

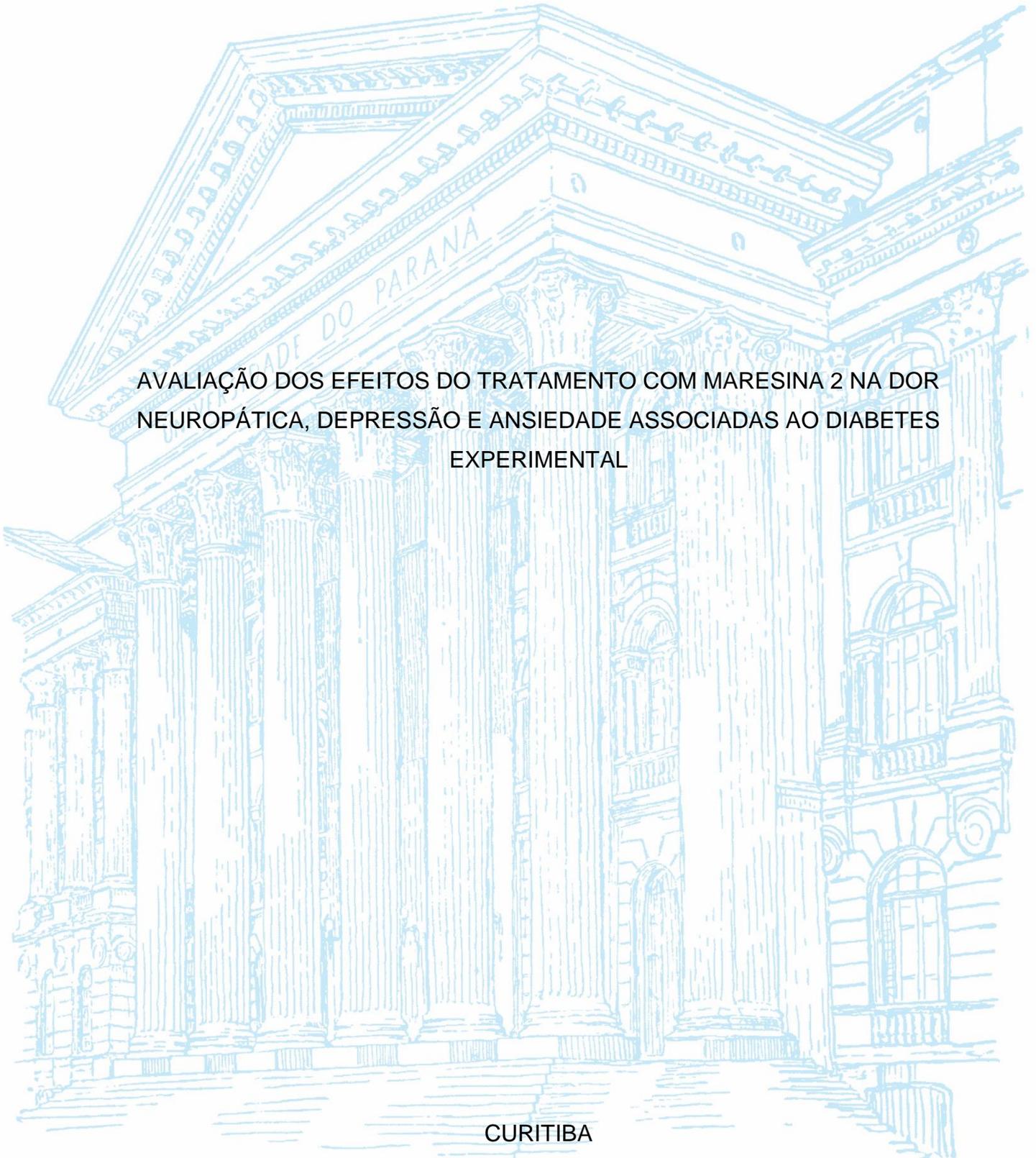
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELLE OLIVEIRA GUILHERME

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM MARESINA 2 NA DOR
NEUROPÁTICA, DEPRESSÃO E ANSIEDADE ASSOCIADAS AO DIABETES
EXPERIMENTAL

CURITIBA

2023



GABRIELLE OLIVEIRA GUILHERME

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM MARESINA 2 NA DOR
NEUROPÁTICA, DEPRESSÃO E ANSIEDADE ASSOCIADAS AO DIABETES
EXPERIMENTAL

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

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

Coorientador(a): Msc. Matheus Vinicius Ferreira

CURITIBA

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família que sempre tentou me fornecer as melhores condições para que eu pudesse ter uma boa qualidade de ensino. Um agradecimento especial à minha mãe, meu pai, meu irmão e minha tia que sempre foram minha parte mais próxima fornecendo o maior suporte possível. Além disso, meus animais de estimação (Zequinha e Juquinha), que sempre estiveram comigo nos momentos mais difíceis da minha vida.

À minha orientadora, Joice Maria da Cunha, uma mulher acolhedora e que me fez me apaixonar pela área da dor e farmacologia. A pessoa que me abriu portas e confiou na minha capacidade para iniciar um projeto sozinha com total autonomia.

Ao meu namorado, co-orientador desse projeto e colega de laboratório, que foi a minha maior base de auxílio para o desenvolvimento desse trabalho e que além de tudo sempre me apoiou para seguir em frente com meus sonhos.

Aos meus amigos quase biomédicos, que desde 2019 estão juntos comigo, aguentando meus surtos e me fazendo rir da melhor forma possível. Vocês definitivamente tornaram a minha graduação um local mais leve e eu não teria conseguido passar por tudo se não fosse por vocês. Obrigada demais!

Aos amigos que fiz no Pequeno Príncipe e na X-Leme. Obrigada por me tornarem uma pessoa mais profissional e responsável.

Aos colegas do Departamento de Farmacologia que fiz no decorrer do percurso, e que certamente estarão juntos comigo novamente durante o mestrado.

Aos animais utilizados nesse estudo.

À Universidade Federal do Paraná pela estrutura física.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

“Darkness help us all to shine”

Dark Necessities - Red Hot Chilli Peppers

RESUMO

A neuropatia diabética (ND) é a complicação crônica mais prevalente no Diabetes Mellitus (DM), tendo como principal sintoma a dor neuropática diabética. Ademais, já se é relatado na literatura uma relação proporcional entre pacientes diabéticos e o desenvolvimento de doenças psiquiátricas, como depressão e ansiedade. O manejo dessas condições ainda é um desafio exigindo o estudo de novos alvos farmacológicos. A Maresina 2 (MaR2), um mediador lipídico pró-resolutivo, demonstrou efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios e pró-resolutivos em modelos de dor inflamatória. Os efeitos da MaR2 em animais diabéticos, entretanto, ainda não são bem descritos, sendo este o foco principal deste estudo. O diabetes experimental foi induzido em ratos Wistar machos por meio de uma única injeção intraperitoneal de STZ. A alodinia mecânica foi avaliada por meio do teste eletrônico de Von Frey (VF) antes da injeção de STZ (baseline) e do dia 14 ao dia 27 após a STZ. Os testes de campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE) e nado forçado modificado (NFm) foram realizados nos dias 28, 29 e 31, respectivamente. A MaR2 foi administrada a partir do 17º dia em dias alternados para avaliar o efeito do tratamento sub-crônico. Comparado ao grupo NGL-VEH, o grupo DBT-VEH apresentou: redução do limiar mecânico; diminuição da atividade locomotora; e comportamento do tipo ansioso. Em comparação ao grupo DBT-VEH, o tratamento com MaR2 foi capaz de atenuar a alodinia mecânica e os comportamentos do tipo ansioso, sem alterar a atividade locomotora. Nossos dados, entretanto, não demonstraram efeitos antidepressivos, exigindo outros estudos complementares para compreender o mecanismo da MaR2 na depressão. O principal achado desse trabalho, portanto, foi a investigação do potencial efeito antinociceptivo e ansiolítico em ratos diabéticos.

Palavras-chave: Neuropatia diabética; Maresina 2; Ansiedade; Depressão; Alodinia mecânica.

ABSTRACT

Diabetic neuropathy (DN) is the most prevalent chronic complication in Diabetes Mellitus (DM), with diabetic neuropathic pain as its main symptom. Furthermore, a proportional relationship between diabetic patients and the development of psychiatric illnesses, such as depression and anxiety, has already been reported in the literature. The management of these conditions is still a challenge, requiring the study of new pharmacological targets. Maresin 2 (MaR2), a pro-resolving lipid mediator, has demonstrated antinociceptive, anti-inflammatory and pro-resolving effects in inflammatory pain models. The effects of MaR2 in diabetic animals, however, are not yet well described, which is the main focus of this study. Experimental diabetes was induced in male Wistar rats by a single intraperitoneal injection of STZ. Mechanical allodynia was assessed using the electronic Von Frey test (VF) before STZ injection (baseline) and from day 14 to day 27 after STZ. The open field (OF), elevated plus maze (EPM) and modified forced swimming (FSTm) tests were performed on days 28, 29 and 31, respectively. MaR2 was administered from the 17th day on alternate days to evaluate the effect of sub-chronic treatment. Compared to the NGL-VEH group, the DBT-VEH group showed: reduced mechanical threshold; decreased locomotor activity; and anxiety-like behavior. Compared to the DBT-VEH group, MaR2 treatment was able to attenuate mechanical allodynia and anxiety-like behaviors without altering locomotor activity. Our data, however, did not demonstrate antidepressant effects, requiring further complementary studies to understand the mechanism of MaR2 in depression. The main finding of this work, therefore, was the investigation of the potential antinociceptive and anxiolytic effects in diabetic rats.

Keywords: Diabetic neuropathy; Maresin 2; Anxiety; Depression; Mechanical allodynia.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DESENHO EXPERIMENTAL	24
FIGURA 2 - EFEITO AGUDO DA MaR 2 SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS	26
FIGURA 3 - EFEITO CUMULATIVO DA MaR2 SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICO	27
FIGURA 4 - EFEITO DA MaR2 SOBRE O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO NO TESTE DE CAMPO ABERTO	28
FIGURA 5 - EFEITO DA MaR2 SOBRE COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	30
FIGURA 6 - EFEITO DA MaR2 SOBRE COMPORTAMENTO DO TIPO- DEPRESSIVO NO TESTE MODIFICADO DE NADO FORÇADO	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EFEITO DA MaR2 SOBRE PESO E GLICEMIA DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR STZ	32
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- 12-LOX – 12-Lipoxigenase
- CA – Campo Aberto
- CFA – *Complete Freund's Adjuvant* (Adjuvante Completo de Freund)
- DBT – Grupo Diabético
- DHA – *Docosahexaenoic Acid* (Ácido Docosahexaenóico)
- DN – Dor Neuropática
- DRG – *Dorsal Root Ganglia* (Ganglios de Raiz Dorsal)
- EPA – *Eicosapentaenoic Acid* (Ácido Eicosapentaenoico)
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- IL-1 – Interleucina 1
- IL-6 – Interleucina 6
- IASP – *International Association for the Study of Pain* (Associação Internacional para o Estudo da Dor)
- LCE – Labirinto em Cruz elevado
- LGR6 – *Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 6* (Repetição rica em leucina contendo receptor 6 acoplado à proteína G)
- MaR1 – Maresina 1
- MaR2 – Maresina 2
- ND – Neuropatia Diabética
- NFm – Nado Forçado modificado
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PSD – Polineuropatia Simétrica Distal
- PUFAs – *Polyunsaturated Fatty Acids* (Ácidos Graxos Poliinsaturados)
- PVC – Policloreto de Vinil
- SNP – Sistema Nervoso Periférico
- SNC – Sistema Nervoso Central
- SPMs – *Specialized Pro Resolving Mediators* (Mediadores Lipídicos Pró-Resolutivos)
- STZ – Estreptozotocina
- TDM – Transtorno Depressivo Maior
- TNF – *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)
- TRP – *Transient Receptor Potential* (Potencial de Receptor Transitório)

TRPA1 – *Transient Receptor Potential Channel Ankyrin 1*

TRPV1 – *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*

VEI – Grupo Veículo

VF – Von Frey

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 CONTEXTO E PROBLEMA	13
1.2 OBJETIVOS	13
1.2.1 Objetivo geral	13
1.2.2 Objetivos específicos.....	14
1.3 JUSTIFICATIVA	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 DIABETES MELLITUS	16
2.2 NEUROPATIA DIABÉTICA E DOR NEUROPÁTICA	16
2.3 DEPRESSÃO E ANSIEDADE ASSOCIADAS AO DIABETES	18
2.4 MEDIADORES LIPÍDICOS PRÓ-RESOLUTIVOS	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 ANIMAIS.....	21
3.2 DROGAS.....	21
3.3 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL	21
3.4 TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO	21
3.5 TESTE DE CAMPO ABERTO	22
3.6 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	22
3.7 TESTE DE NADO FORÇADO.....	23
3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	23
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS	26
4.1 MAR2 NÃO ATENUA ALODINIA MECÂNICA QUANDO ADMINISTRADA AGUDAMENTE NO TESTE ELETRÔNICO DE VON FREY.....	26
4.2 MAR2 DEMONSTROU UM EFEITO ANTINOCICEPTIVO CUMULATIVO NO TESTE ELETRÔNICO DE VON FREY	27
4.3 O TRATAMENTO COM MAR2 NÃO ALTERA O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO NO TESTE DE CAMPO ABERTO	28
4.4 MAR2 DIMINUI COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	29
4.5 MAR2 NÃO FOI CAPAZ DE REDUZIR O COMPORTAMENTO DO TIPO- DEPRESSIVO NO TESTE DE NADO FORÇADO MODIFICADO	31

4.6 O TRATAMENTO COM MAR2 NÃO FOI CAPAZ DE REVERTER A
HIPERGLICEMIA E BAIXO GANHO DE PESO EM ANIMAIS DIABÉTICOS POR
STZ 32

5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES	35
7 LIMITAÇÕES	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

O diabetes é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia, provocadas graças a uma deficiência na produção de insulina – tipo 1 – ou então provocada por uma resistência a ela – tipo 2 (Schmidt, 2018). Apesar do diabetes tipo 1 apresentar uma menor prevalência global, se desconhece meios de prevenção, além de apresentar uma expectativa de vida reduzida em 20 anos (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2023). Além disso, as graves complicações do diabetes, como a dor neuropática (DN) diabética e suas conseqüentes morbidades neuropsicológicas, afetam significativamente a qualidade de vida do paciente. A dor neuropática diabética é o principal sintoma da neuropatia diabética, sendo considerado como um dos mais debilitantes, tendo como características alodinia (dor a estímulos não nocivos), hiperalgesia (dor exacerbada a estímulos dolorosos) e dor espontânea. Os tratamentos atuais não são satisfatórios, visto a complexidade da fisiopatologia das complicações e comorbidades (Calcutt, 2020). Alguns estudos apontam para o componente neuroinflamatório como um dos principais desencadeadores das complicações do diabetes (Feldman et al, 2019; Wang et al., 2019). Nesse sentido, alguns estudos já demonstraram que a atividade antinociceptiva de mediadores lipídicos especializados pró-resolutivos (do inglês *Specialized Pro Resolving Mediators*, SPMs) tem sido principalmente relacionada à sua capacidade resolutiva da inflamação. Experimentos em modelos animais já demonstraram a eficácia de alguns SPMs, como resolvinas, lipoxinas e maresinas, no tratamento da dor crônica (Leuti et al., 2021). Entretanto, ainda se desconhecem os efeitos resolutivos da MaR2 na redução de complicações associadas ao diabetes. A principal hipótese esperada é que a administração dessa molécula provoque diminuições do limiar doloroso, e indiretamente provoque melhorias nas morbidades psíquicas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da MaR2 na dor neuropática, ansiedade e depressão em modelos animais induzidos por estreptozotocina (STZ) experimentalmente.

1.2.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos da MaR2 na alodinia mecânica em animais diabéticos através do teste Eletrônico de Von Frey;
- Investigar os efeitos da MaR2 no comportamento exploratório através do teste de Campo Aberto;
- Investigar os efeitos da MaR2 no comportamento do tipo ansioso no teste de Labirinto em Cruz Elevado;
- Investigar os efeitos da MaR2 no comportamento do tipo-depressivo no teste de Nado Forçado modificado;
- Investigar os efeitos da MaR2 na alteração de parâmetros biofísicos, como glicemia e ganho de peso;

1.3 JUSTIFICATIVA

O manejo da dor neuropática diabética ainda é um desafio, resultado de uma alta heterogeneidade de mecanismos, sendo ainda frequentemente associado a componentes psicológicos e emocionais (Baron, Binder e Wasner, 2010). O tratamento atual é limitado à analgésicos, entretanto, a eficácia desses fármacos costuma ser baixa e com muitos efeitos colaterais. Além disso, a coexistência de morbidades como depressão e ansiedade podem prejudicar a adesão ao tratamento (Finnerup, Kuner e Jensen, 2020).

Os modelos animais de dor neuropática são primordiais para o estudo e desenvolvimento de novas terapias. Várias pesquisas apontam que a neuroinflamação desempenha um papel importante na patogenia da doença, dessa forma, portanto, os inibidores da neuroinflamação poderiam ser uma possível alternativa para o desenvolvimento de novos alvos farmacológicos de manejo da dor (Cavalli et al., 2019). Visto o papel dos SPMs, que possuem atividades resolutivas e anti-inflamatórias potentes em doses baixas e sem provocar efeitos colaterais, além da necessidade de se aprofundar nos estudos dos mecanismos analgésicos da MaR2,

(Fattori et al., 2022) essa molécula foi escolhida como alvo terapêutico para o desenvolvimento desse projeto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

O Diabetes Mellitus (DM) é uma das emergências de saúde global que mais crescem no século XXI, sendo projetado que até 2045 o número de pessoas atingidas pela doença seja de 783 milhões (Diabetes Atlas, 2021). Em 2012, o diabetes foi classificado como a oitava maior causa de morte no mundo, sendo diretamente relacionada à elevação de glicose no sangue (WHO, 2016). O DM é uma condição crônica resultado de um grupo de doenças metabólicas causadoras de hiperglicemia, provocada por defeitos na produção e/ou secreção de insulina (American Diabetes Association, 2009). O diabetes pode ser classificado em dois tipos principais. O diabetes tipo 1, ou DM1, é causado devido a destruição autoimune das células β -pancreáticas, levando a uma deficiência absoluta de insulina. Sua epidemiologia é menos comum, representando cerca de 10-15% dos pacientes diabéticos. O diabetes tipo 2, ou DM2, por sua vez, ocorre devido a uma perda progressiva da secreção de insulina, estando muito associado a episódios de resistência à insulina (American Diabetes Association, 2021). Acredita-se que a natureza do DM2 é influenciada por fatores genéticos e ambientais, diferentemente do DM1, em que a etiologia ainda não é totalmente elucidada (Acharjee et al., 2013). Ainda, o DM1 apresenta um maior risco de cetoacidose diabética, causado pelo desequilíbrio na produção de insulina e hormônios contra regulatórios e consequente liberação de ácidos graxos (Bluestone et al., 2010), além de apresentar uma necessidade de tratamento contínuo e acompanhamento médico, de forma a monitorar a glicemia; complicações graves como doenças cardiovasculares, neuropatia, cegueira e insuficiência renal (Tripathi and Srivastava, 2006).

2.2 NEUROPATIA DIABÉTICA E DOR NEUROPÁTICA

A neuropatia diabética é a complicação mais comum do diabetes e que abrange uma série de anormalidades que afetam as funções nervosas e autonômicas (Vinik et al., 1992; Oh, 2020). A principal manifestação da neuropatia diabética é conhecida como polineuropatia simétrica distal (PSD), podendo ser definida como uma doença de perda progressiva de fibras nervosas, atrofia e lesão (Greene et al.,

1992). A PSD apresenta um padrão de “luvas e meias”, de início em regiões distais e progressão a regiões proximais, causando parestesias e dor - sintomas positivos - tal como dormência e sensação de peso - sintomas negativos. A perda de fibras sensoriais A δ e C induz dor em queimação ou lancinante com vários sintomas ou sinais de disfunção autonômica (Vinik et al. 2013; Oh 2020).

Cerca de 30% dos pacientes diabéticos irão experimentar dor, que pode ser intensa ou incapacitante. Segundo a IASP (*International Association for the Study of Pain*) a dor neuropática pode ser definida como dor causada por lesão ou doença do sistema somatossensorial, se manifestando como anormalidades sensoriais no território de inervação dos nervos danificados (Jensen et al., 2021). No sistema nervoso periférico (SNP), danos nos nervos levam a uma redução da transmissão de sinal para a medula, além de alterações na expressão de canais iônicos. No sistema nervoso central (SNC), por sua vez, é visualizado um processamento central amplificado a nível talâmico e cortical (Rosenberger et al., 2020).

É válido mencionar, no entanto, que o processo doloroso das neuropatias diabéticas abrange uma série de mecanismos complexos que se originam desde aumento do fluxo na via do polióis, através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente lesão celular, até expressões gênicas e alterações nos canais iônicos (Feldman et al., 2017; Rosenberger et al., 2020; Calcutt, 2020). Ainda, Fisher & Waxman demonstraram que a neuropatia diabética experimental está associada a alterações na expressão de canais de sódio que podem aumentar a excitabilidade de corpos celulares do gânglio da raiz dorsal (Fischer and Waxman, 2010). Notavelmente, a DN exibe uma relação bidirecional com a neuroinflamação, caracterizada pela infiltração de leucócitos nos nervos lesionados, secreção de mediadores pró-inflamatórios e ativação de células gliais (Kiguchi, Kobayashi e Kishioka, 2012; Fang et al., 2022). O aumento da expressão de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF- α) e Interleucina 1- β (IL-1 β) provoca danos aos nervos periféricos, resultando em desmielinização e morte neuronal. A ativação das células da glia, por sua vez, promove o aumento da produção de citocinas e consequentemente o aumento da neuroinflamação (Bönhof et al, 2019; Pop-Busui et al, 2016).

Em se tratando de farmacoterapias, os antidepressivos tricíclicos e duais são a primeira escolha de abordagem para o tratamento da DN, inibindo a receptação de serotonina e norepinefrina. Além disso, os antiepilépticos, especialmente gabapentina

e pregabalina, também podem ser recomendados já que apresentam um mecanismo de ação conhecido por provocar depleção da atividade sináptica e redução das descargas ganglionares da raiz dorsal. Por fim, como segunda ou terceira opção de tratamento, os opioides atuam por diminuir a excitabilidade neuronal e provocar o alívio da dor (Jackson, 2006).

Entretanto é válido mencionar que visto a complexidade de mecanismos subjacentes envolvidos na dor neuropática diabética, seu tratamento ainda é desafiador. A DN é uma condição que é muitas vezes resistente ao tratamento farmacológico, sendo associada a uma baixa satisfação do paciente. Além disso, os atuais medicamentos analgésicos indicados apresentam uma série de efeitos colaterais graves, dificultando a adesão ao tratamento (Zilliox, 2017; Fang et al., 2022). Por esses motivos, visar a resolução da inflamação parece ser uma solução mais viável para combater a neuroinflamação (Ji, Xu e Gao, 2014).

2.3 DEPRESSÃO E ANSIEDADE ASSOCIADAS AO DIABETES

A depressão é definida como uma alteração patológica do humor, sendo geralmente associado a sintomas como: humor deprimido, interesse reduzido em quase todas as atividades, perda ou ganho de peso, menor capacidade de tomada de decisões, etc. Segundo dados da OMS é estimado que 280 milhões de pessoas no mundo possuem depressão (OMS, 2023). Sabe-se que as principais causas da depressão estão relacionadas a alterações na transmissão de neurotransmissores, disfunções em sistemas neuroendócrinos e ocorrência de processos inflamatórios. A desregulação dos sistemas imunológicos afeta negativamente o funcionamento do cérebro e prejudica o prognóstico favorável (Beurel, Toups e Nemeroff, 2020).

A ansiedade, por sua vez, é o sentimento de medo que ocorre ao enfrentar situações estressantes e ameaçadoras. É uma resposta normal do organismo, mas que ao persistir durante muito tempo, pode ser considerado como um transtorno (Dean, 2016). Indivíduos com transtornos de ansiedade apresentam medos excessivos e evitam ameaças percebidas no ambiente, como situações sociais e locais desconhecidos (Craske, 2016). Em 2019, cerca de 301 milhões de pessoas apresentavam transtorno de ansiedade, sendo classificado como o transtorno mental mais comum dentre todos os transtornos (OMS, 2023).

Já se é observado na literatura uma relação muito bem estabelecida entre a presença de doenças psiquiátricas e o DM1. As taxas de depressão tendem a ser três vezes maiores em pacientes com DM1, assim como ansiedade tende a aparecer em 40% dos indivíduos diabéticos (Bădescu et al., 2016). Não só na clínica, mas de forma experimental, alguns estudos realizados em modelos animais de DM1 demonstraram que o aumento de estresse oxidativo e neuroinflamação em áreas cerebrais importantes para o controle das emoções, provocam alterações nos comportamentos emocionais dos animais (Leão et al., 2022).

Da mesma forma, fatores psicológicos parecem influenciar o curso do DM, incluindo seu manejo e controle metabólico (Dantzer et al., 2003). Lernmark et al identificou que indivíduos com DM1 e distúrbios psiquiátricos concomitantes eram menos capazes de se adaptar psicologicamente ao diabetes, afetando negativamente o controle glicêmico e adesão ao tratamento. Acredita-se que alterações metabólicas e inflamatórias compensatórias pela destruição autoimune de células beta, agravem a depressão (Buchberger et al., 2016). Além disso, pacientes que apresentam dor neuropática associada às comorbidades mencionadas, tendem a apresentar uma injúria mais elevada e de maior percepção, impactando o tratamento adequado (Jain et al. 2011).

A ausência de uma compreensão clara das origens entre as condições psíquicas e o diabetes sugere um desafio na identificação de uma abordagem terapêutica universalmente eficaz. Algumas pesquisas apresentaram resultados divergentes em relação à efetividade dos antidepressivos na promoção do controle glicêmico (Feltz-Cornelis et al., 2020). Ademais, estima-se que 20-40% dos pacientes com transtorno depressivo maior (TDM) não apresentam resposta clínica ao tratamento atual com antidepressivos (Touloumis, 2020).

2.4 MEDIADORES LIPÍDICOS PRÓ-RESOLUTIVOS

Em condições fisiológicas, a resolução efetiva da inflamação é controlada por mediadores específicos - lipídios que limitam a infiltração excessiva de leucócitos e sinais pró-inflamatórios. Esses processos são mediados pela família de mediadores lipídicos pró-resolução especializados (SPMs) (Brennan et al., 2021). A inflamação não resolvida, no entanto, é um dos principais impulsionadores de doenças inflamatórias crônicas, como o diabetes (de Gaetano et al., 2018). Os SPMs são

sintetizados a partir do ácido araquidônico e das moléculas de ácidos graxos do ômega-3, como os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA). Essa família abrange lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas. Estudos prévios já demonstraram que a administração de SPMs exógenos acelera a resolução da inflamação (Brennan et al., 2021). Nas últimas duas décadas foi comprovado que os SPMs agem na percepção da dor por meio de uma interação com outros mecanismos de transdução de sinal, controlando a liberação de respostas imunes e citocinas; ativação de canais TRP; e interagindo com a sinalização de opioides (Leuti et al., 2021).

As maresinas (MaR) são mediadores anti-inflamatórios que apresentam um efeito protetivo importante na inflamação, estresse oxidativo e doenças imunes. A biossíntese das MaRs ocorre principalmente em macrófagos M2, sendo iniciada pela 12-Lipoxigenase (12-LOX), a partir da conversão do DHA (Freire e Dyke, 2013). Chiang et al. (2019) demonstrou que os efeitos pró-resolutivos da MaR1 estão relacionados à ativação do LGR6 (*Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 6*), no corpo celular do nociceptor e do terminal periférico, com consequente redução de atividade de TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*) (Li et al., 2020; Ji 2022). No entanto, o receptor GPCR (G Protein-Coupled Receptor) da MaR2 ainda não é bem elucidado, porém os estudos de Fattori et al. (2022) demonstraram que essa molécula é capaz de inibir a ativação de TRPV1 e TRPA1 (*Transient Receptor Potential Channel Ankyrin 1*) de forma indireta.

Dentre as principais ações da MaR estão a polarização e fagocitose de macrófagos M2, inibição de infiltração de neutrófilos e indução de geração de células T reguladoras (Li et al., 2020). Alguns estudos já demonstraram que a MaR1 foi capaz de inibir o aumento de íons cálcio induzidos pela capsaicina e CFA, assim como a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, em modelos animais de doenças inflamatórias (Allen et al., 2020; Fattori et al., 2019). Deng et al., 2014 demonstrou que tratamento intraperitoneal com MaR2 reduz o recrutamento de CD11b + Ly6G + neutrófilos para a cavidade peritoneal em um modelo de camundongo de peritonite. Além disso, corroborado pelos próprios estudos de Fattori, a inibição de receptores associados à hipersensibilidade inflamatória, poderia contribuir para a atenuação da nocicepção de doenças inflamatórias crônicas. Entretanto, poucos estudos demonstram efeitos analgésicos da MaR2, em comparação com a MaR1, que já apresenta alguns resultados conhecidos (Fattori et al., 2022).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação, com água e ração disponíveis e todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Uso de Animais (CEUA) sob o número 1108.

3.2 DROGAS

Foram utilizados no estudo a Estreptozotocina (STZ; Santa Cruz Biotechnology Inc., Califórnia, EUA), citrato de sódio (Merck S.A. Indústrias Farmacêuticas, São Paulo, Brasil) e Maresina 2 (MaR2; Cayman Chemical, Michigan, EUA). A STZ (60 mg/kg) foi previamente dissolvida em tampão citrato (10 mM, pH 4,5), MaR2 (1ng, 3ng ou 10ng/rato 200 µL, diluído em solução salina estéril- 0,9% NaCl).

3.3 INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL

Após um jejum de 12 horas durante o período da noite, foi realizada a administração de STZ (60 mg/Kg, intraperitoneal; diluído em tampão citrato, 10 mM, pH 4,5) para a indução de diabetes nos animais. A confirmação do diabetes foi realizada três dias após a injeção de STZ, por meio da aplicação de um pequeno volume de sangue periférico colhido da cauda dos animais em fitas teste impregnadas de glicose oxidase (Accu-CheckActive™, Roche). Foram considerados diabéticos e mantidos nos experimentos os animais cuja glicemia foi igual ou maior que 250 mg/dL. Os grupos controles normoglicêmicos também foram conduzidos e receberam somente tampão citrato (10 mM, pH 4,5, volume equivalente).

3.4 TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO

Neste teste, os animais são posicionados em pequenas caixas de acrílico, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5mm², constituída de arame não

maleável de 1 mm. A alodinia mecânica foi avaliada a partir da aplicação de pressão sobre a pata do animal por um analgesímetro eletrônico (Insight Equipamentos, Pesquisa e Ensino, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). O aparelho possui um transdutor de força conectado a um contador que irá expressar a força em gramas (g). O contato do transdutor de força com a pata é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados para ambientação nas caixas de acrílico durante 15 minutos ou até apresentarem redução da mobilidade. O estímulo cessa quando o animal possui uma resposta de retirada de pata, sendo o limiar mecânico de retirada quantificado pela média aritmética de três medições em cada uma das patas traseiras do animal, em intervalos de 1 minuto (Vivancos et al, 2004). A intensidade de alodinia mecânica foi quantificada pela redução do limiar mecânico, após aferições antes e depois da indução do diabetes ou antes e depois dos tratamentos com MaR2.

3.5 TESTE DE CAMPO ABERTO

O teste de campo aberto avalia principalmente o comportamento exploratório e os comportamentos relacionados à ansiedade, no animal. O aparato do teste consiste em uma caixa de madeira com medidas de 40 x 50 x 63 cm, onde o fundo é dividido em 9 quadrantes idênticos. Os ratos são colocados inicialmente no quadrante central e seu comportamento exploratório será baseado no número de cruzamentos realizados com as quatro patas de cada animal. Depois de 5 minutos os animais foram retirados e o aparato foi limpo com álcool 70% para a alocação do próximo animal. Ao fim dos experimentos o número de cruzamentos realizados por cada animal foi avaliado, sendo um indicador importante de atividade locomotora. Além disso, foram avaliados parâmetros como *rearings* e cruzamentos. O aumento do tempo gasto na parte central ou diminuição da latência para entrar no quadrante central são comportamentos do tipo ansiolítico (Prut and Belzung 2003).

3.6 TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Esse é o principal teste para avaliação de comportamento do tipo ansioso em roedores. O labirinto utilizado é feito de madeira pintada com verniz escuro e posicionado a 50 cm acima do solo. O equipamento possui dois braços abertos e dois

fechados se intercalando de maneira a formar uma cruz. Cada braço possui medidas de 10 x 50 cm, sendo a área central uma região aberta de 10 x 10 cm. O teste foi realizado em uma iluminação de 40 lux, onde os animais foram colocados individualmente no campo central com o corpo virado para o braço fechado. Durante 5 minutos o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados foi quantificado, bem como a quantidade de *head-dippings* desprotegidos e totais. A entrada nos braços foi considerada quando o animal tiver a passagem de suas quatro patas no braço. Um efeito do tipo ansiolítico deve provocar um aumento da proporção de entradas e o tempo gasto nos braços abertos (Himanshu et al., 2020).

3.7 TESTE DE NADO FORÇADO

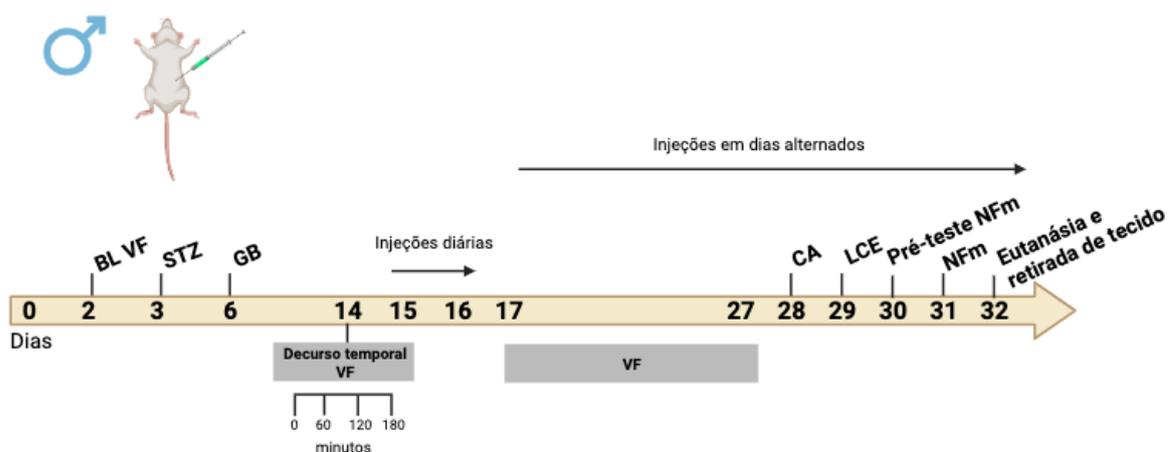
Desenvolvido por Porsolt e colaboradores (1977), o teste de nado forçado tem como principal objetivo avaliar o comportamento do tipo depressivo em roedores. O teste é conduzido em duas sessões. No pré-teste os animais foram colocados em cilindros de PVC de 20 x 50 cm contendo aproximadamente 30 cm de água a uma temperatura de 24°C, durante 15 minutos. 24 horas após, na sessão teste, os ratos foram novamente submetidos ao nado, durante 5 minutos, onde seus comportamentos foram gravados e avaliados. Entre as sessões a água foi trocada para evitar interferências no comportamento dos animais. Tendo em vista que esse teste foi modificado, parâmetros como imobilidade, nado e escalada, foram avaliados.

3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram retirados do biotério da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e colocados para ambientação durante dois dias no biotério do laboratório 202 de Farmacologia da Dor, localizada no departamento de Farmacologia da UFPR. No terceiro dia os animais foram submetidos a uma avaliação do limiar mecânico basal através do teste de Von Frey Eletrônico e posteriormente colocados de jejum durante 12 horas. O diabetes experimental foi induzido através da indução intraperitoneal de STZ 60mg/kg, e o grupo controle recebeu apenas o veículo (tampão citrato). A diabetização foi confirmada 3 dias depois, em que foi avaliada a glicemia dos animais (animais com glicemia abaixo de 250 mg/dl foram excluídos do estudo). No 13º dia após a administração de STZ, foi realizado novamente um basal do limiar mecânico

para avaliar o estabelecimento da alodinia mecânica. Animais diabéticos (DBT) foram distribuídos randomicamente em diferentes grupos para a realização dos seguintes tratamentos: DBT- tratados com veículo (VEI) e MaR2 (1, 3 ou 10ng/rato), intraperitonealmente. O tratamento foi iniciado no 14º dia com avaliação do efeito agudo da MaR2, através de um decurso temporal, e foram realizadas as medidas de alodinia nos tempos de 60, 120 e 180 min após os tratamentos citados. Os tratamentos foram continuados durante dois dias e após isso, em dias alternados com avaliação diária do teste de Von Frey Eletrônico de forma a estudar o efeito cumulativo do tratamento sobre a alodinia mecânica. O teste de Von Frey Eletrônico era realizado sempre antes do tratamento. O experimentador era cego ao tratamento, mas não a condição diabética. Nos dias 28 a 31 foram realizados os testes de comportamento incluindo campo aberto, labirinto em cruz elevado, pré-teste do nado forçado e nado forçado, respectivamente, nessa ordem. No 32º dia os animais tiveram sua glicemia avaliada novamente e foi realizada a eutanásia dos animais, em que foram coletadas amostras e córtex, hipocampo e medula para avaliação das citocinas a posteriori. O desenho experimental resumido pode ser visualizado na figura 1. Para a observação dos resultados foram realizadas quatro rodadas de experimentos contendo as mesmas etapas.

FIGURA 1 - DESENHO EXPERIMENTAL



Nota: BL VF – Basal Von Frey; STZ – Estreptozotocina; GB – Glicose Basal; VF – Von Frey; CA – Campo Aberto; LCE – Labirinto em Cruz Elevado; NfM – Nado Forçado modificado.

FONTE: O autor (2023).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

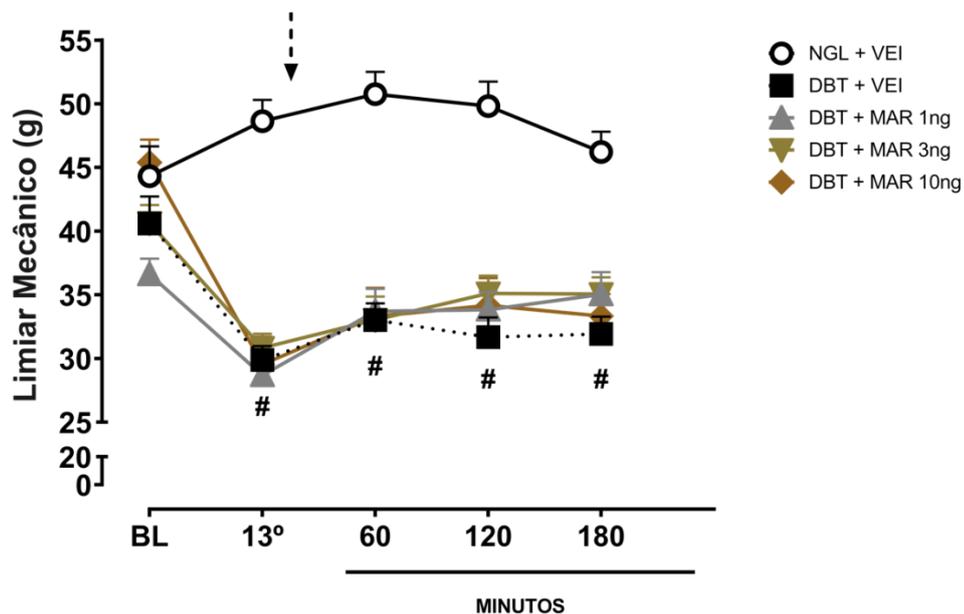
Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) para grupos de 10 animais (n=10). ANOVA de uma via e duas vias seguida pelo teste post hoc de Bonferroni foi usado para determinar as diferenças entre os grupos experimentais e o teste t de Student quando uma comparação foi feita entre 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).

4 RESULTADOS

4.1 MAR2 NÃO ATENUA ALODINIA MECÂNICA QUANDO ADMINISTRADA AGUDAMENTE NO TESTE ELETRÔNICO DE VON FREY

Como mostrado na figura 2 quando comparado ao grupo controle normoglicêmico (NGL-VEI), todos os grupos diabéticos (grupos DBT) apresentam uma diminuição significativa em seu limiar mecânico. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença entre grupos [F (4, 45) = 32,11; $p < 0,0001$], e no tempo [F (4, 180) = 19,84 $p < 0,0001$]. A análise de post-hoc não demonstrou diferenças nos grupos diabéticos tratados com MaR2, quando comparados ao grupo DBT-VEI. Esses resultados sugerem que, ratos diabéticos desenvolvem alodinia mecânica após 13^o dias de indução do diabetes experimental, contudo, o tratamento agudo de MaR2 não demonstra um efeito antinociceptivo.

FIGURA 2 - EFEITO AGUDO DA MaR 2 SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICOS



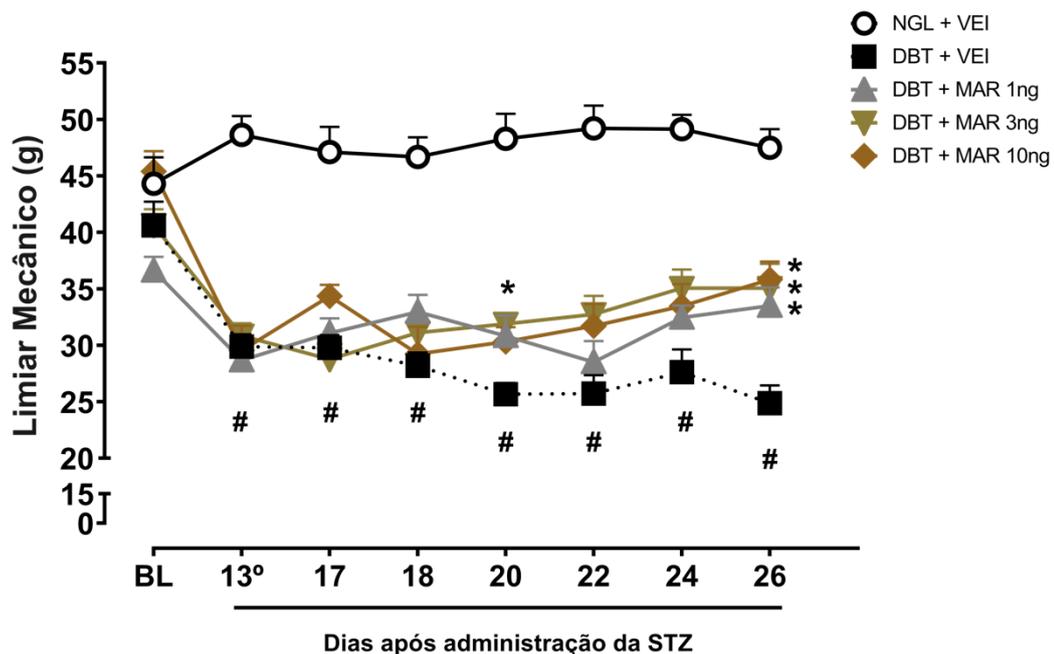
NOTA: Na figura se indica a linha temporal desde o VF basal até o fim do decurso temporal, a flecha indica o tratamento. Efeito do tratamento com MaR2 (1, 3 e 10 ng/rato; i.p.) ou VEI (200 μ L NaCl/rato; i.p.) no decurso temporal para o limiar mecânico em grupos de ratos diabéticos (DBT) ou normoglicêmicos (NGL). Os animais foram avaliados no teste eletrônico de von Frey para o efeito anti-alodínico da MaR2. BL – Baseline; NGL – Normoglicêmico; DBT – Diabético; Flecha – Indica o momento do tratamento agudo. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10). # $p < 0,05$ 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)

4.2 MAR2 DEMONSTROU UM EFEITO ANTINOCICEPTIVO CUMULATIVO NO TESTE ELETRÔNICO DE VON FREY

Na figura 3 é possível observar que os ratos diabéticos apresentaram uma redução significativa no limiar mecânico em comparação ao grupo normoglicêmico, iniciada no 13º dia e persistindo até o 26º dia após a indução do diabetes. A análise de ANOVA de duas vias confirmou diferenças entre os grupos [$F(4, 45) = 62,53$; $p < 0,0001$], e no tempo [$F(5,491, 247,1) = 17,34$; $p < 0,0001$]. A análise de post hoc indicou que todos os grupos diabéticos tratado com MaR2 (1, 3 e 10ng) apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo DBT-VEI no 26º dia após a indução do diabetes ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem um efeito antinociceptivo cumulativo na administração de todas as doses de Maresina 2.

FIGURA 3 - EFEITO CUMULATIVO DA MaR2 SOBRE O LIMIAR MECÂNICO DE RATOS DIABÉTICO



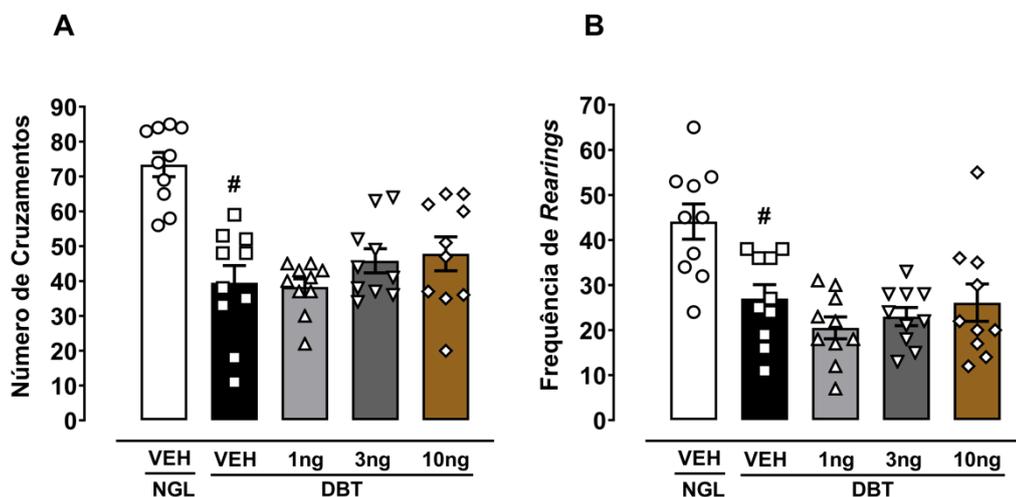
NOTA: Efeito do tratamento com MaR2 (1, 3 e 10 ng/rato; i.p.) ou VEI (200µL NaCl/rato; i.p.) para o limiar mecânico em grupos de ratos diabéticos (DBT) ou normoglicêmicos (NGL). Os animais foram avaliados no teste eletrônico de von Frey para o efeito anti-alodínico de MaR2. BL – Baseline; STZ – Estreptozotocina; NGL – Normoglicêmico; DBT – Diabético. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10). # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DBT-VEI. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste posthoc de Bonferroni.

FONTE: O autor (2023)

4.3 O TRATAMENTO COM MAR2 NÃO ALTERA O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO NO TESTE DE CAMPO ABERTO

Como observado na figura 4, 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=5,606, df=18; p<0,05], como na frequência de *rearings* totais [t=3,428, df=18; p<0,05]. Quando comparados os grupos diabéticos, o teste de ANOVA de uma via não revelou diferenças significativas entre os grupos tratados com MaR2 no número de cruzamentos da arena e na quantidade de *rearings*. Dessa forma, os resultados sugerem que a indução do diabetes experimental notavelmente reduz o comportamento exploratório, comprometendo a atividade locomotora dos animais. Por sua vez, o tratamento com MaR2 não provocou alterações nos comportamentos do tipo exploratórios, de formas positivas e/ou negativas, sugerindo que seu efeito antinociceptivo não esteja associado a potenciais efeitos sedativos.

FIGURA 4 - EFEITO DA MaR2 SOBRE O COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO NO TESTE DE CAMPO ABERTO



NOTA: Efeito do tratamento com MaR2 (1, 3 e 10 ng/rato; i.p.) ou VEH (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 A) e frequência de *rearings* (painel B). VEH – Veículo; NGL – Normoglicêmico; DBT – Diabético. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10). #p<0,05 quando comparado ao grupo controle NGL, *p<0,05 quando comparado ao grupo DBT-VEH. ANOVA de uma via seguida de teste posthoc de Bonferroni.

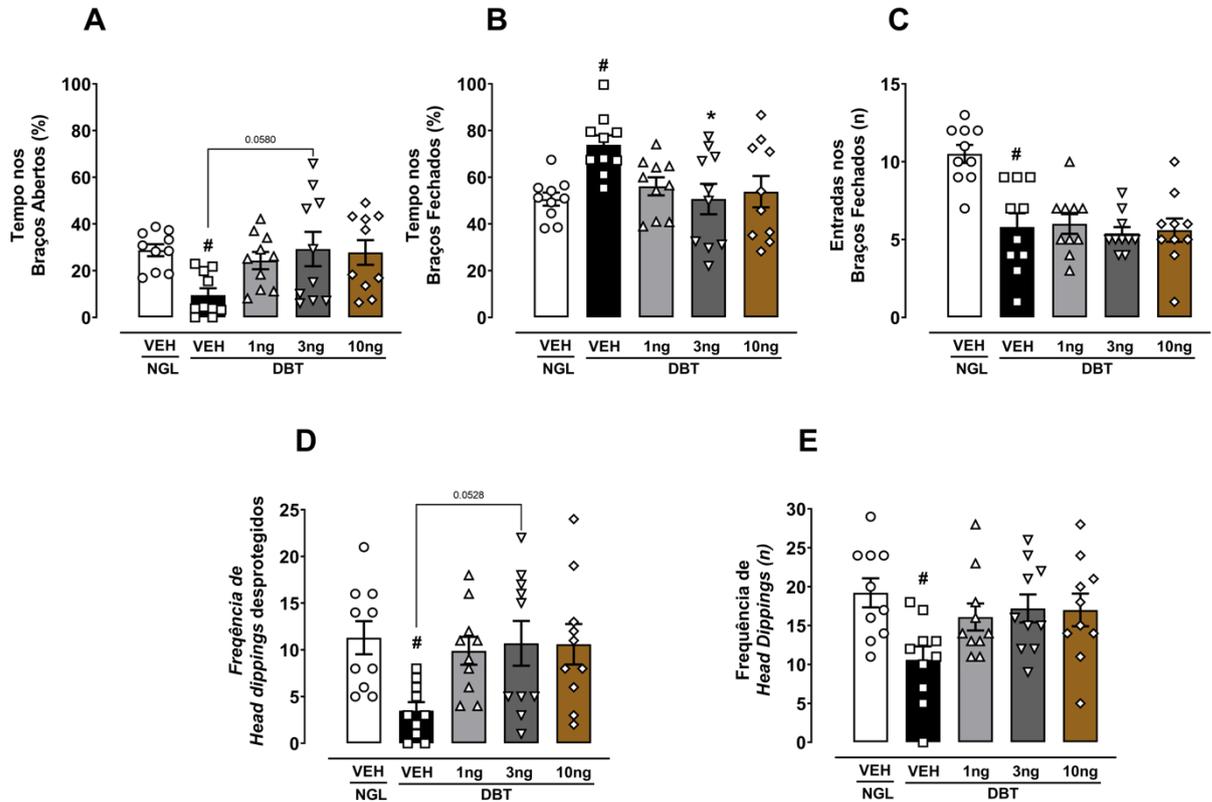
FONTE: O autor (2023)

4.4 MAR2 DIMINUI COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Como observado na figura 5, 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 [$t=4,921$, $df=18$; $p<0,05$], aumento na porcentagem de tempo gasto dos braços fechados [$t=4,732$, $df=18$; $p<0,05$], diminuição na frequência de entradas nos braços fechados [$t=4,413$, $df=18$; $p<0,05$], e diminuição na frequência de *head dippings* totais [$t=3,388$, $df=18$; $<0,0001$].

Quando comparado os grupos diabéticos, o teste de ANOVA de uma via revelou diferenças significativas quando avaliado a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos [$F(3, 36) = 5,102$; $p<0,05$], tempo gasto nos braços fechados [$F(3, 36) = 3,005$; $p<0,05$], na frequência de comportamento de *head dipping* desprotegido [$F(3, 36) = 0,3402$; $p<0,05$], mas não nos comportamentos de entrada nos braços fechados. A análise de post hoc demonstrou que o tratamento com MaR2, na dose de 3ng, provocou um aumento significativo na porcentagem de tempo gasto nos braços fechados, quando comparado ao grupo DBT+VEI ($p=0,0280$) e um resultado não significativo na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos ($p=0,058$), assim como um aumento na proporção de *head dippings* desprotegidos ($p=0,0528$). Embora o ANOVA tenha demonstrado um resultado significativo, a análise de Bonferroni não foi capaz de identificar a significância entre os grupos, porém demonstra uma tendência para a dose de 3ng. Dessa forma, os dados sugerem que os animais diabéticos, na quarta semana após a indução do diabetes, desenvolveram um comportamento do tipo ansioso, quando comparado ao grupo normoglicêmico. Quanto ao tratamento, os dados sugerem que a dose de 3ng de MaR2 foi capaz de exercer uma atividade ansiolítica, sem provocar efeitos sedativos no animal.

FIGURA 5 - EFEITO DA MaR2 SOBRE COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOSO NO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



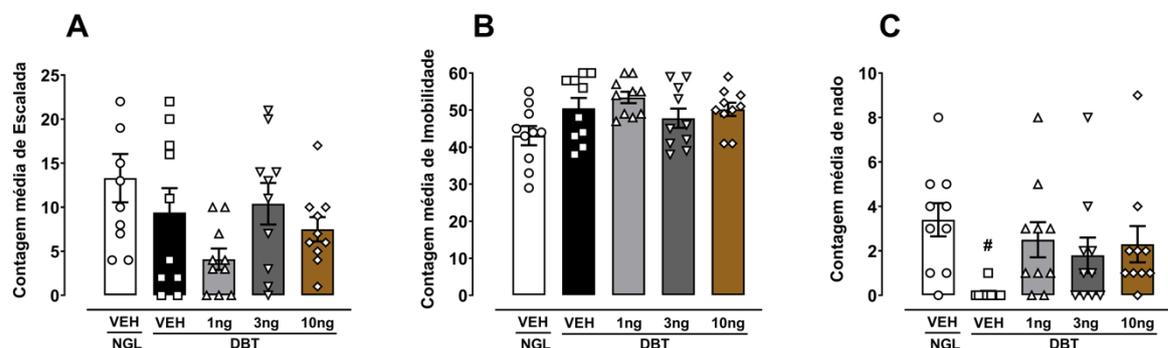
NOTA: Efeito do tratamento com MaR2 (1, 3 e 10ng/rato; i.p) ou VEI (200 μ L NaCl/rato; i.p.) no comportamento do tipo ansioso em grupos de ratos diabéticos ou NGL. Os animais foram avaliados no teste do labirinto em cruz elevado quanto à porcentagem de tempo gasto nos braços abertos e fechados, entradas nos braços fechados, frequência de *head dippings* desprotegidos e total (painéis A, B, C, D e E, respectivamente). NGL – Normoglicêmico; DBT – Diabético. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10). # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle NGL. Teste t. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DBT+VEI. ANOVA de uma via seguida do teste posthoc de Bonferroni.

FONTE: O autor (2023)

4.5 MAR2 NÃO FOI CAPAZ DE REDUZIR O COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO NO TESTE DE NADO FORÇADO MODIFICADO

De forma a avaliar o comportamento do tipo depressivo, os animais foram submetidos a uma sessão de teste nado forçado modificado durante 5 minutos. Como mostrado na figura 6, o teste t de student não demonstrou diferenças entre os grupos NGL e DBT, nas contagens médias de imobilidade, escalada. Quando avaliado o comportamento de nado, o teste t de student demonstrou uma diferença significativa [$t=4,371$, $df=18$; $p<0,05$]. Quando comparado os grupos diabéticos, o ANOVA de uma via também não revelou nenhuma diferença nas contagens médias de comportamentos de imobilidade, escalada e natação. Esses resultados sugerem de forma intrigante que os animais diabéticos, quando comparados aos normoglicêmicos, não apresentam de maneira significativa o comportamento do tipo depressivo.

FIGURA 6 - EFEITO DA MaR2 SOBRE COMPORTAMENTO DO TIPO-DEPRESSIVO NO TESTE MODIFICADO DE NADO FORÇADO



Legenda: Efeito do tratamento com MaR2 (1, 3 e 10 e 30ng/rato; i.p) ou VEH (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. NGL – Normoglicêmico; DBT – Diabético. Todos os valores são expressos com média mais SEM (n=10). # $p<0,05$ quando comparado ao grupo controle NGL. Teste t de student. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo DBT+VEH. ANOVA de uma via seguida do teste posthoc de Bonferroni.

FONTE: O autor (2023)

4.6 O TRATAMENTO COM MAR2 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 [$t=54,89$, $df=2$; $p<0,05$] e ganho de peso [$t=7,112$, $df=18$; $p<0,001$] foram avaliados. No entanto, o tratamento com MaR2 não foi capaz de reverter estes parâmetros em animais com diabetes induzido por STZ.

TABELA 1 - EFEITO DA MaR2 SOBRE PESO E GLICEMIA DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR STZ

Condição/Tratamento	Glicemia (mg/dL)	Ganho de Peso (g)
NGL+VEI	120,1±5,800	114,0±8,450
DBT+VEI	481,1±3,100#	19,20±10,31#
DBT+MaR2 1ng	492,7±12,35	14,90±7,130
DBT+MaR2 3ng	520,8±31,45	7,800±6,931
DBT+MaR2 10ng	477,6±8,833	24,50±14,63

NOTA: Efeito do tratamento com MaR2 (1, 3 e 10 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)

5 DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi a demonstração do efeito cumulativo de administrações intercaladas de MaR2 na alodinia mecânica e no comportamento do tipo-ansioso em ratos com diabetes experimental induzido por STZ, sem prejudicar o comportamento locomotor.

O diabetes induzido por STZ é um modelo amplamente adotado para simular o diabetes tipo 1 e suas complicações correspondentes. Este modelo é capaz de replicar várias características essenciais da doença, como a ocorrência de hiperglicemia, redução no ganho de peso, sensibilidade à dor mecânica, aumento do apetite, diminuição na atividade locomotora e manifestações comportamentais do tipo-depressivo e ansioso, como amplamente documentado na literatura científica (Furman, 2021). Vale ressaltar que os ratos diabéticos consistentemente apresentam uma significativa diminuição em seu limiar mecânico aproximadamente duas semanas após a indução do diabetes, mantendo essa redução até a quarta semana, quando atingem o menor limiar mecânico registrado. Por sua vez, comportamentos com traços ansiosos se tornam mais proeminentes na quarta semana após a administração de STZ (de Moraes et al., 2014; da Silva Dias et al., 2016), onde são corroboradas não apenas por nossas próprias descobertas laboratoriais (Gonçalves et al., 2022; Gasparin et al., 2021; Chaves et al., 2021).

É válido mencionar, no entanto, que os traços depressivos observados no nosso experimento divergem dos resultados esperados e descritos na literatura. Todos os estudos avaliados para a execução desse projeto concluíram que a partir da quarta semana os animais DBT sofrem alterações comportamentais associadas à depressão. O resultado esperado é que esse grupo controle exiba um comportamento do tipo-depressivo mais pronunciado do que o grupo NGL, demonstrando um aumento na frequência de imobilidade e uma redução na frequência de escaladas e natação (Chaves et al., 2021; da Silva Dias et al., 2016; Waltrick et al., 2022), o que não foi observado nesse protocolo. O resultado intrigante poderia ser sugestivo de eventos aleatórios que garantiram certas variações individuais, visto que o erro padrão da média dos animais tratados com veículo se manteve alto, podendo não contribuir para a geração de resultados uniformes. Dessa forma, a não mimetização do comportamento do tipo-depressivo poderia estar associado a dispersão de dados de cada animal, podendo influenciar a interpretação dos resultados.

Quanto a atenuação da alodinia mecânica no modelo de STZ, a MaR2 apresentou um efeito antinociceptivo, o que é evidenciado por outros estudos de modelos de dor crônica. Esses resultados demonstraram que as MaR1 e 2 reduziram a atividade microglial, atenuando significativamente a alodinia e hiperalgesia mecânica, inclusive durante vários dias, em modelos de inflamação crônica (Gao et al., 2018; Teixeira-Santos et al., 2023; Lopes et al., 2023). O mecanismo da resolução da inflamação pela MaR2 é validado pela própria família de SPMs, que já demonstraram resultados efetivos em outros modelos de dor neuropática, apresentando um mesmo tipo de ação. A administração intratecal de Resolvina 1 e MaR1 reduziram significativamente a hipersensibilidade à dor mecânica e térmica, após lesão por constrição crônica no nervo ciático, através da regulação negativa de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Xu, Berta e Ji, 2012; Wei et al., 2022). O mesmo foi observado durante a administração de Protectina 1 no nervo ciático, evitando o desenvolvimento da alodinia mecânica (Xu et al., 2013). O tratamento com Lipoxina A4 também produziu reduções marcantes na dor mecânica, microgliose e citocinas pró-inflamatórias em modelos de hemisseção de medula espinhal (Martini et al., 2016; Ji, 2023).

No que diz respeito ao comportamento do tipo-ansioso, o tratamento com MaR2 é sugestivo de efeitos ansiolíticos, o que é corroborado pelos estudos de Leão e colaboradores em 2022, com a Resolvina D5, outro mediador lipídico pró resolutivo, em ratos diabéticos. Por sua vez, quanto ao comportamento do tipo depressivo a MaR2 não demonstrou efeitos atenuantes, sugerindo uma ausência do efeito antidepressivo.

É possível inferir que a não atenuação do comportamento do tipo-depressivo pela MaR2, portanto, pode estar muito mais relacionada a não manifestação do comportamento pelo grupo controle VEI, do que pela não atenuação do comportamento pelo SPM. Leão et al., 2022 já foi capaz de verificar a atenuação de comportamentos do tipo depressivo utilizando a Resolvina D5. Além disso, Shi et al., 2023, observou que a MaR1 melhorou os comportamentos do tipo-depressivo através da inibição de vias de sinalização de citocinas e modificação de expressão de genes do hipocampo, em modelos de dor induzida por lipopolissacarídeos em camundongos. Portanto, a repetição dos experimentos poderia ser uma alternativa viável para a visualização de novos resultados de atenuação do comportamento do tipo-depressivo.

6 CONCLUSÕES

Os resultados experimentais indicam que a indução do diabetes por STZ nos animais, é capaz de provocar aumento de sensibilidade à dor mecânica e comportamentos de natureza ansiosa, mas não demonstram sinais de comportamento depressivo. Além disso, observou-se que o tratamento com MaR2 foi eficaz em aumentar o limiar mecânico, sem afetar negativamente a atividade locomotora, e em reduzir o comportamento ansioso, mas não teve impacto sobre o comportamento depressivo. Portanto, são necessários estudos adicionais para aprofundar nossa compreensão dos mecanismos subjacentes aos efeitos antinociceptivos e ansiolíticos, bem como para esclarecer o desenvolvimento do comportamento depressivo. Ainda, a capacidade da MaR2 em reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF alfa, IL-1 e IL-6, será avaliada futuramente em amostras de tecido retiradas dos animais, como córtex, medula e hipocampo.

7 LIMITAÇÕES

Esse estudo possui algumas limitações. Primeiramente os experimentos in vivo foram realizados somente em ratos machos. Alguns estudos já demonstraram que a micróglia de machos e fêmeas desempenha papéis diferentes nas mudanças na resposta imune (Liu et al, 2019). Além disso, manter o tratamento por mais dias, alterar o protocolo de tratamento ou até mesmo realizar o tratamento com outras dosagens, poderia ser útil para a visualização de novos resultados. Por fim, ainda seria importante fazer a dosagem de citocinas, por método de ELISA, de forma a avaliar o papel da MaR2 no controle da inflamação.

REFERÊNCIAS

- Acharjee, Satarupa, et al. "Understanding Type 1 Diabetes: Etiology and Models." *Canadian Journal of Diabetes*, vol. 37, no. 4, Aug. 2013, pp. 269–276, <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2013.05.001>.
- Allen, Benjamin L, et al. "Imbalance of Proresolving Lipid Mediators in Persistent Allodynia Dissociated from Signs of Clinical Arthritis." *Pain*, vol. 161, no. 9, 4 May 2020, pp. 2155–2166, <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001908>. Accessed 13 Sept. 2023.
- American Diabetes Association. "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." *Diabetes Care*, vol. 32, no. Supplement_1, 31 Dec. 2008, pp. S62–S67, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2613584/, <https://doi.org/10.2337/dc09-s062>.
- Bădescu, S V, et al. "The Association between Diabetes Mellitus and Depression." *Journal of Medicine and Life*, vol. 9, no. 2, 2016, pp. 120–5, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4863499/.
- Baron, Ralf, et al. "Neuropathic Pain: Diagnosis, Pathophysiological Mechanisms, and Treatment." *The Lancet Neurology*, vol. 9, no. 8, Aug. 2010, pp. 807–819, [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(10\)70143-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70143-5).
- Beurel, Eléonore, et al. "The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble." *Neuron*, vol. 107, no. 2, June 2020, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.002>.
- Bluestone, Jeffrey A., et al. "Genetics, Pathogenesis and Clinical Interventions in Type 1 Diabetes." *Nature*, vol. 464, no. 7293, Apr. 2010, pp. 1293–1300, www.nature.com/articles/nature08933, <https://doi.org/10.1038/nature08933>. Accessed 28 Feb. 2019.
- Bönhof, Gidon J, et al. "Emerging Biomarkers, Tools, and Treatments for Diabetic Polyneuropathy." *Endocrine Reviews*, vol. 40, no. 1, 25 Sept. 2018, pp. 153–192, <https://doi.org/10.1210/er.2018-00107>.
- Bouhassira, D. "Neuropathic Pain: Definition, Assessment and Epidemiology." *Revue Neurologique*, vol. 175, no. 1-2, Jan. 2019, pp. 16–25, www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035378718308105, <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.09.016>.
- Brennan, Eoin, et al. "Pro-Resolving Lipid Mediators: Regulators of Inflammation, Metabolism and Kidney Function." *Nature Reviews Nephrology*, vol. 17, no. 11, 19 July 2021, pp. 725–739, <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00454-y>. Accessed 26 Oct. 2021.

Buchberger, Barbara, et al. "Symptoms of Depression and Anxiety in Youth with Type 1 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Psychoneuroendocrinology*, vol. 70, Aug. 2016, pp. 70–84, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.04.019>.

Calcutt, Nigel A. "Diabetic Neuropathy and Neuropathic Pain: A (Con)Fusion of Pathogenic Mechanisms?" *Pain*, vol. 161, no. Supplement 1, Sept. 2020, pp. S65–S86, <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001922>.

Cavalli, Eugenio, et al. "The Neuropathic Pain: An Overview of the Current Treatment and Future Therapeutic Approaches." *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, vol. 33, no. 33, Jan. 2019, p. 205873841983838, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6431761/, <https://doi.org/10.1177/2058738419838383>.

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, Nan, et al. "Maresin 1 Activates LGR6 Receptor Promoting Phagocyte Immunoresolvent Functions." *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 129, no. 12, 2 Dec. 2019, pp. 5294–5311, www.jci.org/articles/view/129448#SEC3, <https://doi.org/10.1172/JCI129448>. Accessed 16 Jan. 2022.

Craske, Michelle G, and Murray B Stein. "Anxiety." *The Lancet*, vol. 388, no. 10063, Dec. 2016, pp. 3048–3059, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30381-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30381-6).

Dantzer, Cécile, et al. "Anxiety and Depression in Juvenile Diabetes: A Critical Review." *Clinical Psychology Review*, vol. 23, no. 6, Nov. 2003, pp. 787–800, [https://doi.org/10.1016/s0272-7358\(03\)00069-2](https://doi.org/10.1016/s0272-7358(03)00069-2).

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>

Dean, Erin. "Anxiety." *Nursing Standard*, vol. 30, no. 46, 13 July 2016, pp. 15–15, journals.rcni.com/doi/full/10.7748/ns.30.46.15.s17, <https://doi.org/10.7748/ns.30.46.15.s17>.

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>

de Gaetano, Monica, et al. "Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators: Modulation of Diabetes-Associated Cardio-, Reno-, and Retino-Vascular Complications." *Frontiers in Pharmacology*, vol. 9, 19 Dec. 2018, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01488>.

Fang, Xiao-Xia, et al. "Neuroinflammation Involved in Diabetes-Related Pain and Itch." *Frontiers in Pharmacology*, vol. 13, 20 June 2022, <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.921612>. Accessed 16 Nov. 2023.

Fattori, Victor, et al. "The Specialised Pro-Resolving Lipid Mediator Maresin 1 Reduces Inflammatory Pain with a Long-Lasting Analgesic Effect." *British Journal of Pharmacology*, vol. 176, no. 11, 1 June 2019, pp. 1728–1744, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30830967/, <https://doi.org/10.1111/bph.14647>. Accessed 25 Apr. 2023.

Fattori, Victor, et al. "Maresin 2 Is an Analgesic Specialized Pro-Resolution Lipid Mediator in Mice by Inhibiting Neutrophil and Monocyte Recruitment, Nociceptor Neuron TRPV1 and TRPA1 Activation, and CGRP Release." *Neuropharmacology*, vol. 216, 1 Sept. 2022, pp. 109189–109189, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.109189>. Accessed 9 Sept. 2023.

Feldman, Eva L., et al. "New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain." *Neuron*, vol. 93, no. 6, Mar. 2017, pp. 1296–1313, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.005>. Feldman, Eva L., et al. "Diabetic Neuropathy." *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 5, no. 1, 13 June 2019, www.nature.com/articles/s41572-019-0092-1, <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1>.

Finnerup, Nanna Brix, et al. "Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment." *Physiological Reviews*, vol. 101, no. 1, 1 Jan. 2021, pp. 259–301, journals.physiology.org/doi/full/10.1152/physrev.00045.2019, <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2019>.

Fischer, Tanya Z., and Stephen G. Waxman. "Neuropathic Pain in Diabetes--Evidence for a Central Mechanism." *Nature Reviews. Neurology*, vol. 6, no. 8, 1 Aug. 2010, pp. 462–466, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20625378/, <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.90>. Accessed 16 Sept. 2021.

Freire, Marcelo O., and Thomas E. Van Dyke. "Natural Resolution of Inflammation." *Periodontology 2000*, vol. 63, no. 1, 11 Aug. 2013, pp. 149–164, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4022040/, <https://doi.org/10.1111/prd.12034>.

Gao, Jie, et al. "Pro-Resolving Mediator Maresin 1 Ameliorates Pain Hypersensitivity in a Rat Spinal Nerve Ligation Model of Neuropathic Pain." *Journal of Pain Research*, vol. Volume 11, 10 Aug. 2018, pp. 1511–1519, <https://doi.org/10.2147/jpr.s160779>. Accessed 1 May 2023.

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 22

hemoglobin. *Brain Research*, 1767.
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2021.147557>

GLOBAL REPORT on DIABETES. 2016.

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>

Greene, D. A., et al. “Complications: Neuropathy, Pathogenetic Considerations.” *Diabetes Care*, vol. 15, no. 12, 1 Dec. 1992, pp. 1902–1925, <https://doi.org/10.2337/diacare.15.12.1902>.

Himanshu, et al. “A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-Anxiety Effects.” *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, vol. 18, no. 3, 31 Aug. 2020, pp. 341–351, <https://doi.org/10.9758/cpn.2020.18.3.341>.

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 10th Edition*. 2021.

Jackson, Kenneth C. “Pharmacotherapy for Neuropathic Pain.” *Pain Practice*, vol. 6, no. 1, Mar. 2006, pp. 27–33, <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2006.00055.x>. Accessed 12 Nov. 2020.

Jain, Rakesh, et al. “Painful Diabetic Neuropathy Is More than Pain Alone: Examining the Role of Anxiety and Depression as Mediators and Complicators.” *Current Diabetes Reports*, vol. 11, no. 4, 25 May 2011, pp. 275–284, <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0202-2>. Accessed 22 Oct. 2021.

Jensen, Troels S, et al. “Painful and Non-Painful Diabetic Neuropathy, Diagnostic Challenges and Implications for Future Management.” *Brain*, vol. 144, no. 6, 12 Mar. 2021, pp. 1632–1645, <https://doi.org/10.1093/brain/awab079>.

Ji RR. Specialized Pro-Resolving Mediators as Resolution Pharmacology for the Control of Pain and Itch. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2023 Jan 20;63:273-293. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-051921-084047.

Ji, Ru-Rong, et al. “Emerging Targets in Neuroinflammation-Driven Chronic Pain.” *Nature Reviews. Drug Discovery*, vol. 13, no. 7, 1 July 2014, pp. 533–548, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24948120/, https://doi.org/10.1038/nrd4334](https://doi.org/10.1038/nrd4334).

Kiguchi, Norikazu, et al. “Chemokines and Cytokines in Neuroinflammation Leading to Neuropathic Pain.” *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 12, no. 1, Feb. 2012, pp. 55–61, <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.10.007>. Accessed 30 Oct. 2020.

Kumar Tripathi, Brajendra, and Arvind Srivastava. *Diabetes Mellitus: Complications and Therapeutics Word Count*. 2006. Leão, F. F., Waltrick, A. P. F., Verri, W. A., da Cunha, J. M., & Zanolini, J. M. (2022).

Leão, Felipe Fagundes, et al. "Resolvin D5 Disrupts Anxious- and Depressive-like Behaviors in a Type 1 Diabetes Mellitus Animal Model." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol. 395, no. 10, 19 July 2022, pp. 1269–1282, <https://doi.org/10.1007/s00210-022-02274-8>. Accessed 17 Sept. 2022.

Leuti, Alessandro, et al. "Role of Specialized Pro-Resolving Mediators in Neuropathic Pain." *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12, 11 Aug. 2021, <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.717993>. Accessed 26 Oct. 2021

Li, QF, et al. "Maresins: Anti-Inflammatory Pro-Resolving Mediators with Therapeutic Potential." *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*, 1 July 2020. Accessed 9 Sept. 2023.

Liu, Lin-Lin, et al. "Sex Differences in Depressive-like Behaviour May Relate to Imbalance of Microglia Activation in the Hippocampus." *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 81, Oct. 2019, pp. 188–197, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.012>. Accessed 7 Apr. 2023.

Luísa Teixeira-Santos, et al. "The Pro-Resolving Lipid Mediator Maresin 1 Ameliorates Pain Responses and Neuroinflammation in the Spared Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain: A Study in Male and Female Mice." *PLOS ONE*, vol. 18, no. 6, 22 June 2023, pp. e0287392–e0287392, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287392>. Accessed 10 Sept. 2023.

Martini, Alessandra Cadete, et al. "Lipoxin A4 Inhibits Microglial Activation and Reduces Neuroinflammation and Neuropathic Pain after Spinal Cord Hemisection." *Journal of Neuroinflammation*, vol. 13, no. 1, 8 Apr. 2016, p. 75, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27059991/, <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0540-8>. Accessed 15 May 2023.

Motwani, Madhur P., et al. "Pro-Resolving Mediators Promote Resolution in a Human Skin Model of UV-Killed Escherichia Coli–Driven Acute Inflammation." *JCI Insight*, vol. 3, no. 6, 22 Mar. 2018, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94463>.

Oh, Jeeyoung. "Clinical Spectrum and Diagnosis of Diabetic Neuropathies." *The Korean Journal of Internal Medicine*, vol. 35, no. 5, 1 Sept. 2020, pp. 1059–1069, <https://doi.org/10.3904/kjim.2020.202>.

Porsolt, R. D., et al. "Depression: A New Animal Model Sensitive to Antidepressant Treatments." *Nature*, vol. 266, no. 5604, Apr. 1977, pp. 730–732, <https://doi.org/10.1038/266730a0>.

Pop-Busui, Rodica, et al. "Inflammation as a Therapeutic Target for Diabetic Neuropathies." *Current Diabetes Reports*, vol. 16, no. 3, 20 Feb. 2016, <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0727-5>.

"Professional Practice Committee: Standards of Medical Care in Diabetes—2021." *Diabetes Care*, vol. 44, no. Supplement 1, 9 Dec. 2020, pp. S3–S3, <https://doi.org/10.2337/dc21-sppc>.

Prut, Laetitia, and Catherine Belzung. "The Open Field as a Paradigm to Measure the Effects of Drugs on Anxiety-like Behaviors: A Review." *European Journal of Pharmacology*, vol. 463, no. 1-3, Feb. 2003, pp. 3–33, [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x).

R, Khanam, and Pillai Kk. "Effect of Chromium Picolinate on Modified Forced Swimming Test in Diabetic Rats: Involvement of Serotonergic Pathways and Potassium Channels." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, vol. 98, no. 2, 1 Feb. 2006, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16445588/, https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_288.x. Accessed 4 Jan. 2022.

Raphael Vieira Lopes, et al. "Maresin-2 Inhibits Inflammatory and Neuropathic Trigeminal Pain and Reduces Neuronal Activation in the Trigeminal Ganglion." *Current Research in Neurobiology*, vol. 4, 1 Jan. 2023, pp. 100093–100093, <https://doi.org/10.1016/j.crneur.2023.100093>. Accessed 13 Sept. 2023.

Rosenberger, Daniela C., et al. "Challenges of Neuropathic Pain: Focus on Diabetic Neuropathy." *Journal of Neural Transmission*, vol. 127, no. 4, 8 Feb. 2020, pp. 589–624, <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02145-7>.

Schmidt, Ann Marie. "Highlighting Diabetes Mellitus." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 38, no. 1, Jan. 2018, <https://doi.org/10.1161/atvbaha.117.310221>.

Shi, Lei, et al. "Maresin-1 Improves LPS-Induced Depressive-like Behavior by Inhibiting Hippocampal Microglial Activation." *Journal of Affective Disorders*, vol. 328, 1 May 2023, pp. 261–272, <https://doi.org/10.1016/j.jad.2023.02.016>. Accessed 18 Nov. 2023.

Touloumis, Charalampos. "The Burden and the Challenge of Treatment-Resistant Depression." *Psychiatriki*, vol. 32, no. Supplement 1, 20 Dec. 2021, pp. 11–14, <https://doi.org/10.22365/jpsych.2021.046>.

Van der Feltz-Cornelis, Christina, et al. "Treatment for Comorbid Depressive Disorder or Subthreshold Depression in Diabetes Mellitus: Systematic Review and Meta-Analysis." *Brain and Behavior*, vol. 11, no. 2, 4 Dec. 2020, <https://doi.org/10.1002/brb3.1981>.

Vinik, A. I., et al. "Diabetic Neuropathies." *Diabetes Care*, vol. 15, no. 12, 1 Dec. 1992, pp. 1926–1975, <https://doi.org/10.2337/diacare.15.12.1926>. Accessed 16 Oct. 2019. Vinik, Aaron I., et al. "Diabetic Neuropathy." *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 42, no. 4, 1 Dec. 2013, pp. 747–787, www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889852913000522?via%3Dihub, <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.06.001>.

Vivancos, G. G., et al. "An Electronic Pressure-Meter Nociception Paw Test for Rats." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas E Biologicas*, vol. 37, no. 3, 1 Mar. 2004, pp. 391–399, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15060709/, <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000300017>. Accessed 1 July 2022.

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, Kexin, et al. "The Association between Depression and Type 1 Diabetes Mellitus: Inflammatory Cytokines as Ferryman in Between?" *Mediators of Inflammation*, vol. 2019, 28 Mar. 2019, p. 2987901, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6458932/,
<https://doi.org/10.1155/2019/2987901>.

Wei, Jin, et al. "Maresin 1 Promotes Nerve Regeneration and Alleviates Neuropathic Pain after Nerve Injury." *Journal of Neuroinflammation*, vol. 19, no. 1, 2 Feb. 2022, <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02405-1>.

World Health Organization. "Anxiety Disorders." Disponível em: <www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/anxiety-disorders>. Acesso em: 27 Sept. 2023

World Health Organization. "Depression". Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>>. Acesso em: 17 nov. 2023.

World Health Organization. "Diabetes." Disponível em: <www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. Acesso em: 5 Apr. 2023

Xu, Zhen-Zhong, et al. "Neuroprotectin/Protectin D1 Protects against Neuropathic Pain in Mice after Nerve Trauma." *Annals of Neurology*, vol. 74, no. 3, Sept. 2013, pp. 490–495, <https://doi.org/10.1002/ana.23928>.

Xu ZZ, Berta T, Ji RR. Resolvin E1 inhibits neuropathic pain and spinal cord microglial activation following peripheral nerve injury. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013 Mar;8(1):37-41. doi: 10.1007/s11481-012-9394-8

Zilliox, Lindsay A. "Neuropathic Pain." *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, vol. 23, no. 2, Apr. 2017, pp. 512–532, <https://doi.org/10.1212/con.0000000000000462>.

ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA



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



Nº 1108

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: 23075.191638/2017-29

APROVADO/APPROVAL: 19/09/2017 – R.O. 08/2017

TÍTULO: Potencial terapêutico de lipídeos pró-resolução no controle da dor neuropática diabética.

TITLE: Therapeutic potential of pro-resolution lipids in the control of diabetic neuropathic pain.

AUTORES/AUTHORS: Joice Maria da Cunha, Daiany Darly Bello Redivo, Carlos Henrique Alves Jesus, Bruna Bittencourt Sotomaior.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA