensa durante a noite. Além disso, pode ser acompanhada de alodinia (dor em resposta a um estímulo inócuo) e hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos nocivos), embora paradoxalmente possa haver perda de função sensorial em decorrência do dano nervoso. Esses sintomas comprometem significativamente a qualidade de vida do paciente e podem levar a outras complicações, como ansiedade e depressão, devido às dificuldades em realizar atividades cotidianas ou a reclusão social (Didangelos et al., 2014; Lee-Kubli & Calcutt, 2014; Rosenberger et al., 2020).

O tratamento da ND e da dor neuropática diabética é um desafio, consistindo no gerenciamento dos sintomas dolorosos. Entretanto, a maioria dos tratamentos tem

uma eficácia moderada baseado no número necessário para tratar (NNT; número necessário de pacientes para tratar em comparação com placebo para que se tenha resposta maior que o grupo de comparação). Os principais tratamentos consistem na administração de anticonvulsivantes como pregabalina e gabapentina, antidepressivos como duloxetina e desvenlafaxina (Colloca et al., 2017; Edwards et al., 2008; Schreiber, 2015)

Os antidepressivos são a primeira opção no tratamento da dor neuropática diabética, incluindo os inibidores duais da recaptção de serotonina e noradrenalina, tais como duloxetina e venlafaxina, além dos antidepressivos tricíclicos como amitriptilina e nortriptilina. Esses fármacos têm eficácia semelhante aos anticonvulsivantes, embora possam causar efeitos adversos como boca seca, hipotensão postural, arritmias, prejuízo cognitivo, constipação e retenção urinária. Quanto aos anticonvulsivantes, apenas gabapentina e pregabalina têm se mostrado eficazes no tratamento da dor neuropática diabética. Alguns estudos clínicos sugerem que esses fármacos produzem maior eficácia analgésica do que os antidepressivos tricíclicos e opioides. No entanto, eles também podem causar efeitos colaterais como tonturas, sonolência, edema periférico, dor de cabeça e ganho de peso (Calcutt, 2020; Schreiber, 2015).

Os opioides são recomendados apenas como segunda ou terceira opção para o tratamento da dor neuropática diabética. Estudos têm demonstrado que fármacos como tramadol, morfina e oxicodona apresentam eficácia significativa nessa condição, podendo ser associados a outros medicamentos para maior eficácia terapêutica. No entanto, esses fármacos têm inúmeros efeitos colaterais, como náuseas, constipação, dor de cabeça e sonolência, dificultando a adesão ao tratamento crônico (Finnerup et al., 2013; Edwards et al., 2008; Iqbal et al., 2018; Schreiber, 2015).

1.3 ANSIEDADE E DEPRESSÃO ASSOCIADAS AO DIABETES

A depressão é um transtorno mental crescente em todo o mundo, afetando mais de 300 milhões de pessoas de todas as idades e impondo uma grande carga aos custos de saúde, de acordo com a organização panamericana de saúde (OPAS). Além da tristeza excessiva, outros sintomas incluem perda de interesse ou prazer, transtornos alimentares e do sono, bem como transtornos de ansiedade caracterizados por medo e preocupação excessiva (OPAS, 2020).

Os sintomas depressivos constituem uma interação complexa de mudanças afetivas, cognitivas e comportamentais que afetam consideravelmente a qualidade de vida. Os mecanismos subjacentes à depressão envolvem desregulações em neurotransmissão, sistemas neuroendócrinos como o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e processos inflamatórios. Acredita-se que a disfunção na neurotransmissão de serotonina, noradrenalina e dopamina desempenhe um papel fundamental nos sintomas depressivos. Além disso, distúrbios na regulação do eixo HPA podem resultar em níveis cronicamente elevados de hormônios do estresse, contribuindo para a manutenção do estado depressivo. A inflamação sistêmica também emergiu como um fator relevante, uma vez que processos inflamatórios podem interferir na comunicação neuronal e afetar negativamente o funcionamento do cérebro (Deschênes et al., 2015; Grigsby et al., 2002; Wang et al., 2019; Whitworth et al., 2016)

Os transtornos de ansiedade são igualmente incapacitantes ao transtorno de depressão maior. Segundo o DSM-V, esses transtornos englobam condições que apresentam características de medo e ansiedades excessivas, junto a perturbações comportamentais associadas. Os transtornos de ansiedade generalizada, social e de pânico são os mais comuns. A ansiedade é um estado de maior vigilância e responsividade que leva a comportamentos defensivos mensuráveis. Esses comportamentos são uma resposta adaptativa e fisiológica que ajudam a prevenir ou reduzir danos em situações potencialmente perigosas e, portanto, são essenciais para a sobrevivência das espécies (DSM-V, APA, 2014).

O uso combinado de antidepressivos, hipoglicemiantes e terapia psicológica é uma abordagem aceitável para tratar a depressão e ansiedade em pessoas com diabetes. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SSRIs) são a classe de antidepressivos mais estudada e prescrita para tratar a depressão em pessoas com diabetes. Outras classes de antidepressivos, como os antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, desipramina, imipramina e nortriptilina, entre outros) e os inibidores da monoamina oxidase (fenelzina, tranilcipromina, moclobemida), geralmente não são recomendados como primeira escolha para tratar a depressão em pessoas com diabetes, pois interferem no controle da glicemia e causam ganho de peso (Biagetti & Corcoy, 2013; Champaneri et al., 2010; Menezes Zanoveli et al., 2016; Rustad et al., 2011).

No entanto, é importante considerar que, dependendo do medicamento, o tratamento com antidepressivos pode piorar outras complicações diabéticas, como as cardiovasculares, e pode exigir tratamento contínuo por semanas a meses para obter uma resposta terapêutica. Como acontece no tratamento da neuropatia diabética, apenas uma pequena parcela dos pacientes com depressão responde adequadamente ao tratamento com antidepressivos. Portanto, o tratamento da depressão e da neuropatia diabética em pacientes com diabetes requer atenção especializada e individualizada (Dodd et al., 2021; Gaynes et al., 2020; Leonard, 2014; Li et al., 2019; Zanoveli et al., 2016; Rustad et al., 2011).

Além disso, a relação entre transtornos mentais como depressão e ansiedade e o DM é uma área amplamente estudada. A prevalência de transtornos depressivos em pacientes diabéticos é duas vezes maior do que em pacientes não diabéticos, e transtornos de ansiedade também são positivamente correlacionados com o DM (Deschênes et al., 2015; Grigsby et al., 2002; Whitworth et al., 2016). Além desta via bidirecional entre o DM e os transtornos de depressão e ansiedade, é possível traçar um paralelo entre inflamação crônica e os transtornos psiquiátricos, assim como uma via bidirecional entre inflamação e ND. Neste sentido, o controle inflamatório parece ser um possível alvo farmacológico (Alva, 2020; da Silva Dias et al., 2016; Li et al., 2019; Moulton et al., 2015; Roy & Lloyd, 2012; Wang et al., 2019).

1.4 NEUROINFLAMAÇÃO NAS COMPLICAÇÕES DO DIABETES

A inflamação é uma resposta imunológica complexa desencadeada por lesão tecidual, infecção ou outros estímulos nocivos. Ela é caracterizada pela ativação de células imunológicas, a liberação de mediadores inflamatórios e o aumento do fluxo sanguíneo para a área afetada. O principal objetivo da inflamação é eliminar a causa inicial do dano tecidual, eliminar células danificadas e iniciar a reparação tecidual. No entanto, a inflamação crônica pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças, como doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios autoimunes. Uma ampla gama de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e prostaglandinas, está envolvida na resposta inflamatória e o equilíbrio entre eles é crucial para determinar o resultado do processo inflamatório (Dantzer et al., 2008; Leonard, 2014; Serhan, 2005).

Por muito tempo se pensou que a inflamação fosse um processo passivo, mas pesquisas recentes demonstram que o processo inflamatório é ativo e depende de vários mediadores com atividade anti-inflamatória para sua resolução. Dentre eles, os mediadores pró-resolução especializados (SPMs) são uma classe de compostos naturalmente ocorrentes que desempenham um papel crítico Na resolução da inflamação (Chiang & Serhan, 2017; Dalli & Serhan, 2019). Eles são produzidos pelo corpo em resposta à inflamação e atuam como moléculas sinalizadoras para promover a resolução da inflamação e a reparação tecidual. Os SPMs são produtos sintetizados a partir de ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido araquidônico, o ácido eicosapentaenoico (EPA), o ácido docosapentaenoico (DPA) e o ácido docosaenoico (DHA), geralmente liberados da membrana fosfolipídica em resposta ao dano tecidual. Além disso, outras rotas de biossíntese de SPMs podem ser ativadas por acetilação do sítio ativo da COX-2 com ácido acetilsalicílico, permitindo a síntese de epímeros denominados *aspirin-triggered* (AT) (Chiang & Serhan, 2017; Fattori et al., 2019; Serhan, 2014).

Os SPMs podem ser classificados em grupos, incluindo lipoxinas (LXs), resolvinas derivadas do EPA (RvS E) ou derivadas do DHA/DPA (RvD D), protectinas derivadas do DHA/DPA (PDs) e maresinas derivadas do DHA/DPA. As lipoxinas são produzidas a partir de isoformas da lipooxigenase e da ciclooxigenase acetilada por ácido acetilsalicílico, sendo as principais isoformas a lipoxina A4 quanto lipoxina B4. As vias de síntese podem ser iniciadas pela 5-lipoxigenase (5-LO) e 15-lipoxigenase (15-LO) em neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos, macrófagos alveolares e em interações entre neutrófilos e eosinófilos ou neutrófilos e o tecido pulmonar (Chiang & Serhan, 2020; Serhan, 2005; Spite et al., 2014).

A lipoxina A4 (LXA4) é um bioativo lipídico derivado da via metabólica dos ácidos graxos essenciais, notavelmente o ácido araquidônico. Essa molécula atua como um mediador pró-resolutivo, desempenhando um papel crucial na resolução de processos inflamatórios e na promoção da homeostase tecidual. Seu principal alvo são os receptores acoplados à proteína G (GPCRs), especificamente o receptor ALX/FPR2 (receptor de lipoxina A4/*formyl peptide receptor 2*). Esse GPCR está amplamente distribuído em diversos tecidos e células, incluindo células imunes (como neutrófilos, monócitos e macrófagos), células endoteliais e epiteliais, além de ser encontrado no sistema nervoso central. A presença da LXA4 e de seu receptor

ALX/FPR2 em múltiplas localizações celulares e teciduais sugere sua relevância em diversas respostas biológicas e processos inflamatórios, em que atua mediando a inibição da ativação de células imunes, a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e a promoção da fagocitose de microrganismos e debrís celulares (Chiang & Serhan, 2017; Chiang & Serhan, 2020; Serhan, 2005)

Os SPMs, como as resolvinas já se mostraram úteis em pesquisas com animais diabéticos, reduzindo a sensibilidade mecânica na dor neuropática (Obrosov et al., 2017; Shevalye et al., 2015; M. S. Yorek et al., 2016), e também reduzindo os comportamentos do tipo ansioso e do tipo depressivo em ratos diabéticos (Leão et al., 2022).

As LXs podem ser potentes atenuadores de doenças no trato respiratório, como a asma e doenças alérgicas, bem como inibir citocinas inflamatórias e respostas pró-inflamatórias. A LXA-A4 também parece ser um mediador para a proteção de células β pancreáticas em resposta à ação citotóxica envolvendo STZ (Bathina & Das, 2019; Gundala et al., 2017). Além disso, as lipoxinas e seus análogos, juntamente com as resolvinas série D e seus análogos, podem bloquear o processamento de dor inflamatória e atenuar as respostas inflamatórias (Abdelmoaty et al., 2013). Há evidências de que as lipoxinas podem suprimir respostas inflamatórias em vários modelos de inflamação e neuroinflamação (Brennan et al., 2018; Derada Troletti et al., 2021; Martini et al., 2016). Interessantemente, a LXA-A4 é sugerida como um modulador alostérico positivo do receptor canabinoide tipo 1 (CB1) (Pamplona et al., 2010; 2012).

1.5 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O sistema endocanabinoide compreende um sistema de sinalização e modulação complexo. É composto por dois receptores, denominados como canabinoide do tipo 1 (CB1) e do tipo 2 (CB2). O CB1 é expresso em terminais pré-sinápticos e neurônios excitatórios e inibitórios no SNC e SNP, muitas vezes atuando na neurotransmissão retrógrada mediando a liberação de neurotransmissores. O receptor CB2 pode ser encontrado majoritariamente na micróglia como em células do sistema imune na periferia (Cristino et al., 2020; Di Marzo & Piscitelli, 2015a; Woodhams et al., 2015). Os receptores canabinoides são do tipo transmembrânicos e acoplados à proteína G do tipo inibitória. De fato, grande parte dos receptores CB1

estão acoplados às proteínas G inibitórias que diminuem o nível de adenilato ciclase, promovendo a inibição de canais de cálcio, e por consequência, a ativação dos canais de potássio que, por fim, podem reduzir a liberação de neurotransmissores. A ativação de CB2 também está associada à proteína G inibitória, e sua ativação ocorre em macrófagos, linfócitos, mastócitos e nas células gliais da periferia (Woodhams et al., 2015).

Contudo, no decorrer dos anos ocorreram descobertas quanto às substâncias que podem interagir endogenamente com os receptores canabinoides, tendo como um dos focos os lipídeos anandamida (etanolamida do ácido araquidônico) e o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) (Devane et al., 1992; Sugiura et al., 1995). Nesse sentido, pode-se incluir as enzimas que realizam a síntese e a degradação dos denominados endocanabinoides, enquanto a biossíntese de 2-AG e AEA podem ocorrer por diversas rotas enzimáticas, sendo a principal mediada por N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) ou pela fosfolipase-específica-D-como hidrolase (NAPE-PLD) para anandamida, ou diacilglicerol lipase alfa (DAGLa) e DAGL β para a biossíntese de 2-AG (Cristino et al., 2020). A degradação dos endocanabinoides ocorre mediante a diversas rotas enzimáticas sendo as principais mediadas pela FAAH (hidrolase amida de ácido graxo) e pela MGL (monoacil-glicerol lipase). Existem evidências de que a AEA e o 2-AG podem ser metabolizados via COX-2 (Cristino et al., 2020). Com a corrente de estudos que visaram a exploração do sistema endocanabinoide, ocorreu a síntese de compostos que podem interagir com os receptores CB1 e CB2, além dos já descobertos fitocanabinoides como o Δ -9-tetrahydrocannabinol (Δ -9-THC) e o canabidiol (CBD); o agonista seletivo CB1 arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) e o agonista seletivo CB2 JWH-133 (Coronado-Álvarez et al., 2021; Huffman, 2005; Lucas et al., 2018).

Atualmente, sabe-se que existe uma relação entre a dor neuropática e o sistema endocanabinoide (Maldonado et al., 2016). Um estudo avaliou que camundongos envelhecidos apresentam uma diminuição significativa nos níveis de endocanabinoides, que estão associados a uma redução basal nos limiares de estímulos nociceptivos. Tal mudança sugere um potencial risco na ocorrência de dores neuropáticas em camundongos com idade avançada (Bishay et al., 2013). A inibição de enzimas que degradam endocanabinoides, como a FAAH e a MAGL, parece atenuar os estímulos nociceptivos da dor neuropática através do aumento de

endocanabinoides como o 2-AG e a AEA (Desroches et al., 2008; Kinsey et al., 2009); ademais, o aumento de FAAH na dPAG está associado com o desenvolvimento de dor neuropática (Dean et al., 2019). Bealieu e Guindon, (2005) demonstraram em um que a combinação de administração local de AEA, Ibuprofeno e rofecoxib atenuam os efeitos hiperalgésicos no modelo de dor neuropática decorrente de ligação parcial do nervo ciático.

A AEA também produz efeitos em receptores endovaniloides como o TRPV1, que é um importante receptor na condução de estímulos nociceptivos no processamento da dor (Zygmunt et al., 1999). Outros agonistas endógenos como produtos da LOXs podem interagir com o receptor vaniloide TRPV1, sugerindo outros papéis para os lipídeos derivados do ácido araquidônico (Starowicz & Przewlocka, 2012). Recentes estudos de nosso laboratório demonstraram que a administração de ACEA em ratos diabéticos e normoglicêmicos foi capaz de promover um potente efeito antinociceptivo no teste de formalina. O pré-tratamento com a administração de ACEA e JWH-133 feitos por via intratecal foram capazes de melhorar a alodinia mecânica induzida por diabetes experimental com STZ; os resultados trazem uma perspectiva positiva na utilização destes compostos na DN (Gonçalves et al., 2020; Schreiber et al., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito antinociceptivo da ATL quando administrada de forma isolada ou em associação com agonistas de receptores CB1 ou CB2 sobre a alodinia mecânica em ratos com diabetes induzido quimicamente por estreptozotocina (STZ) e avaliar o efeito do tratamento com ATL em comportamentos do tipo depressivos e ansioso associados ao diabetes experimental por STZ.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da administração de ATL isoladamente ou em associação com ACEA ou JHW-133 sobre a alodinia mecânica em ratos diabéticos induzidos por STZ, utilizando o teste de Von Frey eletrônico;
- Investigar o efeito da administração de ATL isoladamente sobre comportamento do tipo ansioso em ratos diabéticos induzidos por STZ, utilizando o labirinto em cruz elevado;
- Investigar o efeito da administração de ATL isoladamente sobre o comportamento do tipo depressivo em ratos diabéticos induzidos por STZ, utilizando teste de nado forçado;
- Investigar o efeito da administração de ATL sobre a atividade locomotora em ratos diabéticos por STZ, utilizando o teste de campo aberto;
- Investigar o efeito da administração de ATL sobre parâmetros como glicemia e ganho de peso em ratos diabéticos por STZ.

3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3 ANIMAIS

Ratos Wistar machos, fornecidos pelo biotério da Universidade Federal do Paraná, pesando entre 180 e 240 g, foram acondicionados em caixas plásticas (41×32×16,5 cm) e mantidos em condições padrão de ambiente com temperatura adequada (21 ± 2 °C) e ciclo de iluminação (12h/12h claro/escuro) com água e ração ad libitum. Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê Institucional de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR; nº 1418). Este estudo foi realizado seguindo as diretrizes éticas da legislação brasileira sobre bem-estar animal, e todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

2.4 DROGAS

Foram utilizados estreptozotocina (STZ; Santa Cruz Biotechnology Inc., Califórnia, EUA) e citrato de sódio (Merck S.A. Indústrias Farmacêuticas, São Paulo, Brasil). 15(R)-Lipoxina A4 (ácido 5(S),6(R),15(R)-trihidroxi-7E,9E,11Z,13E-eicosatetraenóico) foram adquiridos da Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, Michigan, EUA). ACEA (N-(2-Cloroetil) -5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamida) e JWH-133 ((6aR,10aR) -3-(1,1-dimetilbutil) -6a,7,10,10a-tetrahidro -6,6,9-trimetil-6H-dibenzo[b,d]pirano) foram adquiridos da Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). STZ (60 mg/kg) foi previamente dissolvida em tampão citrato (10 mM, pH 4,5), ATL- A4 (0,3, 1, 3, 10 ou 30 ng/rato em 200 µL, diluído em solução salina estéril- 0,9% NaCl), enquanto ACEA (10µg ou 30µg) e JWH-133 (10µg ou 30µg) foram diluídos em etanol 1:1 e solução salina.

2.5 INDUÇÃO DO DIABETES

A indução de diabetes foi realizada em ratos em jejum de 12 horas usando uma única administração intraperitoneal de estreptozotocina (STZ; 60 mg/kg), diluída

na hora em tampão citrato (10 mM, pH 4,5). O grupo controle normoglicêmico foi tratado com tampão citrato (CB; 10 mM, pH 4,5; volume equivalente). A condição de diabetes foi confirmada três dias após a injeção de STZ pela aplicação de um pequeno volume de sangue periférico obtido por meio de uma pequena picada na cauda, nas tiras de teste impregnadas com glicose oxidase (Accu-Chek Active®, Roche). No terceiro dia após a administração da STZ, os animais cuja glicemia fosse igual ou superior a 250 mg/dL foram considerados diabéticos (grupos STZ) e permaneceram no estudo. Todos os animais tiveram o peso corporal aferido semanalmente durante o período experimental.

2.6 TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO

Para avaliação do limiar mecânico, os animais foram colocados para aclimatação na sala experimental por cerca de 60 minutos. Após a aclimatação à sala, os ratos foram colocados em um aparato constituído por caixas de acrílico (12x20x17 cm) com piso em grade de arame (5 mm²) por 15 minutos ou até cessar o comportamento exploratório para iniciar o teste. A alodinia mecânica foi avaliada com o equipamento eletrônico von Frey (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O estímulo mecânico foi produzido por meio de uma ponta plástica semiflexível acoplada a um transdutor de força. Um estímulo de pressão crescente foi aplicado perpendicularmente à superfície plantar das patas traseiras e cessou quando o animal apresentou a retirada da pata. Um espelho abaixo da grade foi usado para visualizar as patas traseiras do animal. O limiar mecânico, a pressão responsável pela retirada da pata, foi calculado pela média de três medidas feitas em cada pata. O limiar mecânico foi avaliado antes (linha de base) e em diferentes momentos após os tratamentos. A pressão de corte de 60g foi usada neste estudo e consideramos um efeito antinociceptivo quando os grupos tratados são estatisticamente significativos quando comparados ao grupo induzido por diabetes tratado com solução salina. Um grupo controle normoglicêmico tratado com veículo foi conduzido em paralelo.

2.7 TESTE DE CAMPO ABERTO

A atividade locomotora foi avaliada em um aparelho de arena constituído por uma caixa de madeira (40 × 50 × 63 cm), com fundo dividido em nove quadrantes idênticos. Os animais foram colocados individualmente no quadrante central e durante cinco minutos, o número de quadrantes cruzados foi registrado usando uma câmera de ação Sony 4 K para posterior análise (Leão et al., 2022). Após o término dos experimentos, foram avaliados os números de cruzamentos com as quatro patas realizados por cada animal. O número de quadrados percorridos foi considerado um índice de atividade locomotora.

2.8 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O comportamento do tipo ansioso dos animais foi avaliado conforme descrito anteriormente (Pellow et al., 1985). O aparelho elevado a 50 cm do chão, é constituído por 2 braços abertos opostos e dois braços fechados opostos, ligados por uma zona central. Os animais foram colocados para aclimação por sessenta minutos, e então cada rato foi individualmente colocado na área central, de frente para o braço aberto, e por cinco minutos, seus movimentos foram gravados em vídeo, usando a câmera de ação Sony 4 K, para posterior análise. Todos os testes foram feitos usando iluminação de 40 lux na sala de experimentos. Foram avaliados o número de entradas em ambos os braços e o tempo de permanência nos braços aberto e fechado. A entrada só foi contabilizada quando o animal cruzou a delimitação dos braços com as quatro patas. Antes de testar outro animal, o LCE foi limpo com uma solução de álcool à 20%. Um aumento na porcentagem de atividade no braço aberto sem alteração na atividade locomotora geral foi considerado um efeito do tipo ansiolítico.

2.9 TESTE MODIFICADO DE NADO FORÇADO

O teste foi realizado de acordo com a versão modificada de Detke (Detke et al., 1995; Detke & Lucki, 1995) e foi realizado em duas sessões. A sessão de pré-teste, com duração de quinze minutos foi realizada 24 horas antes da sessão de teste, com duração de cinco minutos.

Os ratos foram colocados individualmente para nadar em um cilindro de PVC (20 cm × 50 cm) contendo 30 cm de coluna de água à $24 \pm 1^\circ\text{C}$. As sessões de pré-teste e teste foram realizadas no período da tarde. O comportamento dos ratos foi gravado em vídeo usando uma câmera de ação Sony 4 K para posterior análise. Para a análise, observamos os comportamentos de: 1) imobilidade-que se caracteriza pela ausência de movimentação do animal, exceto por alguns movimentos para flutuar e manter a cabeça fora d'água; 2) de natação- que se caracteriza por movimentos ativos do animal no cilindro com água e 3) de escalada- que se caracteriza por movimentos das patas dianteiras do animal em direção às paredes do cilindro, indicando uma tentativa de fuga do aparelho. O comportamento predominante expresso pelo animal a cada cinco segundos do vídeo foi quantificado. Após as sessões de pré-teste e teste, os animais foram retirados da água, secos e devolvidos às suas gaiolas. A água dos cilindros foi trocada a cada sessão para evitar interferência entre os animais. Consideramos um efeito do tipo antidepressivo quando as contagens médias de imobilidade são diminuídas, e as contagens médias dos comportamentos de natação e escalada são aumentadas quando os grupos de tratamento são comparados ao grupo diabético tratado com solução salina. Além disso, para o comportamento do tipo depressivo, consideramos uma contagem média aumentada para imobilidade e contagens médias diminuídas para natação e escalada quando o grupo controle diabético foi comparado ao grupo normoglicêmico tratado com solução salina.

2.10 INJEÇÃO INTRATECAL

Para injeção intratecal, os animais foram anestesiados com halotano à 4% e uma agulha de 1 polegada e 25 cm foi inserida por via transcutânea no nível L5-L6 no espaço subaracnóideo, conforme descrito anteriormente (Gonçalves et al., 2022). A presença de um movimento rápido da cauda indicava que a agulha havia entrado no espaço subaracnóideo. Ratos controle normoglicêmicos e diabéticos receberam uma injeção intratecal apenas do veículo.

2.11 DESENHO EXPERIMENTAL

No primeiro conjunto de experimentos, examinamos a capacidade da ATL em reduzir a alodinia mecânica, a ansiedade e os comportamentos semelhantes à depressão em animais diabéticos. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de ATL (em doses de 0,3, 1, 3, 10 ou 30ng/rato), com base em pesquisas anteriores (Fattori et al., 2019; Leão et al., 2022). Inicialmente, os animais foram avaliados quanto ao seu limiar mecânico basal e, após um jejum de 12 horas, foram submetidos a uma injeção de STZ 60mg/kg ou veículo de citrato para induzir o diabetes. Quatorze dias depois, uma avaliação subsequente do limiar mecânico confirmou o desenvolvimento da alodinia mecânica. Os animais foram então separados aleatoriamente em grupos tratados com ATL nas seguintes doses: 0,3, 1, 3, 10 e 30ng, ou veículo. O limiar mecânico foi avaliado em vários momentos, começando 60 minutos após o tratamento e durando até 240 minutos após a injeção do tratamento, no primeiro dia de tratamento (dia 14) (Figura 1, painel A). Além disso, o tratamento foi sempre administrado após os testes comportamentais. O protocolo de tratamento seguiu esse desenho (Figura 2, painel A): nos primeiros três dias (14^o, 15^o e 16^o), e depois a cada dois dias até o 27^o dia, com avaliações diárias do limiar mecânico basal através do teste de von Frey. No 28^o dia, foi realizada uma avaliação do comportamento locomotor, seguida de um teste de labirinto em cruz elevado no 29^o dia (Figura 3, painel A), e um pré-teste 24 horas antes do teste modificado de nado forçado no 29^o e 30^o dias, respectivamente (Figura 4, Painel A). No 31^o dia, os animais foram sacrificados, e os tecidos foram coletados para análises subsequentes.

Para o segundo conjunto de experimentos, os mesmos procedimentos do primeiro conjunto foram seguidos até a quarta semana, exceto pelos testes comportamentais para locomoção, comportamentos semelhantes à ansiedade e comportamentos semelhantes à depressão. Além disso, avaliações eletrônicas de von Frey foram realizadas antes da indução do diabetes, na segunda semana, na terceira semana e na quarta semana, para avaliar a evolução temporal com agonistas de canabinoides. Injeções intratecais de agonistas foram administradas uma hora após a injeção intraperitoneal de ATL e passaram por outro período para avaliar a alodinia mecânica. Após a evolução temporal, todos os animais tiveram seu peso e glicemia avaliados pela última vez e foram sacrificados com uma overdose de halotano

(Figuras 5 e 6, painéis A). Para o ACEA e o JWH-133 (doses de 10µg/rato), os animais passaram por um período de lavagem de 4 dias e seguiram os mesmos procedimentos descritos para as doses de 30µg dos agonistas de canabinoides no dia 28º (Figura 7, painel A).

Todos os experimentos foram conduzidos por um experimentador que não tinha conhecimento do tratamento, mas estava ciente da condição diabética, uma vez que animais diabéticos apresentam alterações típicas relacionadas ao diabetes, como poliúria, polidipsia e redução do ganho de peso. Nossos protocolos experimentais não incluem controles positivos devido a considerações éticas focadas na minimização do uso de animais. Além disso, o uso de agonistas de canabinoides em nossos estudos não envolve novos medicamentos, pois já demonstramos seus efeitos em outras pesquisas (Gonçalves et al., 2022). Além disso, em relação à ATL, utilizamos várias doses, aumentando a robustez de nossos resultados. Essa abordagem garante um equilíbrio entre rigor científico e a responsabilidade ética de reduzir o uso de animais.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado para assegurar as condições necessárias para testes paramétricos. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM) para grupos de 10 animais (n=10). ANOVA de uma via e duas vias seguida pelo teste post hoc de Bonferroni foi usado para determinar as diferenças entre os grupos experimentais e o teste t de *Student* quando uma comparação foi feita entre dois grupos experimentais controle (diabéticos vs. normoglicêmicos). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados usando *GraphPad Prism* versão 9.0 para Windows 11 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

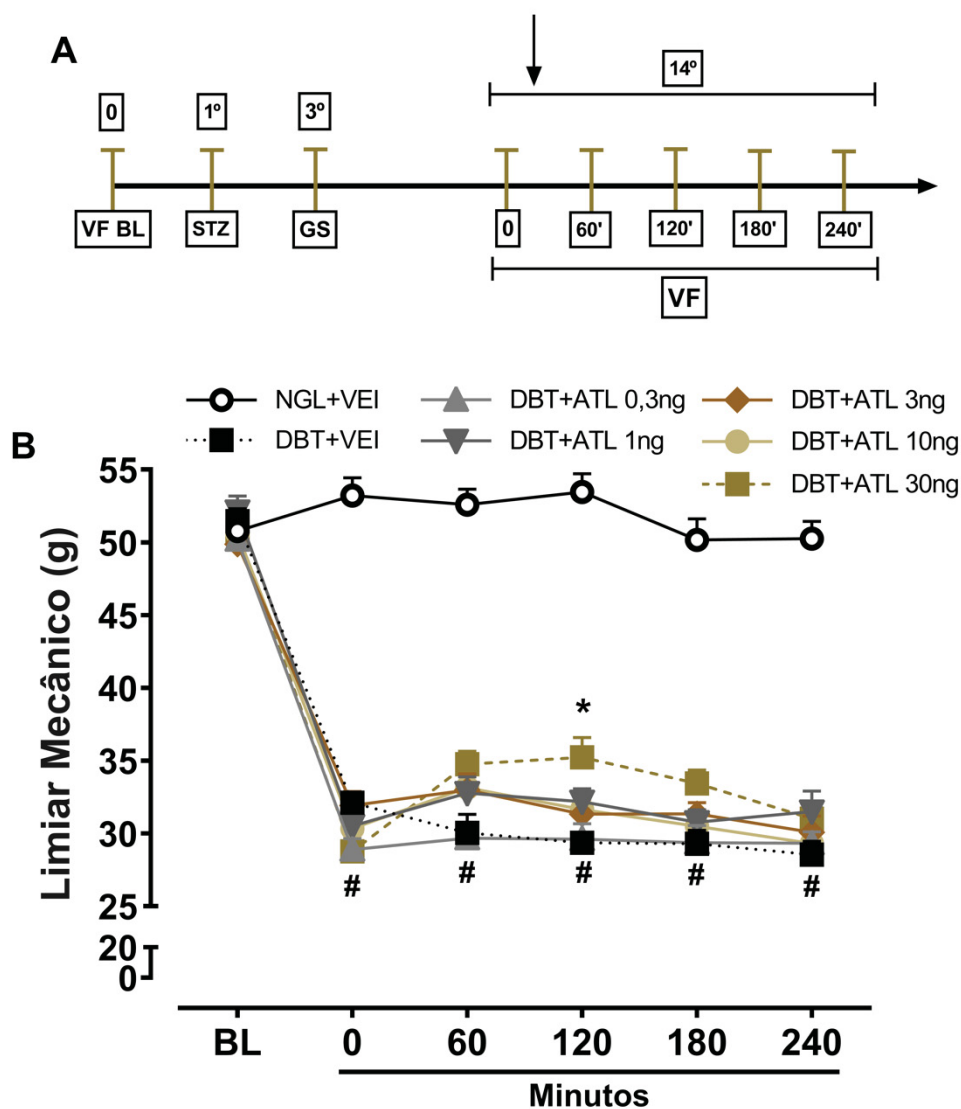
3 RESULTADOS

3.1 ATL ATENUA A ALODINIA MECÂNICA NO TESTE ELETRÔNICO DE VON FREY

Segundo o desenho experimental mostrado na Figura 1 (Painel A) avaliamos o efeito agudo da ATL sobre o limiar mecânico de ratos diabéticos. Para isso, no 14º dia após a indução do diabetes, os animais foram submetidos a uma avaliação do limiar mecânico, seguida do tratamento com ATL ou VEI. Os animais foram submetidos novamente a avaliações do limiar mecânico após o tratamento em diferentes momentos ao longo de um período de 240 minutos.

Como mostrado na Figura 1 (painel B), quando comparado ao grupo controle normoglicêmico (NGL+VEI), todos os grupos diabéticos (grupos DBT) desenvolvem alodinia mecânica 14 dias após a indução do diabetes. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença entre grupos [F (6, 63) = 176,7; $p < 0,0001$], no tempo [F (5, 315) = 332,2; $p < 0,0001$], e também uma interação entre esses fatores [F (30, 315) = 12,02; $p < 0,0001$]. A análise post-hoc mostrou que apenas o tratamento agudo com a maior dose testada de ATL (DBT+ATL 30ng) aumentou significativamente o limiar mecânico, mas somente na segunda hora do decurso temporal ($p < 0,05$) em comparação ao grupo DBT tratado com veículo.

Figura 1 – EFEITO AGUDO DA ATL SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS



NOTA: No painel A se indica a linha temporal desde o VF basal até o fim do decurso temporal, a Flecha indica o tratamento. Efeito do tratamento com ATL (0,3, 1, 3, 10 e 30 ng/rato; i.p.) ou VEI (200 μ L NaCl/rato; i.p.) no decurso temporal para o limiar mecânico em grupos de ratos diabéticos (DBT) ou normoglicêmicos (NGL). Os animais foram avaliados no teste eletrônico de von Frey para o efeito anti-alodínico de ATL (painel B). BL – Baseline; VF – Teste eletrônico de Von Frey; GS – Glicose Sérica; STZ – estreptozotocina; NGL – normoglicêmico; DBT – diabético Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10 animais por grupo). #p<0,05 quando comparado ao grupo controle NGL, *p<0,05 quando comparado ao grupo DBT+VEI. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste posthoc de Bonferroni.

FONTE: O autor (2023).

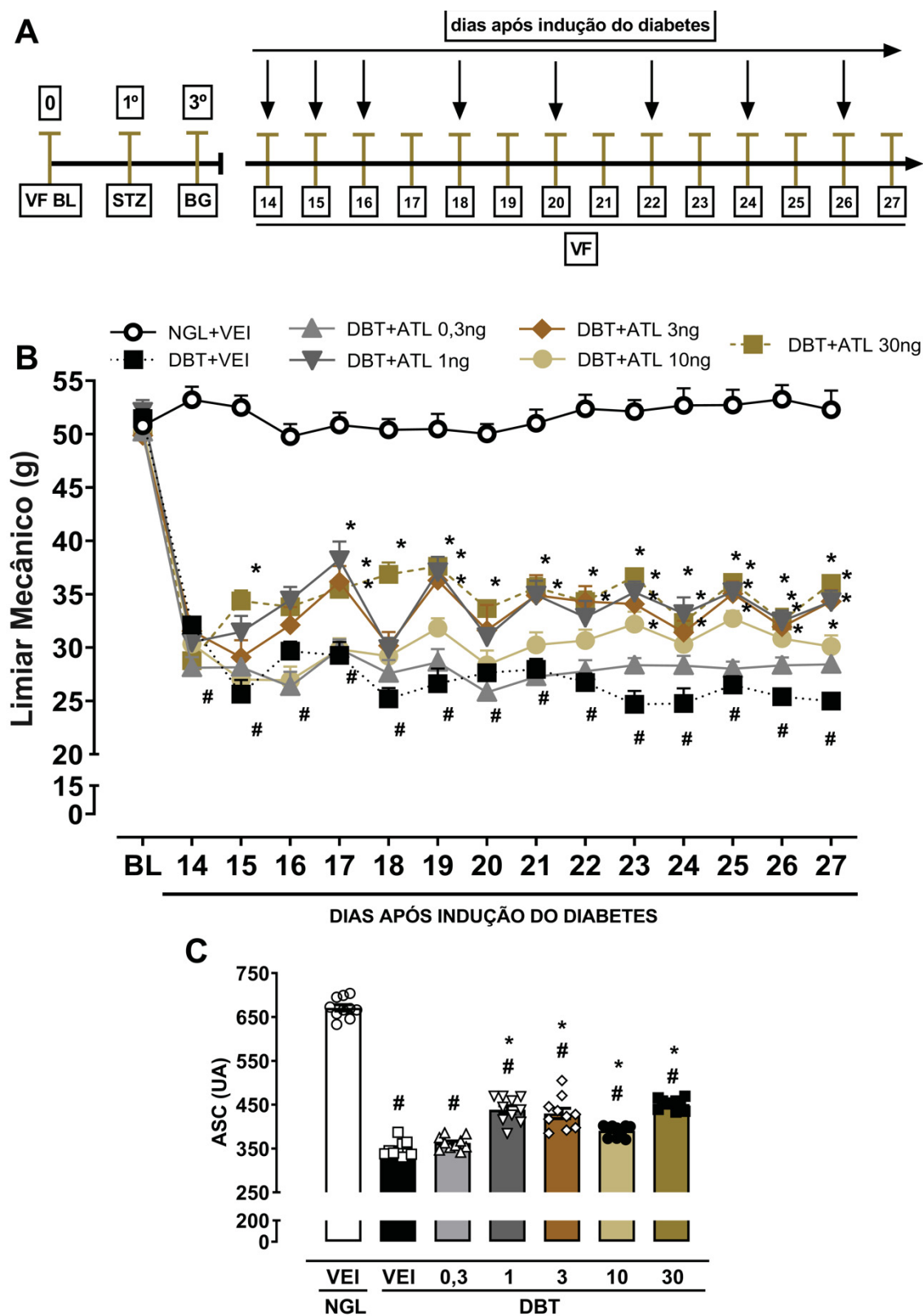
3.2 ATL DEMONSTROU UM EFEITO ANTINOCICEPTIVO CUMULATIVO NO TESTE ELETRÔNICO DE VON FREY

Como observado na Figura 2 (painel A), seguimos com a linha experimental para avaliar o potencial efeito cumulativo da ATL, os grupos diabéticos foram tratados com ATL por três dias consecutivos e, posteriormente, em dias alternados. O limiar mecânico foi avaliado através do teste eletrônico de von Frey, todos os dias do 14º ao 27º dia após a indução do diabetes, sempre antes do tratamento com VEI ou ATL.

Na Figura 2 (painel B) é possível observar que os ratos diabéticos apresentaram uma redução significativa no limiar mecânico em comparação ao grupo normoglicêmico. Essa redução começou no 14º dia e persistiu até o 27º dia após a indução do diabetes. A análise de ANOVA de duas vias confirmou diferenças entre os grupos [F (6, 63) = 213,9; $p < 0,0001$], tempo [F (11,17, 703,7) = 122,7; $p < 0,0001$] e interação [F (84, 882) = 6,672; $p < 0,0001$]. O post hoc de Bonferroni indicou que; o grupo diabético tratado com 30ng de ATL teve uma diferença significativa em relação ao grupo DBT+VEI ($p < 0,05$), visível a partir do 17º dia até o 27º dia após a indução do diabetes. Efeitos cumulativos semelhantes foram observados com outras doses de ATL (1, 3 e 10ng), mas apenas do 25º dia até o 27º dia ($p < 0,05$).

O Painel C apresenta a análise da área sob a curva. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa entre os grupos [F (6, 1386) = 989,9; $p < 0,0001$], tempo [F (21, 1386) = 6,706; $p < 0,0001$] e interação [F (126, 1386) = 2,078; $p < 0,0001$]. Análises post hoc de Bonferroni demonstraram uma diferença significativa entre os grupos DBT e o grupo NGL tratado com o veículo ($p < 0,0001$). Além disso, observou-se uma diferença significativa ao comparar o grupo DBT tratado com o veículo com o grupo DBT tratado com ATL nas doses de 1, 3, 10 e 30ng ($p < 0,01$).

Figura 2 - EFEITO CUMULATIVO DA ATL SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS



em que foram administrados os tratamentos. Efeito do tratamento com ATL (0,3, 1, 3, 10 e 30 ng/rato; i.p.) ou VEI (200 μ L NaCl/rato; i.p.) para o limiar mecânico em grupos de ratos diabéticos (DBT) ou normoglicêmicos (NGL). Os animais foram avaliados no teste eletrônico de von Frey para o efeito anti-alodínico de ATL (painel B). A área sob a curva (ASC) (painel C) é representada com unidades arbitrárias. BL – Baseline; VF – Teste eletrônico de Von Frey; GS – Glicose Sérica; STZ – estreptozotocina; NGL – normoglicêmico; DBT – diabético. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10 animais por grupo). #p<0,05 quando comparado ao grupo controle NGL, *p<0,05 quando comparado ao grupo DBT+VEI. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste posthoc de Bonferroni.

FONTE: O autor (2023).

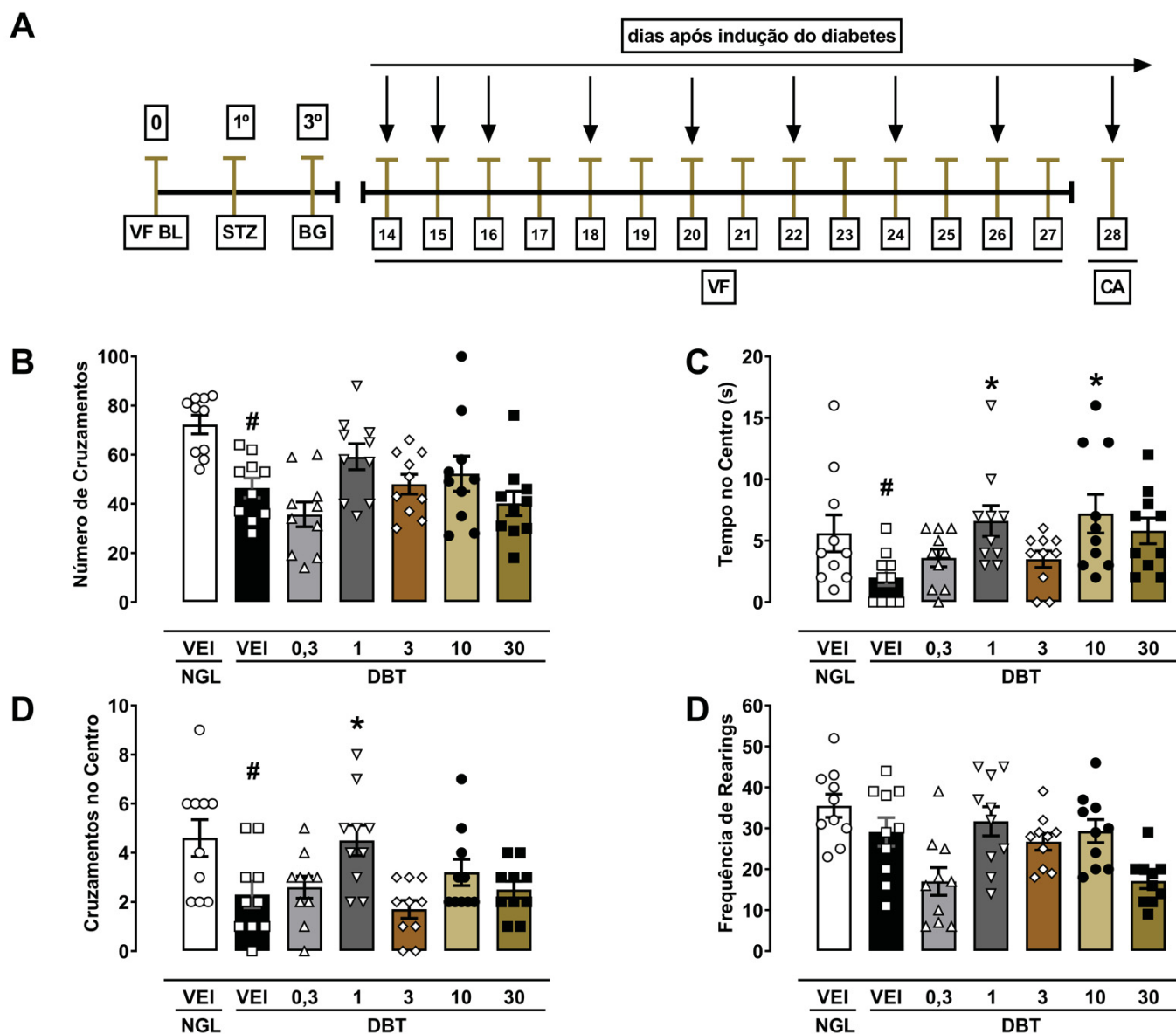
3.3 O TRATAMENTO COM ATL NÃO ALTERA O COMPORTAMENTO LOCOMOTOR E ATENUA MEDIDAS ETOLÓGICAS RELACIONADAS AO COMPORTAMENTO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DE CAMPO ABERTO

Para a avaliação da atividade locomotora e de outras medidas etológicas relacionadas a comportamentos de ansiedade, submetemos os animais ao teste de campo aberto por um período de 5 minutos. Os resultados da análise estatística pelo teste t de student evidenciaram diferenças significativas entre os ratos diabéticos e o grupo controle normoglicêmico. Os ratos diabéticos exibiram uma notável redução tanto no número de cruzamentos [$t=4,687$, $df=18$, $p<0,005$], como no tempo despendido no quadrante central [$t=2,203$, $df=18$, $p<0,05$], além de uma diminuição na frequência de cruzamentos realizados no quadrante central [$t=2,495$, $df=18$, $p<0,05$]. No entanto, a frequência de *rearings* não se mostrou afetada pela condição diabética.

Ao direcionarmos nossa análise para a comparação entre os grupos diabéticos, a aplicação de uma análise de variância unidirecional (ANOVA) revelou diferenças significativas nos seguintes parâmetros comportamentais: número de cruzamentos na arena [$F(5, 54) = 2,616$; $p = 0,0344$], tempo gasto no centro [$F(5, 54) = 3,835$; $p = 0,0048$], quantidade de cruzamentos para o centro [$F(5, 54) = 3,940$; $p = 0,0041$] e frequência de *rearings* [$F(5, 54) = 4,854$; $p = 0,0010$].

De maneira intrigante, as análises de comparações múltiplas indicaram que o tratamento com ATL não exerceu impacto sobre o comportamento locomotor e a frequência de *rearings* dos ratos, quando comparado ao grupo submetido ao tratamento com veículo (DBT+VEI). Contudo, ao ser comparado com o grupo DBT+VEI, o tratamento com ATL manifestou um aumento no tempo despendido no quadrante central (nas doses de 1ng e 10ng) e no número de cruzamentos realizados no centro (na dose de 1ng). Tais resultados sugerem que o tratamento com ATL não exibe efeito sedativo, mas evidencia certa habilidade em reduzir comportamentos associados ao tipo ansioso em ratos diabéticos. É relevante notar que o diabetes induzido pela aplicação de STZ comprometeu a atividade locomotora geral e aumentou a manifestação de comportamentos etológicos relacionados a aspectos ansiosos.

Figura 3 - EFEITO DA ATL SOBRE LOCOMOÇÃO E OUTROS PARAMETROS NO TESTE DE CAMPO ABERTO



NOTA: No painel A se indica a linha temporal desde o VF basal até o dia 28 onde foi realizado o teste de campo aberto, a flecha indica os dias em que foram administrados os tratamentos. Efeito do tratamento com ATL (0,3, 1, 3, 10 e 30 ng/rato; i.p.) ou VEI (200µL NaCl/rato; i.p.) para os comportamentos locomotores e etológicos para o tipo-ansioso em grupos de ratos diabéticos (DBT) ou normoglicêmicos (NGL). Os animais foram avaliados no teste de campo aberto para os comportamentos de cruzamentos (painel B), tempo gasto no centro (painel C), cruzamentos para o centro (painel D), e frequência de Rearings (painel D). BL – Baseline; VF – Teste eletrônico de Von Frey; GS – Glicose Sérica; STZ – estreptozotocina; NGL – normoglicêmico; DBT – diabético. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10 animais por grupo). #p<0,05 quando comparado ao grupo controle NGL, *p<0,05 quando comparado ao grupo DBT+VEI. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste posthoc de Bonferroni.

FONTE: O autor (2023).

3.4 ATL DIMINUI COMPORTAMENTO DO TIPO- ANSIOSO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

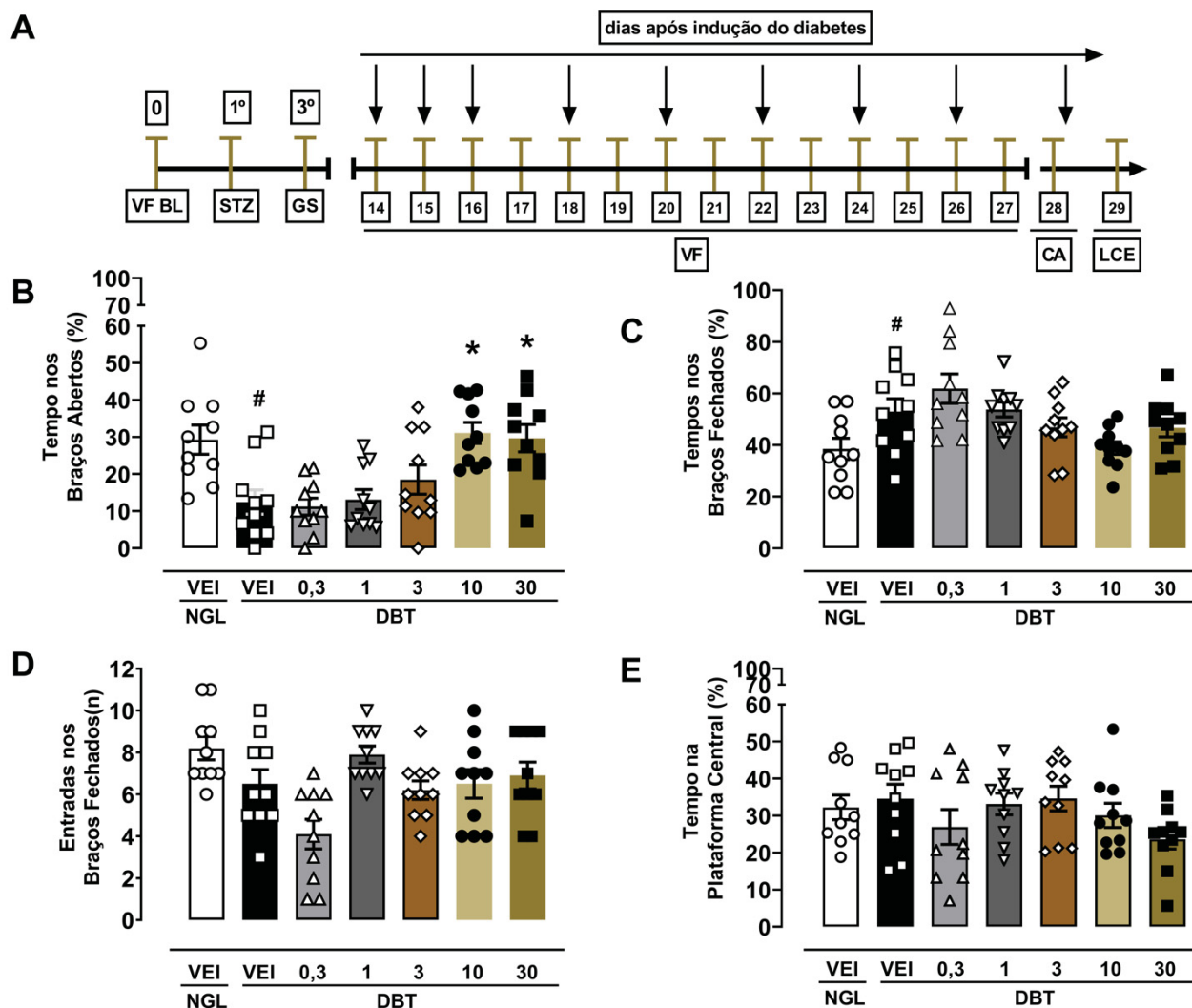
A Figura 4, no painel A, demonstra a continuidade da linha experimental, em que após a realização dos testes comportamentais de nocicepção e locomoção, foi conduzido o teste do labirinto em cruz elevado. Os resultados observados nessa figura, nos painéis B, C, D e E indicam comportamentos avaliados associados ao tipo-ansioso

O teste t de student revelou diferenças significativas entre os grupos NGL+VEI e DBT+VEI. Em comparação ao grupo normoglicêmico, os ratos diabéticos apresentaram; uma diminuição na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [$t=3,277$, $df=18$; $p=0,0042$], e um aumento na porcentagem de tempo gasto dos braços fechados [$t=2,234$, $df=18$; $p=0,0384$], notavelmente o teste t não demonstrou diferenças no número de entradas nos braços fechados e nem na porcentagem de tempo gasto na plataforma central do aparato.

Adicionalmente, o teste de ANOVA de uma via revelou uma diferença significativa entre os grupos diabéticos, quando a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos foi avaliada [$F(5, 54) = 7,873$; $p<0,05$]. A análise de post hoc demonstrou que o tratamento com ATL (nas doses de 10 e 30 ng) foi capaz de aumentar a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, quando comparado ao grupo DBT+VEI ($p<0,05$). No painel D, é possível observar que não houve diferenças reportadas entre nenhum grupo, quando o número de entradas nos braços fechados foi avaliado, e no painel E não existe diferenças na porcentagem de tempo gasto na plataforma central.

Esses resultados evidenciam uma associação entre a condição diabética e o desenvolvimento de comportamentos do tipo-ansioso nos ratos, e que a administração de ATL em ratos diabéticos exerce efeitos do tipo-ansiolítico, sem comprometer a função locomotora.

Figura 4 - EFEITO DA ATL SOBRE COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



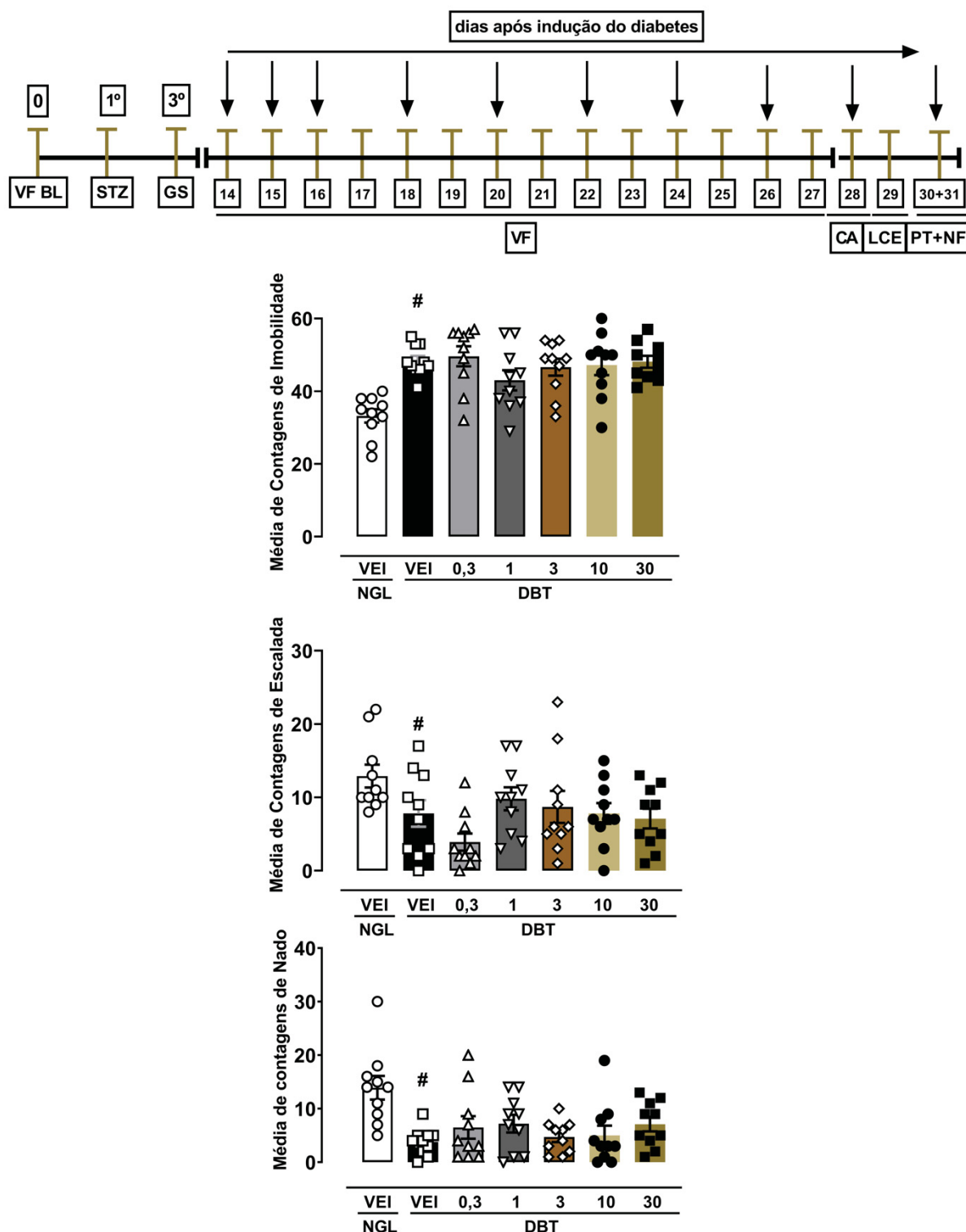
NOTA: No painel A se indica linha temporal até o 29 dia. Flechas indicam dias de tratamento. Efeito do tratamento com ATL (0,3, 1, 3, 10 e 30ng/rato; i.p) ou VEI (200 μ L NaCl/rato; i.p.) no comportamento do tipo ansioso em grupos de ratos diabéticos ou NGL. Os animais foram avaliados no teste do labirinto em cruz elevado quanto à porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e fechados, plataforma central e entradas nos braços fechados (painéis B, C, D e E). BL – Baseline; VF – Teste eletrônico de Von Frey; GS – Glicose Sérica; STZ – estreptozotocina; NGL – normoglicêmico; DBT – diabético; CA – Teste de campo aberto; LCE – Labirinto em cruz elevado. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10 animais por grupo). #p<0,05 quando comparado ao grupo controle NGL. Teste t bicaudal não pareado. *p<0,05 quando comparado ao grupo DBT+VEI. ANOVA de uma via seguida do teste posthoc de Bonferroni.

FONTE: O autor (2023)

3.5 ATL NÃO FOI CAPAZ DE REDUZIR O COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO NO TESTE DE NADO FORÇADO MODIFICADO

Como mostrado na Figura 4 (painéis A, B e C), o teste t de student mostrou uma diferença entre NGL tratado com solução salina e o grupo controle DBT quando imobilidade [$t=6.738$, $df=18$; $p<0,05$], natação [$t=4.292$, $df=18$; $p<0,05$] e escalada [$t=2,125$, $df=18$; $p<0,05$] foram avaliados. ANOVA de uma via não mostra nenhuma diferença nas contagens médias de comportamentos de imobilidade, escalada e natação quando DBT tratado com o veículo foi comparado com DBT tratado com ATL em todas as doses, sugerindo uma ausência de efeito antidepressivo.

Figura 5 - EFEITO DA ATL SOBRE COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO NO TESTE MODIFICADO DE NADO FORÇADO



NOTA: No painel A se indica linha temporal até o 29 dia. Flechas indicam dias de tratamento. Efeito do tratamento com ATL (0,3, 1, 3, 10 e 30ng/rato; i.p) ou VEI (200 μ L NaCl/rato; i.p.) no comportamento do tipo-depressivo em grupos de ratos diabéticos ou NGL. Os animais foram avaliados no teste modificado de nado forçado quanto à contagem média de comportamentos de imobilidade, escalada e nado (painéis B, C e D, respectivamente). BL – Baseline; VF – Teste

eletrônico de Von Frey; GS – Glicose Sérica; STZ – estreptozotocina; NGL – normoglicêmico; DBT – diabético; CA – Teste de campo aberto; LCE – Labirinto em cruz elevado; PT - Pré teste nado forçado modificado; NF – Nado Forçado modificado. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10 animais por grupo). #p<0,05 quando comparado ao grupo controle NGL. Teste t bicaudal não pareado. *p<0,05 quando comparado ao grupo DBT+VEI. ANOVA de uma via seguida do teste posthoc de Bonferroni.

FONTE: O autor (2023).

3.6 O TRATAMENTO COM ATL NÃO FOI CAPAZ DE REVERTER A HIPERGLICEMIA E BAIXO GANHO DE PESO EM ANIMAIS DIABÉTICOS POR STZ

Conforme observado na Tabela 1, o teste t de Student mostrou diferença quando NGL+VEI é comparado a ratos DBT+VEI quando glicemia [$t=24,67$, $df=21$; $p<0,001$] e ganho de peso [$t=10,63$, $gl=21$; $p<0,001$] foram avaliados. No entanto, o tratamento com ATL não foi capaz de reverter significativamente estes parâmetros em animais com diabetes induzido por STZ.

Tabela 1 - EFEITO DA ATL SOBRE PESO E GLICEMIA DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR STZ

Condição/Tratamento	Glicemia (mg/dL)	Ganho de Peso (g)
NGL+VEI	127±5.32	104.3±7.30
DBT+VEI	505±16.12#	-0.5±5.97#
DBT+ATL 0.3ng	570±19.50	-14±10.66
DBT+ATL 1ng	500±17.86	0.18±5.91
DBT+ATL 3ng	516±23.51	-0.63±7.50
DBT+ATL 10ng	465±24.59	10.30±5.81
DBT+ATL 30ng	581±10.89	8.10±14.88

NOTA: Efeito do tratamento com ATL (0,3, 1, 3, 10 e 30 ng/rato; i.p) ou VEI (200µL NaCl/rato; i.p.) na glicemia, ganho de peso. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10 animais por grupo). # $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle NGL. NGL – normoglicêmico; DBT – diabético; VEI- Veículo. Teste t bicaudal não pareado.

FONTE: O autor (2023).

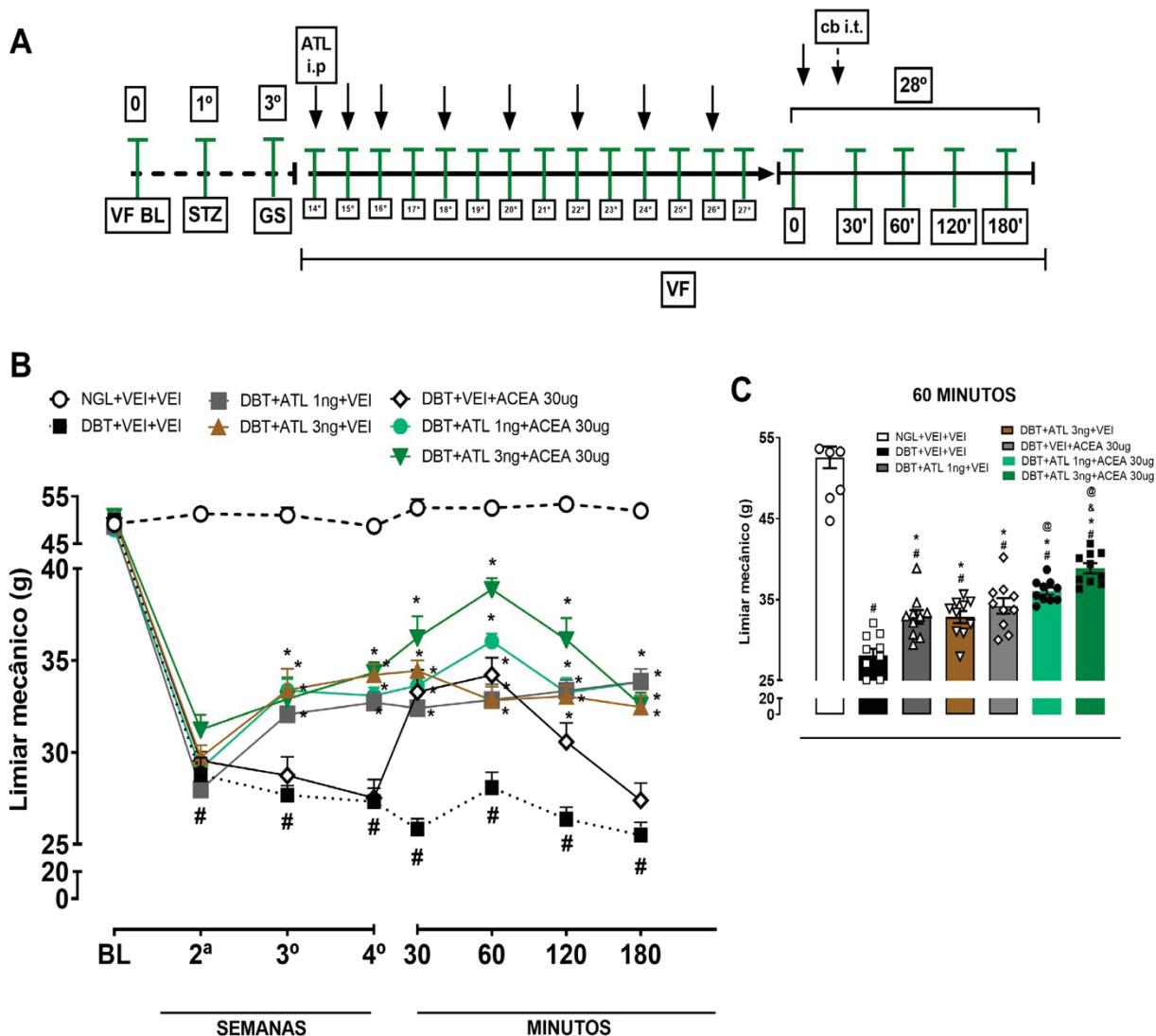
3.7 O TRATAMENTO COM ATL AUMENTA O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO AGONISTA CANABINOIDE CB1 EM RATOS DIABÉTICOS POR STZ

Conforme ilustrado na Figura 6 (Painel B), de acordo com observações anteriores, os ratos DBT apresentaram aumento na sensibilidade mecânica na pata traseira em comparação ao grupo NGL tratado com o veículo ($p < 0,0001$) duas semanas após a injeção de STZ. Nas semanas seguintes, os ratos DBT tratados com ATL nas doses de 1ng e 3ng mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo DBT tratado com solução salina ($p < 0,005$). Uma análise de ANOVA de dois fatores demonstrou diferença significativa entre os grupos [$F(6, 63) = 380,2$; $p < 0,0001$], ao longo do tempo [$F(5, 202, 327,7) = 235,0$; $p < 0,0001$], e uma interação entre esses dois fatores [$F(42, 441) = 12,12$; $p < 0,0001$].

Na quarta semana, uma análise do curso do tempo foi realizada após uma injeção intratecal de ACEA durante trinta minutos. O pré-tratamento de ratos diabéticos com solução salina em combinação com ACEA 30 μ g resultou na redução da sensibilidade mecânica, atingindo o pico uma hora após o tratamento e durando duas horas após a injeção intratecal. As análises de bonferroni, quando comparadas ao grupo DBT+VEH+VEH, demonstraram uma diferença significativa ($p < 0,005$). Além disso, o tratamento subcrônico com ATL 1 e 3ng aumentou significativamente o efeito antinociceptivo de ACEA 30 μ g, com o efeito máximo observado uma hora após o tratamento intratecal.

A Figura 6 (Painel C) ilustra as diferenças observadas uma hora após o tratamento com ACEA. O teste post hoc revelou uma diferença significativa ao comparar DBT+ATL 3ng+ACEA 30 μ g com DBT+VEH+ACEA 30 μ g ($p < 0,005$) e o grupo controle ($p < 0,005$). Além disso, essa diferença também foi observada ao comparar grupos diabéticos tratados apenas com ATL 1ng ou 3ng mais solução salina intratecal ($p < 0,005$).

Figura 6 - EFEITO DA COMBINAÇÃO DE ATL E ACEA 30 μ g SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS



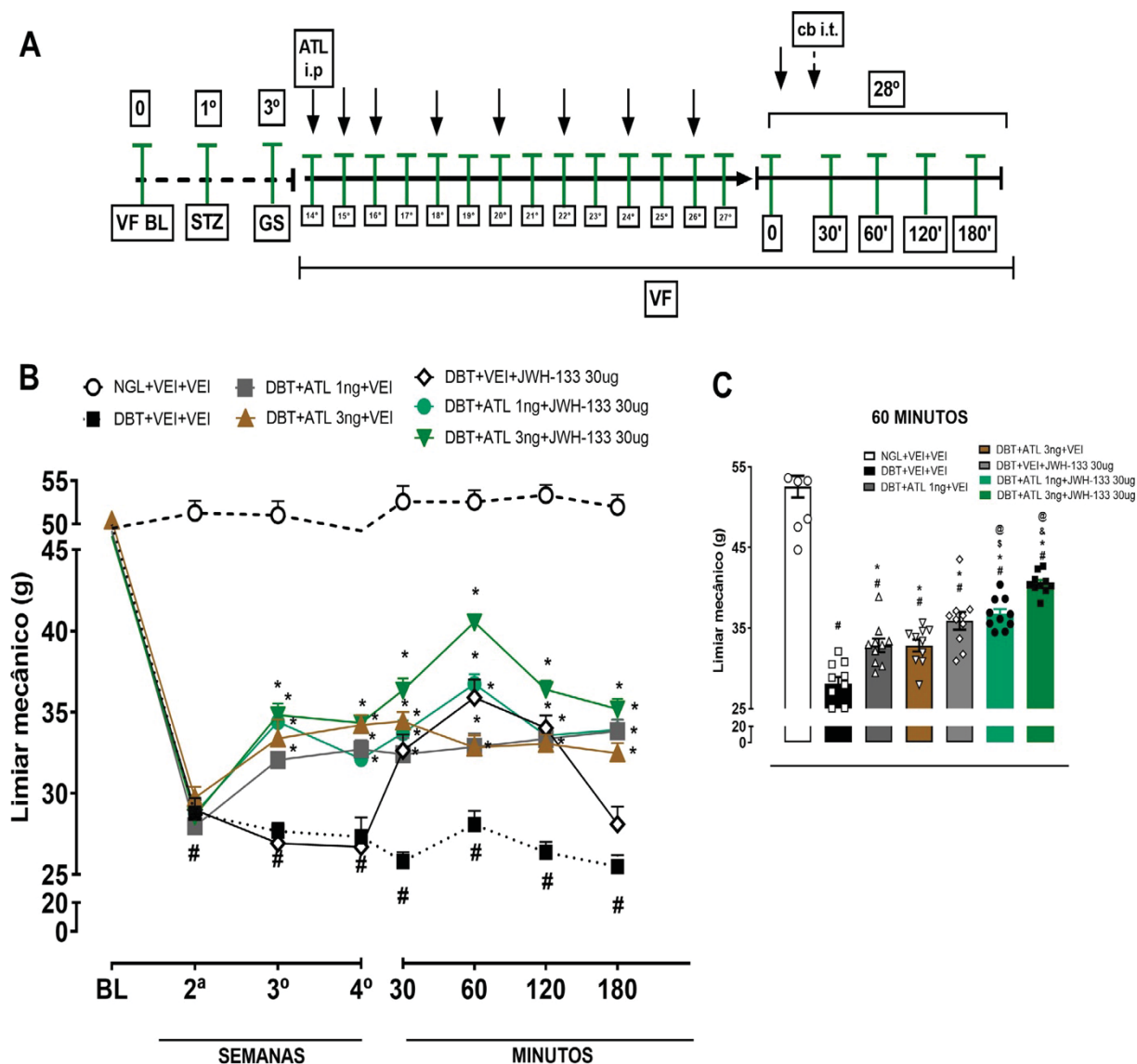
NOTA: Painel A denota linha temporal desde o VF basal até o final do decurso temporal realizado no 28^o dia. Flechas indicam tratamento de ATL, e Flecha pontilhada administração intratecal de ACEA. No painel B indica efeito do tratamento com ATL (1,3ng/rato; i.p) e ACEA (30 μ g/10 μ L i.t.) ou VEI (200 μ L NaCl/rato; i.p ou 10 μ L/rato i.t.) no limiar mecânico em grupos de ratos diabéticos STZ. Os animais foram avaliados no teste eletrônico de von Frey para efeitos anti-alodínicos ao longo do tempo após a administração de ACEA 30 μ g. O painel C representa um gráfico de coluna do minuto 60 no curso do tempo (painel C). BL – Baseline; VF – Teste eletrônico de Von Frey; GS – Glicose Sérica; STZ – estreptozotocina; NGL – normoglicêmico; DBT – diabético Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10 animais por grupo). #p<0,05 quando comparado ao grupo de controle NGL, *p<0,05 quando comparado ao grupo DBT+VEI, &p<0,05 quando comparado a DBT+VEI+ACEA 30 μ g, @p<0,05 quando comparado a DBT+ATL 3ng. ANOVA two-way com medidas repetidas seguida de teste posthoc de Bonferroni. FONTE: O autor (2023).

3.8 O TRATAMENTO COM ATL AUMENTA O EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO AGONISTA CANABINOIDE CB2 EM RATOS DIABÉTICOS POR STZ

Conforme mostrado na Figura 7 (Painel B), como observado anteriormente, os ratos DBT apresentaram aumento na sensibilidade mecânica na pata traseira em comparação ao grupo NGL tratado com o veículo ($p < 0,0001$) duas semanas após a injeção de STZ, e nas semanas seguintes, os ratos DBT tratados com ATL em 1ng e 3ng mostraram diferença estatística quando comparados ao grupo DBT tratado com solução salina ($p < 0,005$). Uma análise de ANOVA de dois fatores revelou diferença significativa entre os grupos [F (6, 63) = 351,3; $p < 0,0001$], tempo [F (5,155, 324,8) = 229,1; $p < 0,0001$] e interação entre esses dois fatores [F (42, 441) = 13,64; $p < 0,0001$].

Na quarta semana, foi avaliado o curso do tempo após uma injeção intratecal de JWH-133 durante trinta minutos. O pré-tratamento de ratos diabéticos com solução salina combinada com JWH-133 30 μ g resultou na redução da sensibilidade mecânica, atingindo o pico uma hora após o tratamento e durando duas horas após a injeção intratecal. Análises de bonferroni, comparadas ao grupo DBT+VEH+VEH, demonstraram uma diferença significativa ($p < 0,005$). Além disso, o tratamento subcrônico com ATL 3ng aumentou significativamente o efeito antinociceptivo de JWH-133 30 μ g, com o pico observado uma hora após o tratamento intratecal. Na Figura 7 (Painel C), são ilustradas as diferenças observadas uma hora após o tratamento com JWH-133. O teste post hoc revelou uma diferença significativa ao comparar DBT+ATL 3ng+JWH-133 30 μ g com DBT+VEH+JWH-133 30 μ g ($p < 0,005$) e o grupo controle ($p < 0,005$). Além disso, essa diferença também foi observada ao comparar grupos diabéticos tratados apenas com ATL 1ng ou 3ng mais solução salina intratecal ($p < 0,05$).

Figura 7 - EFEITO DA COMBINAÇÃO DE ATL E JWH-133 30 μ g SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS



NOTA: Painei A denota linha temporal desde o VF basal até o final do decurso temporal realizado no 28^o dia. Flechas indicam tratamento de ATL, e Flecha pontilhada administração intratecal de JWH-133. No painei B indica efeito do tratamento com ATL (1,3ng/rato; i.p) e JWH-133 (30 μ g/10 μ L i.t.) ou VEI (200 μ L NaCl/rato; i.p ou 10 μ L/rato i.t.) no limiar mecânico em grupos de ratos diabéticos STZ. Os animais foram avaliados no teste eletrônico de von frey para efeitos anti-alodínicos ao longo do tempo após a administração de JWH-133 30 μ g. O painei C representa um gráfico de coluna do minuto 60 no decurso temporal (painei C). BL – Baseline; VF – Teste eletrônico de Von Frey; GS – Glicose Sérica; STZ – estreptozotocina; NGL – normoglicêmico; DBT – diabético Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10 animais por grupo). #p<0,05 quando comparado ao grupo de controle NGL, *p<0,05 quando comparado ao grupo DBT+VEI, &p<0,05 quando comparado a DBT+VEI+JWH-133 30 μ g, @p<0,05 quando comparado a DBT+ATL 3ng. ANOVA two-way com medidas repetidas seguida de teste posthoc de Bonferroni.

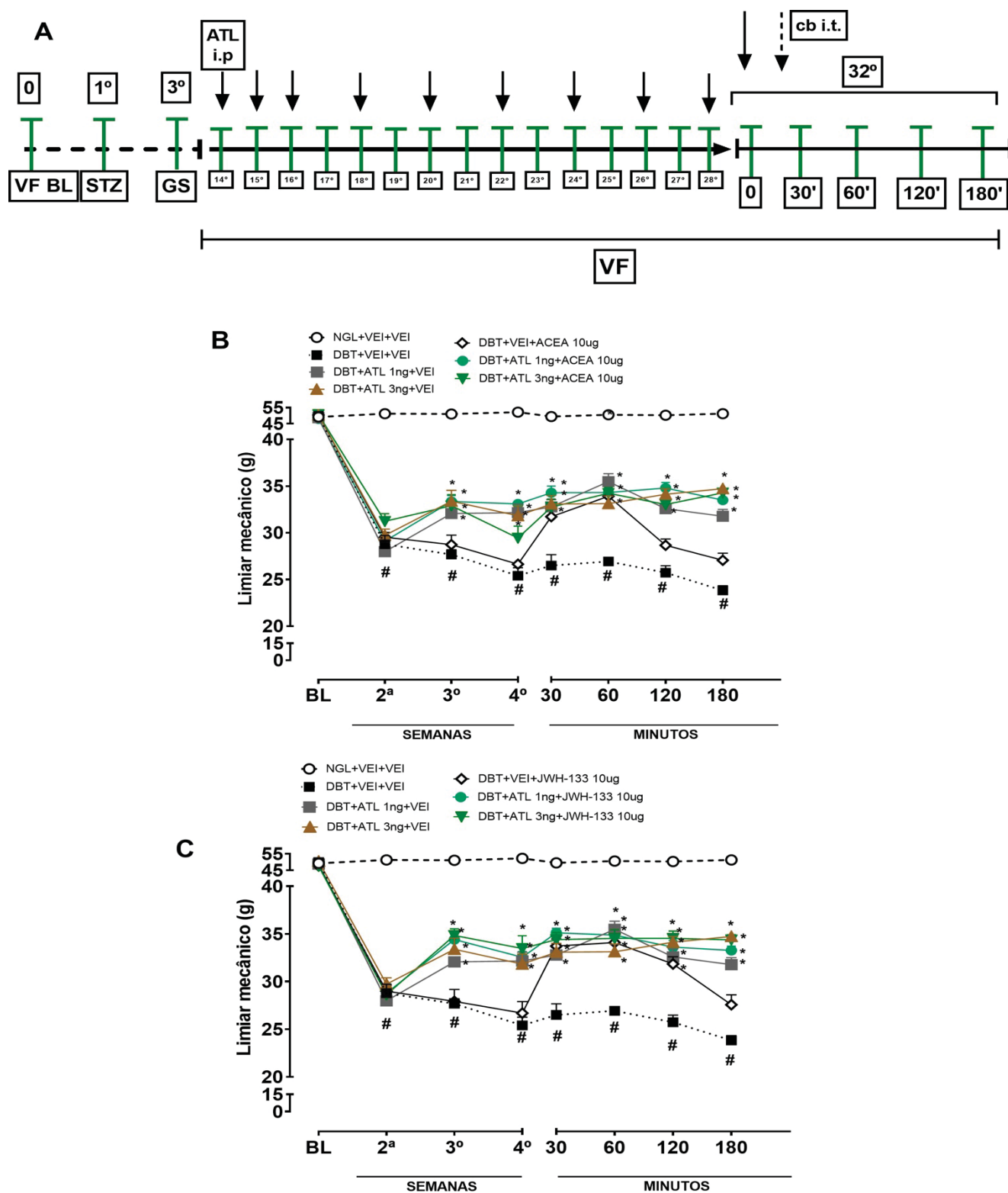
FONTE: O autor (2023).

3.9 A COMBINAÇÃO DOS CANABINOIDES NA MENOR DOSE NÃO APRESENTA POTENCIALIZAÇÃO NA PRESENÇA DO PRÉ-TRATAMENTO COM ATL

Na Figura 8 (Painel B), a administração de ACEA 10 μ g em combinação com pré-tratamento de solução salina produziu um efeito antinociceptivo notável, atingindo seu pico uma hora após o tratamento intratecal. Análises post-hoc demonstraram uma diferença significativa quando comparada ao grupo DBT+VEH+VEH ($p < 0.005$). Interessantemente, o tratamento subcrônico com ATL (1 e 3ng) não exerceu nenhuma influência no efeito antinociceptivo de ACEA 10 μ g ao longo de toda a duração do experimento.

Na Figura 8 (Painel C), a combinação de JWH-133 10 μ g com pré-tratamento de solução salina resultou em um efeito antinociceptivo, atingindo seu pico máximo uma hora após o tratamento intratecal. Análises post-hoc revelaram uma diferença significativa em comparação ao grupo DBT+VEH+VEH ($p < 0.05$). No entanto, o tratamento subcrônico com ATL (1 e 3ng) não teve impacto algum no efeito antinociceptivo ao longo de todo o período de tempo.

Figura 8 - EFEITO DA COMBINAÇÃO DE ATL ACEA E JWH-133 10 μ g SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS



NOTA: Painel A denota linha temporal desde o VF basal até o final do decurso temporal realizado no 32^o dia. Flechas indicam tratamento de ATL, e Flecha pontilhada administração intratecal de ACEA ou

JWH-133. No painel B e C indica efeito do tratamento com ATL (1,3ng/rato; i.p) e ACEA ou JWH-133 (10µg/10µL i.t.) ou VEI (200µL NaCl/rato; i.p ou 10uL/rato i.t.) no limiar mecânico em grupos de ratos diabéticos STZ. Os animais foram avaliados no teste eletrônico de von Frey para efeitos anti-alodínicos ao longo do tempo após a administração de ACEA ou JWH-133 10µg. BL – Baseline; VF – Teste eletrônico de Von Frey; GS – Glicose Sérica; STZ – estreptozotocina; NGL – normoglicêmico; DBT – diabético. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10 animais por grupo). #p<0,05 quando comparado ao grupo de controle NGL, *p<0,05 quando comparado ao grupo DBT+VEI.

FONTE: O autor (2023).

4 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram; que a administração aguda e sub-crônica com a ATL atenua a alodinia mecânica e o comportamento do tipo-ansioso em ratos com diabetes experimental induzido por STZ, sem prejudicar o comportamento locomotor. No entanto, o tratamento com ATL não foi eficaz em reduzir o comportamento do tipo-depressivo em ratos diabéticos. Além disso, nosso trabalho observou pela primeira vez na literatura o aumento do efeito antinociceptivo dos agonistas seletivos para o CB1 e CB2 (ACEA e JWH-133, respectivamente) em ratos diabéticos pré-tratados sub-cronicamente com ATL.

De maneira geral o diabetes experimental induzido por STZ é um modelo amplamente empregado para mimetizar o diabetes do tipo 1 e suas complicações associadas. Este modelo reproduz algumas das principais características da doença, incluindo o desenvolvimento de hiperglicemia, redução no ganho de peso, alodinia mecânica, hiperfagia, diminuição do comportamento locomotor, bem como comportamentos do tipo-ansioso e do tipo-depressivo, como extensivamente documentado na literatura.

Notavelmente, os ratos diabéticos exibem consistentemente uma diminuição significativa em seu limiar mecânico duas semanas após a indução do diabetes, o que persiste até a quarta semana do protocolo, em que se atinge o limiar mecânico mais baixo registrado. Os comportamentos do tipo-depressivo e tipo-ansioso se desenvolve na 2ª semana, embora sejam mais pronunciados na 4ª semana após a injeção de STZ. Essas observações consistentes são apoiadas não apenas por nossas próprias descobertas laboratoriais (Chaves et al., 2021; da Silva Dias et al., 2016; de Moraes et al., 2014; Gasparin et al., 2021; Gonçalves et al., 2022; Jesus et al., 2019), mas também por estudos corroborativos conduzidos por outros pesquisadores (Bădescu et al., 2016; Brennan et al., 2018; Castany et al., 2016).

O efeito antinociceptivo da administração aguda da ATL ocorre apenas 2 horas após a administração e somente na maior dose testada em nosso protocolo. Este perfil de efeito antinociceptivo é encontrado de maneira semelhante em um estudo em que a ATL foi administrada por via intratecal em um modelo de dor de câncer ósseo, em que o seu efeito se tornou significativo apenas na segunda hora após a administração, perdurando por 8 horas (Hu et al., 2012). Em outro estudo de Wang (2014) ATL em

doses mais altas (100ng e 200ng) também promoveu um efeito agudo em um modelo de lesão crônica por constrição do nervo ciático em ratos (Wang et al., 2014). A duração do efeito antinociceptivo observado em nosso estudo, em comparação com os estudos citados (Hu et al., 2012; Wang et al., 2014) pode ser explicado pela via de administração, em que nosso caso a duração do efeito pode ter sido menos pronunciada devido a injeção intraperitoneal, que pode estar sujeita a uma degradação enzimática mais pronunciada (Al Shoyaib et al., 2019).

No entanto, nossos resultados se alinham com outros estudos que utilizaram a ATL em modelos de dor crônica. Em um estudo recente, o uso da Lipoxina A4, um análogo da ATL, mostrou que três injeções intratecais em dias sucessivos foram capazes de atenuar a alodinia mecânica por até sete dias após a indução do modelo de hérnia de disco lombar não compressiva, inibindo o TNF- α e o IL-1 β e atenuando a ativação do NF-kB/p65, p-ERK e p-JNK (Miao et al., 2015). O efeito prolongado é visível em um estudo usando um modelo de lesão da medula espinhal, no qual duas injeções intratecais de Lipoxina A4 foram administradas após hemissecção espinhal, por meio da diminuição da ativação microglial e liberação de TNF- α (Martini et al., 2016).

É importante observar que a via de administração que usamos para a ATL difere de estudos anteriores que geralmente usavam injeção intratecal. A estabilidade da ATL em comparação com a LXA4, também pode contribuir para seus efeitos observados (Dalli & Serhan, 2019), que pode ser a razão de ter sido capaz de ver um efeito prolongado em uma via sistêmica de administração deste SPM. Um estudo com um modelo de dor neuropática induzida por câncer ósseo mostrou que LXA4, LXB4 e ATL atenuam a alodinia mecânica com a mesma dose, no entanto, ATL mostrou um efeito prolongado do que outros análogos (Hu et al., 2012).

Os canabinoides têm mostrado efeitos benéficos no manejo da dor, e a LXA4, um mediador lipídico especializado pró-resolutivo, demonstrou modulação positiva do receptor CB1 (Pamplona et al., 2010, 2012). Combinar drogas oferece vantagens potenciais de doses mais baixas, minimizando efeitos colaterais e maximizando efeitos terapêuticos, o que é benéfico no que diz respeito ao tratamento da neuropatia diabética, cujo tratamento é um desafio clínico (Schreiber et al., 2015; Sun et al., 2016).

Outros estudos corroboram nossos resultados, como um que demonstrou os efeitos antinociceptivos de agonistas canabinoides, como ACEA e JWH-133, em ratos diabéticos por meio da ativação espinal dos receptores CB1 e CB2 (Gonçalves et al., 2022). Em outro estudo, ratos diabéticos foram submetidos ao teste de formalina, e após o tratamento com ACEA, os animais tiveram o comportamento nociceptivo diminuído (Schreiber, et al 2012). Outro estudo demonstrou que agonistas canabinoides seletivos CB1 e CB2 (ACEA e JWH-133) tem a capacidade de aliviar a sensibilidade mecânica em ratos no modelo de dor neuropática induzido por quimioterápico (Vera et al., 2013).

Parece que a expressão do receptor CB2 no sistema nervoso central é importante para a sinalização da dor na dor neuropática, como demonstrado em um estudo em que a administração sistêmica e local de JWH-133 foi ineficaz em aliviar o limiar mecânico em um modelo CCI. No entanto, a injeção intratecal de JWH-133 conseguiu reverter a alodinia mecânica, o que não foi observado em camundongos *knockout* para o receptor CB2 (Yamamoto et al., 2008). Em um estudo de Ghosh e colegas, descobriu-se que os receptores CB2 são mais expressos nos gânglios da raiz dorsal (DRG) na dor neuropática induzida por trauma mecânico e que a ativação desses receptores com o agonista canabinoide JWH-133 pode melhorar o limiar mecânico em ratos operados, mas não em ratos sham. (Ghosh et al., 2022). No entanto, em um estudo sobre ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, a expressão do receptor CB2 foi encontrada de maneira mais alta na medula espinal do que no DRG (Castany et al., 2016), esses achados sugerem que o direcionamento dos receptores canabinoides expressos centralmente pode ser uma abordagem eficaz para melhorar a dor neuropática no diabetes.

De forma curiosa, o pré-tratamento com ATL não foi capaz de potencializar os efeitos do ACEA e JWH-133 nas doses de 10µg, o que pode estar associado a um efeito de uma faixa intermediária dos canabinoides, em que o efeito antinociceptivo não é tão efetivo, resultando em uma menor potencialização. É importante ressaltar que essa explicação é uma suposição teórica e requer investigações adicionais, como estudos de docagem molecular ou ensaios funcionais específicos, para confirmar e caracterizar os mecanismos precisos subjacentes à interação entre ATL e os agonistas canabinoides utilizados ou receptores canabinoides.

Embora não tenhamos investigado diretamente esses mecanismos em nosso estudo, podemos formular hipóteses com base nas pesquisas conduzidas por Pamplona e colaboradores em 2010 e 2012. Esses estudos sugerem que a ATL possa desempenhar uma função de modulação alostérica no receptor CB1, potencializando a atividade do endocanabinoide AEA (Pamplona et al., 2012; Pamplona et al., 2010). Embora nosso estudo não utilize a AEA como agonista do receptor CB1, empregamos o ACEA como um análogo do AEA. Importante notar que o ACEA apresenta maior afinidade e o mesmo resíduo de aminoácido crítico para a ligação da AEA no receptor CB1 (Ai & Chang, 2012; Lynch & Reggio, 2006; Shim, 2021).

Apesar da falta de simulações de dinâmica molecular para a ATL e Lipoxina A4 no contexto do CB1r, é possível considerar a existência de potenciais pontos de ligação alostérica no receptor CB1 que poderiam interagir com a ATL ou LXA4. Dado que o CB1 exibe vários locais de modulação alostérica, não é improvável que essas interações possam ocorrer (Pertwee, 2009; Shim et al., 2013; Stornaiuolo et al., 2015).

Essa lógica também pode ser aplicada ao receptor CB2, embora até o momento não haja estudos que sugiram ou confirmem uma interação direta ou indireta da ATL com o CB2. Nesse sentido, é plausível supor que a potencialização do efeito antinociceptivo do JWH-133, com o pré-tratamento com ATL, possa ser resultado de alguma forma de interação da ATL com o CB2. No entanto, dada a falta de evidências nesse sentido, somos deixados com conjecturas e suposições. Sugerimos, portanto, que investigações futuras incluam abordagens como docagem molecular ou mesmo ensaios funcionais específicos para avaliar as possíveis interações entre o CB2 e a ATL. Esses passos podem contribuir para um entendimento mais claro dos mecanismos subjacentes à potencialização observada.

O diabetes tem sido associado ao desenvolvimento de comorbidades psiquiátricas, como a ansiedade e depressão (Moulton et al., 2015). Sabe-se ainda que o tratamento dessas comorbidades associadas ao diabetes é de difícil manejo, o que implica na pesquisa com novos compostos para tratamentos mais efetivos (Rustad et al., 2011). Como observado, em nosso estudo a indução do diabetes experimental leva ao desenvolvimento do comportamento do tipo-ansioso e do tipo-depressivo, e o tratamento com a ATL teve efeitos significativos em aliviar comportamentos do tipo-ansioso, resultados sustentados tanto pelo teste de campo aberto e labirinto em cruz elevado, estes resultados são corroborados com um estudo

que demonstrou a eficácia de outro SPM que compartilha o mesmo receptor para ATL e LXA4, que é a Resolvina D5 (RvD5), em atenuar comportamentos do tipo-depressivo e do tipo-ansioso em ratos diabéticos (Leão et al., 2022). Além disso, a Lipoxina A4 também foi capaz de atenuar o comportamento do tipo-ansioso em camundongos envelhecidos no teste de labirinto em cruz elevado (Leo et al., 2014).

No entanto, a ATL não foi capaz de reduzir comportamentos do tipo-depressivo. Sabe-se que a depressão resistente ao tratamento é um desafio clínico em que, aproximadamente 30 a 40% dos pacientes são irresponsivos aos antidepressivos disponíveis, e as pessoas que tiram vantagem da maneira mais eficaz conseguem isso após um início tardio de ação (Dodd et al., 2021; Gaynes et al., 2020; Jensen et al., 2022; Matthews et al., 2005), o que pode sugerir uma limitação em nosso estudo, na qual nosso regime de administração não foi prolongado o suficiente para que pudessemos observar algum efeito anti-depressivo. Porém, Outras moléculas derivadas de ácidos graxos, como o DHA e EPA, assim como os SPMs da família da resolvina, já demonstraram a capacidade de atenuar o quadro tipo-depressivo de animais diabéticos, em especial quando tratados de forma prolongada (Waltrick et al., 2022).

Em resumo, nosso trabalho demonstra que os mediadores lipídicos pró-reoslutivos e o sistema endocanabinoide podem ser explorados como uma possível via farmacológica no modelo de diabetes experimental induzido por STZ.

5 CONCLUSÃO

Nossas pesquisas demonstraram que animais com diabetes experimental induzido por STZ apresentam alodinia mecânica e comportamentos do tipo-ansioso e do tipo-depressivo. Observou-se que o tratamento com ATL foi efetivo para aumentar o limiar mecânico sem comprometer a atividade locomotora e diminuir o comportamento do tipo-ansioso, porém não teve efeito sobre o comportamento do tipo-depressivo. Além disso, o tratamento com ATL aumentou significativamente o efeito antinociceptivo de agonistas de receptores canabinoides do tipo CB1 ou CB2, ACEA e JWH-133, respectivamente, por mecanismos não explorados neste trabalho, representando uma das limitações do mesmo. No entanto, os achados deste trabalho podem suportar a proposição de um potencial alternativo terapêutico para o tratamento da dor neuropática e ansiedade relacionada ao diabetes.

REFERÊNCIAS

Abdelmoaty, S., Wigerblad, G., Bas, D. B., Codeluppi, S., Fernandez-Zafra, T., El-Awady, E. S., Moustafa, Y., Abdelhamid, A. E. din S., Brodin, E., & Svensson, C. I. (2013). Spinal actions of lipoxin A4 and 17(R)-resolvin D1 attenuate inflammation-induced mechanical hypersensitivity and spinal TNF release. *PLoS One*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0075543>

Ai, R., & Chang, C. E. A. (2012). Ligand-specific homology modeling of human cannabinoid (CB1) receptor. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 38, 155–164. <https://doi.org/10.1016/J.JMGM.2012.05.002>

Alva, M. L. (2020). Co-occurrence of diabetes and depression in the U.S. *PLoS One*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0234718>

Bădescu, S. V., Tătaru, C. P., Kobylinska, L., Georgescu, E. L., Zahiu, D. M., Zăgrean, A. M., & Zăgrean, L. (2016). Effects of caffeine on locomotor activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicine and Life*, 9(3), 275. [/pmc/articles/PMC5154313/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5154313/)

Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.09.02>

Bathina, S., & Das, U. N. (2019). PUFAs, BDNF and lipoxin A4 inhibit chemical-induced cytotoxicity of RIN5F cells in vitro and streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus in vivo. *Lipids in Health and Disease*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-019-1164-7>

Biagetti, B., & Corcoy, R. (2013). Hypoglycemia associated with fluoxetine treatment in a patient with type 1 diabetes. *World Journal of Clinical Cases : WJCC*, 1(5), 169. <https://doi.org/10.12998/WJCC.V1.I5.16>

Bönhof, G. J., Herder, C., Strom, A., Papanas, N., Roden, M., & Ziegler, D. (2019). Emerging Biomarkers, Tools, and Treatments for Diabetic Polyneuropathy. *Endocrine Reviews*, 40(1), 153–192. <https://doi.org/10.1210/ER.2018-00107>

Brennan, E. P., Mohan, M., McClelland, A., de Gaetano, M., Tikellis, C., Marai, M., Crean, D., Dai, A., Beuscart, O., Derouiche, S., Gray, S. P., Pickering, R., Tan, S. M., Godson-Treacy, M., Sheehan, S., Dowdall, J. F., Barry, M., Belton, O., Ali-Shah, S. T., ... Kantharidis, P. (2018). Lipoxins Protect Against Inflammation in Diabetes-Associated Atherosclerosis. *Diabetes*, 67(12). <https://doi.org/10.2337/db17-1317>

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813–820. <https://doi.org/10.1038/414813A>

Calcutt, N. A. (2020). Diabetic neuropathy and neuropathic pain: a (con)fusion of pathogenic mechanisms? *Pain*, 161(Suppl 1), S65. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000001922>

Castany, S., Carcolé, M., Leánez, S., & Pol, O. (2016). The role of carbon monoxide on the anti-nociceptive effects and expression of cannabinoid 2 receptors during painful diabetic neuropathy in mice. *Psychopharmacology*, 233(11), 2209–2219. <https://doi.org/10.1007/S00213-016-4271-4>

Champaneri, S., Wand, G. S., Malhotra, S. S., Casagrande, S. S., & Golden, S. H. (2010). Biological basis of depression in adults with diabetes. *Current Diabetes Reports*, 10(6), 396–405. <https://doi.org/10.1007/s11892-010-0148-9>

Chaves, Y. C., Genaro, K., Stern, C. A., de Oliveira Guaita, G., de Souza Crippa, J. A., da Cunha, J. M., & Zanoveli, J. M. (2020). Two-weeks treatment with cannabidiol improves biophysical and behavioral deficits associated with experimental type-1 diabetes. *Neuroscience Letters*, 729. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2020.135020>

Chiang, N., & Serha, C. N. (2020). Specialized pro-resolving mediator network: An update on production and actions. *Essays in Biochemistry*, 64(3), 443–462. <https://doi.org/10.1042/EBC20200018>

Chiang, N., & Serhan, C. N. (2017). Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Molecular Aspects of Medicine*, 58, 114–129. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2017.03.005>

Cole, J. B., & Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature Reviews Nephrology* 2020 16:7, 16(7), 377–390. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>

Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H., & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2017.2>

Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews. Neurology*, 16(1), 9–29. <https://doi.org/10.1038/S41582-019-0284-Z>

Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4–5), 547–569. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2005.03.008>

da Silva Dias, I. C., Carabelli, B., Ishii, D. K., de Moraes, H., de Carvalho, M. C., Rizzo de Souza, L. E., Zanata, S. M., Brandão, M. L., Cunha, T. M., Ferraz, A. C., Cunha, J. M., & Zanoveli, J. M. (2016). Indoleamine-2,3-Dioxygenase/Kynurenine Pathway as a Potential Pharmacological Target to Treat Depression Associated with Diabetes.

Molecular Neurobiology, 53(10), 6997–7009. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9617-0>

Dalli, J., & Serhan, C. N. (2019). Identification and structure elucidation of the pro-resolving mediators provides novel leads for resolution pharmacology. *Br. J. Pharmacol.*, 176, 1024–1037.

Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(1), 46–56. <https://doi.org/10.1038/NRN2297>

de Moraes, H., de Souza, C. P., da Silva, L. M., Ferreira, D. M., Werner, M. F., Andreatini, R., da Cunha, J. M., & Zanoveli, J. M. (2014). Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. *Behavioural Brain Research*, 258, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.011>

Derada Troletti, C., Enzmann, G., Chiurchiù, V., Kamermans, A., Tietz, S. M., Norris, P. C., Jahromi, N. H., Leuti, A., van der Pol, S. M. A., Schouten, M., Serhan, C. N., de Vries, H. E., Engelhardt, B., & Kooij, G. (2021). Pro-resolving lipid mediator lipoxin A 4 attenuates neuro-inflammation by modulating T cell responses and modifies the spinal cord lipidome. *Cell Reports*, 35(9). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.109201>

Deschênes, S. S., Burns, R. J., & Schmitz, N. (2015). Associations between diabetes, major depressive disorder and generalized anxiety disorder comorbidity, and disability: Findings from the 2012 Canadian Community Health Survey - Mental Health (CCHS-MH). *Journal of Psychosomatic Research*, 78(2), 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2014.11.023>

Detke, M. J., & Lucki, I. (1995). Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behavioural Brain Research*, 73(1–2), 43–46. [https://doi.org/10.1016/01664328\(96\)00067-8](https://doi.org/10.1016/01664328(96)00067-8)

Detke, M. J., Rickels, M., & Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 195 121:1, 121(1), 66–72. <https://doi.org/10.1007/BF02245592>

Devane, W. A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., & Mechoulam, R. (1992). Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science*, 258(5090), 1946–1949. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1470919>

Dewanjee, S., Das, S., Das, A. K., Bhattacharjee, N., Dihingia, A., Dua, T. K., Kalita, J., & Manna, P. (2018). Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. *European Journal of Pharmacology*, 833, 472–523. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2018.06.034>

Di Marzo, V., & Piscitelli, F. (2015). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*, 12(4), 692–698. <https://doi.org/10.1007/S13311-015-0374-6/FIGURES/1>

Didangelos, T., Doupis, J., & Veves, A. (2014). Painful diabetic neuropathy: Clinical aspects. *Handbook of Clinical Neurology*, 126, 53–61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53480-4.00005-9>

Dodd, S., Bauer, M., Carvalho, A. F., Eyre, H., Fava, M., Kasper, S., Kennedy, S. H., Khoo, J. P., Lopez Jaramillo, C., Malhi, G. S., McIntyre, R. S., Mitchell, P. B., Castro, A. M. P., Ratheesh, A., Severus, E., Suppes, T., Trivedi, M. H., Thase, M. E., Yatham, L. N., ... Berk, M. (2021). A clinical approach to treatment resistance in depressed patients: What to do when the usual treatments don't work well enough? *World Journal of Biological Psychiatry*, 22(7), 483–494. <https://doi.org/10.1080/15622975.2020.1851052>

Edwards, J. L., Vincent, A. M., Cheng, H. T., & Feldman, E. L. (2008). Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & Therapeutics*, 120(1), 1–34. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2008.05.005>

Fattori, V., Pinho-Ribeiro, F. A., Staurengo-Ferrari, L., Borghi, S. M., Rossaneis, A. C., Casagrande, R., & Verri, W. A. (2019). The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. *British Journal of Pharmacology*, 176(11), 1728–1744. <https://doi.org/10.1111/BPH.14647>

Feldman, E. L., Callaghan, B. C., Pop-Busui, R., Zochodne, D. W., Wright, D. E., Bennett, D. L., Bril, V., Russell, J. W., & Viswanathan, V. (2019). Diabetic neuropathy. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 42. <https://doi.org/10.1038/S41572-019-0097-9>

Finnerup, N., Hein Sindrup, S., & Staehelin Jensen, T. (2013). Management of painful neuropathies. *Handbook of Clinical Neurology*, 115, 279–290. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52902-2.00017-5>

Gasparin, A. T., Rosa, E. S., Jesus, C. H. A., Guiloski, I. C., da Silva de Assis, H. C., Beltrame, O. C., Dittrich, R. L., Pacheco, S. D. G., Zanoveli, J. M., & da Cunha, J. M. (2021). Bixin attenuates mechanical allodynia, anxious and depressive-like behaviors associated with experimental diabetes counteracting oxidative stress and glycated hemoglobin. *Brain Research*, 1767. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2021.147557>

Gaynes, B. N., Lux, L., Gartlehner, G., Asher, G., Forman-Hoffman, V., Green, J., Boland, E., Weber, R. P., Randolph, C., Bann, C., Coker-Schwimmer, E., Viswanathan, M., & Lohr, K. N. (2020). Defining treatment-resistant depression. *Depression and Anxiety*, 37(2), 134–145. <https://doi.org/10.1002/DA.22968>

Ghosh, K., Zhang, G. F., Chen, H., Chen, S. R., & Pan, H. L. (2022). Cannabinoid CB2 receptors are upregulated via bivalent histone modifications and control primary

afferent input to the spinal cord in neuropathic pain. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(6). <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2022.101999>

Gonçalves, M. R., Da Conceição, M. S., Jesus, C. H. A., Gasparin, A. T., Rosa, E. S., & Da Cunha, J. M. (2022). Spinal cannabinoid CB1 or CB2 receptors activation attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Behavioural Pharmacology*, 33(23), 158–164. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000580>

Grigsby, A. B., Anderson, R. J., Freedland, K. E., Clouse, R. E., & Lustman, P. J. (2002). Prevalence of anxiety in adults with diabetes a systematic review. *Journal of Psychosomatic Research*, 53(6), 1053–1060. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(02\)00417-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00417-8)

Gumy, L. F., Bampton, E. T. W., & Tolkovsky, A. M. (2008). Hyperglycaemia inhibits Schwann cell proliferation and migration and restricts regeneration of axons and Schwann cells from adult murine DRG. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 37(2), 298–311. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2007.10.004>

Gundala, N. K. V., Naidu, V. G. M., & Das, U. N. (2017). Arachidonic acid and lipoxinA4 attenuate streptozotocin-induced cytotoxicity to RIN5 F cells in vitro and type 1 and type 2 diabetes mellitus in vivo. *Nutrition*, 35, 61–80. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.10.004>

Hu, S., Mao-Ying, Q. L., Wang, J., Wang, Z. F., Mi, W. L., Wang, X. W., Jiang, J. W., Huang, Y. L., Wu, G. C., & Wang, Y. Q. (2012). Lipoxins and aspirin-triggered lipoxin alleviate bone cancer pain in association with suppressing expression of spinal proinflammatory cytokines. *Journal of Neuroinflammation*, 9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-278>

Iqbal, Z., Azmi, S., Yadav, R., Ferdousi, M., Kumar, M., Cuthbertson, D. J., Lim, J., Malik, R. A., & Alam, U. (2018). Diabetic Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Diagnosis, and Pharmacotherapy. *Clinical Therapeutics*, 40(6), 828–849. <https://doi.org/10.1016/J.CLINTHERA.2018.04.001>

Jensen, K. J., Gronemann, F. H., Ankarfeldt, M. Z., Jimenez-Solem, E., Alulis, S., Riise, J., Bødker, N., Osler, M., & Petersen, J. (2022). Healthcare resource utilization in patients with treatment-resistant depression—A Danish national registry study. *PLOS ONE*, 17(9), e0275299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275299>

Lamon-Fava, S., So, J., Mischoulon, D., Ziegler, T. R., Dunlop, B. W., Kinkead, B., Schettler, P. J., Nierenberg, A. A., Felger, J. C., Maddipati, K. R., Fava, M., & Rapaport, M. H. (2021). Dose- and time-dependent increase in circulating anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators following eicosapentaenoic acid supplementation in patients with major depressive disorder and chronic inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 164. <https://doi.org/10.1016/J.PLEFA.2020.102219>

Leão, F. F., Waltrick, A. P. F., Verri, W. A., da Cunha, J. M., & Zanoveli, J. M. (2022). Resolvin D5 disrupts anxious- and depressive-like behaviors in a type 1 diabetes

mellitus animal model. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 395(10), 1269–1282. <https://doi.org/10.1007/S00210-022-02274-8>

Lee-Kubli, C. A., & Calcutt, N. A. (2014). Painful neuropathy: Mechanisms. *Handbook of Clinical Neurology*, 126, 533–557. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53480-4.00034-5>

Leo, L. M., Almeida-Corrêa, S., Canetti, C. A., Amaral, O. B., Bozza, F. A., & Pamplona, F. A. (2014). Age-dependent relevance of endogenous 5-lipoxygenase derivatives in anxiety-like behavior in mice. *PloS One*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0085009>

Leonard, B. E. (2014). Impact of inflammation on neurotransmitter changes in major depression: an insight into the action of antidepressants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 48, 261–267. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2013.10.018>

Li, H. Q., Chi, S., Dong, Q., & Yu, J. T. (2019). Pharmacotherapeutic strategies for managing comorbid depression and diabetes. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(13), 1589–1599. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1622090>

Li, Q., Tian, Y., Wang, Z. F., Liu, S. B., Mi, W. L., Ma, H. J., Wu, G. C., Wang, J., Yu, J., & Wang, Y. Q. (2013). Involvement of the spinal NALP1 inflammasome in neuropathic pain and aspirin-triggered-15-epi-lipoxin A4 induced analgesia. *Neuroscience*, 254, 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.028>

Lynch, D. L., & Reggio, P. H. (2006). Cannabinoid CB1 receptor recognition of endocannabinoids via the lipid bilayer: Molecular dynamics simulations of CB1 transmembrane helix 6 and anandamide in a phospholipid bilayer. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 20(7–8), 495–509. <https://doi.org/10.1007/s10822-006-9068-9>

Maes, M. (2011). Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(3), 664–675. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2010.06.014>

Maldonado, R., Baños, J. E., & Cabañero, D. (2016). The endocannabinoid system and neuropathic pain. *Pain*, 157, S23–S32. <https://doi.org/10.1097/J.PAIN.0000000000000428>

Martini, A. C., Berta, T., Forner, S., Chen, G., Bento, A. F., Ji, R. R., & Rae, G. A. (2016). Lipoxin A4 inhibits microglial activation and reduces neuroinflammation and neuropathic pain after spinal cord hemisection. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0540-8>

Matthews, K., Christmas, D., Swan, J., & Sorrell, E. (2005). Animal models of depression: Navigating through the clinical fog. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4–5), 503–513. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2005.03.005>

Menezes Zanoveli, J., de Moraes, H., Caroline da Silva Dias, I., Karoline Schreiber, A., Pasquini de Souza, C., & Maria da Cunha, J. (2016). Depression Associated with Diabetes: From Pathophysiology to Treatment. *Current Diabetes Reviews*, 12(3), 165–178. <https://doi.org/10.2174/1573399811666150515125349>

Miao, G., Liu, Z., Wei, S., Luo, J., Fu, Z., & Sun, T. (2015a). Lipoxin A4 attenuates radicular pain possibly by inhibiting spinal ERK, JNK and NF- κ B/p65 and cytokine signals, but not p38, in a rat model of non-compressive lumbar disc herniation. *Neuroscience*, 300, 10–18. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.04.060>

Miao, G., Liu, Z., Wei, S., Luo, J., Fu, Z., & Sun, T. (2015b). Lipoxin A4 attenuates radicular pain possibly by inhibiting spinal ERK, JNK and NF- κ B/P65 and cytokine signals, but not P38, in a rat model of non-compressive lumbar disc herniation. *Neuroscience*, 300, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.060>

Moulton, C. D., Pickup, J. C., & Ismail, K. (2015). The link between depression and diabetes: the search for shared mechanisms. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 3(6), 461–471. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00134-5)

O'Brien, P. D., Hur, J., Hayes, J. M., Backus, C., Sakowski, S. A., & Feldman, E. L. (2015). BTBR ob/ob mice as a novel diabetic neuropathy model: Neurological characterization and gene expression analyses. *Neurobiology of Disease*, 73, 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.10.015>

Obrosova, A., Coppey, L. J., Shevalye, H., & Yorek, M. A. (2017). Effect of Fish Oil vs. Resolvin D1, E1, Methyl Esters of Resolvins D1 or D2 on Diabetic Peripheral Neuropathy. *Journal of Neurology & Neurophysiology*, 8(6). <https://doi.org/10.4172/2155-9562.1000453>

Pamplona, F. A., Ferreira, J., De Lima, O. M., Duarte, F. S., Bento, A. F., Forner, S., Villarinho, J. G., Bellochio, L., Wotjak, C. T., Lerner, R., Monory, K., Lutz, B., Canetti, C., Matias, I., Calixto, J. B., Marsicano, G., Guimaraes, M. Z. P., & Takahashi, R. N. (2012). Anti-inflammatory lipoxin A4 is an endogenous allosteric enhancer of CB1 cannabinoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(51), 21134–21139. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202906109>

Pamplona, F. A., Menezes-de-Lima, O., & Takahashi, R. N. (2010). Aspirin- triggered lipoxin induces CB1-dependent catalepsy in mice. *Neuroscience Letters*, 470(1), 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.050>

Pertwee, R. G. (2009). Cannabinoid pharmacology: the first 66 years: Cannabinoid pharmacology. *Br. J. Pharmacol.*, 147(SUPPL. 1), S163–S171. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706406>

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)

Pop-Busui, R., Ang, L., Holmes, C., Gallagher, K., & Feldman, E. L. (2016). Inflammation as a Therapeutic Target for Diabetic Neuropathies. *Current Diabetes Reports*, 16(3), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0727-5>

Regulska, M., Szuster-Gluszczak, M., Trojan, E., Leśkiewicz, M., & Basta-Kaim, A. (2020). The Emerging Role of the Double-Edged Impact of Arachidonic Acid-Derived Eicosanoids in the Neuroinflammatory Background of Depression. *Current Neuropharmacology*, 19(2), 278–293. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200807144530>

Rosenberger, D. C., Blechschmidt, V., Timmerman, H., Wolff, A., & Treede, R. D. (2020). Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. *Journal of Neural Transmission* (Vienna, Austria: 1996), 127(4), 589–624. <https://doi.org/10.1007/S00702-020-02145-7>

Roy, T., & Lloyd, C. E. (2012). Epidemiology of depression and diabetes: a systematic review. *Journal of Affective Disorders*, 142 Suppl(SUPPL.). [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(12\)70004-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(12)70004-6)

Rustad, J. K., Musselman, D. L., & Nemeroff, C. B. (2011). The relationship of depression and diabetes: Pathophysiological and treatment implications. *Psychoneuroendocrinology*, 36(9), 1276–1286. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.03.005>

Schreiber, A. K. (2015). Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 432. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.432>

Selvarajah, D., Kar, D., Khunti, K., Davies, M. J., Scott, A. R., Walker, J., & Tesfaye, S. (2019). Diabetic peripheral neuropathy: advances in diagnosis and strategies for screening and early intervention. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 7(12), 938–948. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30081-6](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30081-6)

Serhan, C. N. (2005). Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 73(3–4), 141–162. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.05.002>

Serhan, C. N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503), 92–101. <https://doi.org/10.1038/NATURE13479>

Sheng, W. S., Chauhan, P., Hu, S., Prasad, S., & Lokensgard, J. R. (2019). Antiallodynic Effects of Cannabinoid Receptor 2 (CB2R) Agonists on Retrovirus Infection-Induced Neuropathic Pain. *Pain Research & Management*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1260353>

Shevalye, H., Yorek, M. S., Coppey, L. J., Holmes, A., Harper, M. M., Kardon, R. H., & Yorek, M. A. (2015). Effect of enriching the diet with menhaden oil or daily treatment with resolvin D1 on neuropathy in a mouse model of type 2 diabetes.

Journal of Neurophysiology, 114(1), 199–208. <https://doi.org/10.1152/jn.00224.2015>

Shim, J. Y. (2021). Prediction of essential binding domains for the endocannabinoid N-arachidonoyl ethanolamine (AEA) in the brain cannabinoid CB1 receptor. *PloS One*, 16(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0229879>

Shim, J. Y., Ahn, K. H., & Kendall, D. A. (2013). Molecular Basis of Cannabinoid CB1 Receptor Coupling to the G Protein Heterotrimer Gaiβγ: IDENTIFICATION OF KEY CB1 CONTACTS WITH THE C-TERMINAL HELIX α5 OF Gai*. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(45), 32449. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.489153>

Spite, M., Clària, J., & Serhan, C. N. (2014). Resolvins, specialized proresolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases. *Cell Metab.*, 19, 21–36.

Stornaiuolo, M., Bruno, A., Botta, L., Regina, G. La, Cosconati, S., Silvestri, R., Marinelli, L., & Novellino, E. (2015). Endogenous vs Exogenous Allosteric Modulators in GPCRs: A dispute for shuttling CB1 among different membrane microenvironments. *Scientific Reports 2015 5:1*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep15453>

Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., & Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215(1), 89–97. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1995.2437>

Vera, G., Cabezos, P. A., Martín, M. I., & Abalo, R. (2013). Characterization of cannabinoid-induced relief of neuropathic pain in a rat model of cisplatin-induced neuropathy. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 105, 205–212. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2013.02.008>

Waltrick, A., Henrique Bernardo de Lima Silva, A., Cristina de Carvalho, M., Aparecida Comotti de Oliveira, B., Naliwaiko, K., Maria da Cunha, J., & Menezes Zanoveli, J. (2022). Preventive treatment with fish oil facilitates the antidepressant-like effect of antidepressant drugs in type-1 diabetes mellitus rats: Implication of serotonergic system. *Neuroscience Letters*, 772. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2022.136477>

Wang, K., Li, F., Cui, Y., Cui, C., Cao, Z., Xu, K., Han, S., Zhu, P., & Sun, Y. (2019a). The association between depression and type 1 diabetes mellitus: Inflammatory cytokines as ferryman in between? *Mediators of Inflammation*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2987901>

Wang, Z. F., Li, Q., Liu, S. B., Mi, W. L., Hu, S., Zhao, J., Tian, Y., Mao-Ying, Q. L., Jiang, J. W., Ma, H. J., Wang, Y. Q., & Wu, G. C. (2014). Aspirin-triggered Lipoxin A4 attenuates mechanical allodynia in association with inhibiting spinal JAK2/STAT3 signaling in neuropathic pain in rats. *Neuroscience*, 273, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.052>

Whitworth, S. R., Bruce, D. G., Starkstein, S. E., Davis, W. A., Davis, T. M. E., & Bucks, R. S. (2016). Lifetime depression and anxiety increase prevalent psychological symptoms and worsen glycemic control in type 2 diabetes: The Fremantle Diabetes

Study Phase II. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 122, 190–197.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2016.10.023>

Woodhams, S. G., Sagar, D. R., Burston, J. J., & Chapman, V. (2015). The role of the endocannabinoid system in pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 227, 119–143. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46450-2_7/COVER

Yamamoto, W., Mikami, T., & Iwamura, H. (2008). Involvement of central cannabinoid CB2 receptor in reducing mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*, 583(1), 56–61.
<https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2008.01.010>

Yorek, M. A. (2018). The Potential Role of Fatty Acids in Treating Diabetic Neuropathy. *Current Diabetes Reports*, 18(10). <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1046-9>

Yorek, M. S., Coppey, L. J., Shevalye, H., Obrosova, A., Kardon, R. H., & Yorek, M. A. (2016). Effect of Treatment with Salsalate, Menhaden Oil, Combination of Salsalate and Menhaden Oil, or Resolvin D1 of C57Bl/6J Type 1 Diabetic Mouse on Neuropathic Endpoints. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2016, 5905891.
<https://doi.org/10.1155/2016/5905891>

ANEXO 1 – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA

SEI/UFPR - 3858708 - CEUA/BIO: Certificado

08/03/2022 12:01



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1418

CERTIFICADO

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

STATEMENT

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

PROCESSO/PROCESS: 23075.045627/2021-54

APROVADO/APPROVAL: 21/09/2021 – R.O. 08/2021

TÍTULO: Avaliação do efeito do tratamento com 15-epi-lipoxina A4 isoladamente ou em associação com agonistas canabinoídes sobre a dor neuropática, depressão e ansiedade associadas ao diabetes experimental.

TITLE: Evaluation of the effect of treatment with 15-epi-lipoxin A4 alone or in association with cannabinoid receptor agonists on neuropathic pain, depression and anxiety associated with experimental diabetes.

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

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia

Prof. Dr. Breno Castello Branco Beirão
Coordenador da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI**, Institucional, em 27/09/2021, às 12:30, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **3858708** e o código CRC **61C365CA**.

Criado por iselen, versão 2 por iselen em 27/09/2021 12:27:04.