

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Taís de Campos Lima

Avaliação morfológica e funcional do sistema sensorial
nociceptivo na prole de ratas com diabetes *mellitus*

Uberlândia

2013

Taís de Campos Lima

Avaliação morfológica e funcional do sistema sensorial nociceptivo na prole de ratas com diabetes *mellitus*

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-graduação em Biologia celular e estrutural aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Dr^a Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Uberlândia

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L732a

Lima, Taís de Campos, 1989-

2013

Avaliação morfológica e funcional do sistema sensorial nociceptivo na prole de ratas com diabetes *mellitus* / Taís de Campos Lima.

-- 2013.

62 f. : il.

Orientadora: Celina Monteiro da Cruz Lotufo..

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Diabetes - Teses. I. Lotufo, Celina Monteiro da Cruz. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que confiaram na minha capacidade de realiza-lo e que me apoiaram em todos os momentos, em especial os meus pais, meus irmãos e meu esposo. Dedico esse trabalho também a todos, que de alguma forma terão proveito no futuro dos resultados aqui colocados.

Agradecimentos

À Deus, pela vida e as infinitas oportunidades destinadas a ela.

Aos meus pais, Hermes e Solange, pelo inestimável legado: o estudo. Devo o que sou a vocês e faltam palavras para agradecer todo o apoio e incentivo que eu sempre recebo. Vocês me ensinaram que para realizar um sonho é preciso de dedicação e sacrifícios e é por isso que aqui estou eu, realizando mais um dos nossos sonhos.

Ao meu esposo Raphael, um dos responsáveis por esse trabalho existir, já que sempre me encorajou nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amor compartilhado, por acreditar em mim o tempo todo e estar sempre ao meu lado. Mesmo quando tudo pareceu tão difícil, você insistiu para que eu fosse em frente.

Aos meus irmãos Hermes, Guilherme e Rafael pelo apoio, compreensão, amizade e companheirismo. Obrigada a vocês que sempre estiveram comigo nos momentos mais difíceis desta caminhada compartilhando esse sonho.

À minha orientadora e amiga, Dr^a. Celina Monteiro da Cruz Lotufo, que desde o início, sem me conhecer, confiou a mim diversas responsabilidades, me guiando sempre para o melhor caminho, incentivando, orientando e apresentando as melhores opções. É a maior responsável pelo desenvolvimento desse trabalho e me orientou em todos os momentos, desde a pesquisa até o trabalho na bancada, passamos por tudo juntas. É um exemplo a ser seguido e sem dúvida foi que me inspirou a desenvolver pesquisa e aspirar sucesso na vida acadêmica.

À todos os meus amigos, em especial os queridos Daniel, Débora e Moline, companheiros sempre dispostos a me ajudar a trilhar o caminho que nós escolhemos. Estaremos sempre juntos.

Aos meus familiares pelas palavras de incentivo e orações, em especial os familiares de Uberlândia que participam desde o início da minha formação acadêmica.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Fisiologia, Comportamento e Microscopia por me auxiliarem, ajudarem e darem suporte em todas as fases desse estudo. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Aos docentes do Programa de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas pelos saberes que me foram transmitidos ao longo dessa caminhada.

A Capes pelo financiamento que permitiu o desenvolvimento desse projeto.

A Universidade Federal de Uberlândia, incluindo todos os colaboradores pela credibilidade, financiamento e contribuições feitas a esse projeto. Serei sempre grata a essa instituição na qual desde criança sempre sonhei em estudar, pois ela abriu todas as portas para o meu crescimento pessoal e profissional.

Enfim, obrigada a todos que de alguma forma fizeram parte da realização desse trabalho.

“Se, a princípio, a ideia não é absurda, então não há esperança para ela”.

(Albert Einstein)

Resumo

Campos-Lima, T.; Lotufo, C.M.C. Avaliação morfológica e funcional do sistema sensorial nociceptivo em prole de ratas com Diabetes *mellitus*. Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

O período de gestação representa um desafio para o controle glicêmico tanto de indivíduos diabéticos quanto de não diabéticos, que podem desenvolver o diabetes gestacional neste período. Além das complicações médicas que se evidenciam ao nascimento dos indivíduos filhos de mães diabéticas, uma série de estudos, em humanos e animais, vem indicando que estes indivíduos possuem também alterações crônicas que os predispõe a apresentarem patologias ao longo da vida. Embora não exista descrição de alterações no desenvolvimento do sistema nervoso periférico, um estudo realizado em ratos por Germani et al. (1999) mostrou que os níveis de RNAm para os fatores neurotróficos NGF e BDNF estão bastante reduzidos na prole de ratas diabéticas. Visto que estes fatores de crescimento são essenciais para o desenvolvimento do sistema sensorial periférico, o estudo tem como objetivo avaliar se a exposição do rato *in útero* ao diabetes materno induzido por aloxana altera o desenvolvimento do sistema sensorial nociceptivo periférico. A avaliação nos animais recém-nascidos foi feita em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal. A avaliação histológica de neurônios sensoriais primários de animais adultos foi realizada através de cortes congelados dos gânglios (L5). Para avaliar se existia alteração nos tipos de fibras sensoriais foi realizada uma análise morfométrica entre neurônios de pequeno (<30 μ m), médio (entre 30 e 40 μ m) e grande diâmetro (>40 μ m). Não foi detectada diferença no padrão de distribuição dos neurônios nos testes realizados em animais neonatos e adultos. Os subtipos de neurônios foram ainda categorizados de acordo com a marcação fluorescente: TRPV1(receptor vanilóide presente apenas em nociceptores), NFH (neurofilamento H presente em fibras de diâmetro grande), substância P (presente em neurônios nociceptivos peptidérgicos) e IB4 (nociceptivos não peptidérgicos). Nas culturas de ratos recém-nascidos, não foi observada diferença entre as proporções de neurônios que apresentaram marcação positiva para os diferentes marcadores testados. Os animais filhos de ratas diabéticas apresentaram uma menor proporção de neurônios grandes positivos para NFH ($P=0.0078$) e uma maior proporção de neurônios com marcação para substância P e isolectina B4 ($P=0.0291$ e $P=0.0353$, respectivamente). Foram realizados também testes comportamentais que revelaram uma menor sensibilidade mecânica dos animais filhos de mães diabéticas no teste de Von Frey eletrônico após 6 horas da injeção

de carragenina. Os animais filhos de ratas diabéticas apresentarem uma maior sensibilidade térmica em condições basais. No teste da formalina, foi observado que os animais tratados apresentam um aumento de resposta no início da segunda fase, que seria a fase inflamatória deste teste. Portanto, neste estudo foi verificado que as respostas nociceptivas estão alteradas em animais adultos filhos de ratas diabéticas e que estas alterações são acompanhadas por mudanças no perfil dos neurônios presentes no gânglio da raiz dorsal.

Palavras-chave: diabetes, gestação, dor, gânglio da raiz dorsal.

Abstract

Campos-Lima, T.; Lotufo, C.M.C. Morphological and functional evaluation of the nociceptive sensory system in the offspring of rats with diabetes mellitus. Federal University of Uberlândia. 2013.

Glycemic control during gestational period may be challenging for both diabetic and non-diabetic patients, who may develop gestational diabetes. A series of studies has been indicating that infants of diabetic mothers have also chronic changes that predispose them to diseases throughout life. Although there is no description of alterations in the development of peripheral sensory system, a study in rats by Germani et al. (1999) showed that the levels of mRNA for the neurotrophic factors NGF and BDNF are greatly reduced in the offspring of rats in which diabetes. Since these growth factors are essentials for the development of nociceptive neurons, the present study aims to evaluate if the exposure of rats in utero to maternal diabetes induced by alloxan alters the development of nociceptive peripheral system. The evaluation in newborn animals was done on primary cultures of dorsal root ganglia. Histological evaluation of primary sensory neurons in adult animals was performed using frozen sections of the dorsal root ganglia (L5). To assess the types of sensory fibers it was performed a morphometric analysis in order to categorize neurons according to soma diameters. Neurons were separated in small (<30 microns), medium (between 30 and 40 mm) and large soma (> 40 mm). There was no difference in the distribution of neurons by size in newborns or adults. The subtypes of neurons were also categorized according to the fluorescent labeling: TRPV1 (vanilloid receptor present only on nociceptors), NFH (H neurofilament present in large diameter fibers), substance P (present in peptidergic nociceptive neurons) and IB4 (non peptidergic nociceptive neurons). In the cultures of newborn rats, no difference was observed between the proportions of neurons that were marked positive for the selected molecules. Adult offspring of diabetic rats had a lower proportion of large neurons positive for NFH ($P = 0.0078$) and a higher proportion of positive neurons for substance P and isolectin B4 ($P = 0.0291$ and $P = 0.0353$, respectively). We also performed behavioral tests that showed a lower mechanical sensitivity (electronic Von Frey) of animals in offspring of diabetic mothers after 6 hours of intrapantar carrageenan injection. The offspring of diabetic rats showed an enhanced thermal sensitivity. In the formalin test, it was observed an increased response in the beginning of the second phase, which corresponds to the inflammatory phase of this test. Therefore, in this study it was found that nociceptive

responses are altered in adult offspring of diabetic rats and these changes are accompanied by changes in the profile of neurons present in the dorsal root ganglion.

Key words: diabetes, gestation, pain, dorsal root ganglia.

Lista de Figuras

Figura 1: Porcentagem de neurônios de pequeno (<30 μm), médio (entre 30 e 40 μm) e grande diâmetro (>40 μm) em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de animais recém-nascidos.....	36
Figura 2: Porcentagem de neurônios de pequeno (<30 μm), médio (entre 30 e 40 μm) e grande diâmetro (>40 μm) em cortes congelados de gânglios da raiz dorsal (L5) de animais adultos.....	36
Figura 3: Imagens de imunofluorescência de culturas primárias de gânglios da raiz dorsal obtidas de ratos recém-nascidos.....	38
Figura 4: Imagens de imunofluorescência de cortes congelados de gânglios da raiz dorsal obtidos de ratos adultos.....	39
Figura 5: Porcentagem de neurônios positivos para cada marcação fluorescente (NFH, VR1, IB4 e SP) em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de animais recém-nascidos.....	40
Figura 6: Porcentagem de neurônios positivos para cada marcação fluorescente (NFH, VR1, IB4 e SP) em cortes congelados de gânglios da raiz dorsal (L5) de animais adultos.....	41
Figura 7: Teste Von Frey eletrônico: avaliação da sensibilidade mecânica em patas de animais adultos.....	42
Figura 8: Teste da Placa Quente: avaliação da sensibilidade térmica em patas de animais adultos.....	43
Figura 9: Teste da Formalina: avaliação da nocicepção induzida por formalina (2,5%, i.pl) em patas de animais adultos.....	44
Figura 10: Teste da capsaicina: Efeito do diabetes materno sobre a nocicepção induzida por capsaicina.....	45

Lista de Abreviações

- ATP trifosfato de adenosina
- ANOVA análise de variância
- BDNF fator neurotrófico derivado do cérebro
- BSA albumina bovina sérica
- CGRP peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- DM diabetes mellitus
- DMEM meio de Eagle modificado por Dulbecc
- EUA Estados Unidos da América
- HEPES ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico
- IASP Associação Internacional para o Estudo da Dor
- IB4 isolectina B4
- IGF-1 fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
- IL interleucina
- IMC índice de massa corporal
- Na⁺ TTX-R canais de sódio tetrodoxina-resistentes
- NFH neurofilamento H
- NGF fator de crescimento neuronal
- PBS tampão fosfato-salino
- PFA paraformaldeído
- OMS Organização Mundial da Saúde
- RNA ácido ribonucleico
- SP substância P
- TrkA receptor com alta afinidade para neurotrofina e fator de crescimento neuronal
- TRPV1 receptor vanilóide de potencial transitório 1

Sumário

Introdução.....	16
2 Objetivos.....	18
2.1 Objetivos Gerais.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 Revisão e Atualização da Literatura.....	19
3.1 Diabetes mellitus.....	19
3.1.1 Definição e prevalência.....	19
3.1.2 Critérios Diagnósticos.....	19
3.1.3 Classificação dos tipos de diabetes <i>mellitus</i>	20
3.1.4 Efeitos crônicos do Diabetes <i>mellitus</i>	21
3.1.5 Neuropatia Diabética Periférica.....	22
3.1.6 Diabetes e gestação.....	24
3.2 Sistema Sensorial Nociceptivo.....	27
3.2.1 Dor: Visão Geral.....	27
3.2.2 Os neurônios nociceptivos primários.....	27
3.2.3 Gânglio da Raiz Dorsal.....	28
3.2.4 Transdução de sinais nociceptivos.....	28
3.2.5 Vias Nociceptivas.....	29
4 Material e Métodos.....	31
4.1 Animais.....	31
4.2 Indução de diabetes <i>mellitus</i> em ratas gestantes.....	31
4.3 Teste de pressão crescente: Von Frey eletrônico.....	31
4.4 Teste da Placa Quente.....	32
4.5 Teste da formalina.....	32
4.6 Teste da injeção intraplantar de capsaicina.....	33
4.7 Cultura primária de células dos gânglios da raiz dorsal.....	33
4.8 Obtenção de cortes congelados de gânglios da raiz dorsal de animais adultos.....	33
4.9 Imunofluorescência.....	34
4.10 Análise estatística.....	34
5 Resultados.....	35
5.1 Glicemia das mães diabéticas e de seus filhos.....	35

5.2 Imunofluorescência e avaliação morfométrica dos neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal de ratos neonatos e adultos.....	35
5.3 Avaliação da sensibilidade mecânica em patas de animais adultos.....	41
5.4 Avaliação da sensibilidade térmica em patas de animais adultos.....	42
5.5 Avaliação da nocicepção induzida por formalina nas patas de animais adultos...	43
5.6 Avaliação da nocicepção induzida por injeção de capsaicina em patas de animais adultos.....	44
6 Discussão.....	46
7 Conclusão.....	52
Referências Bibliográficas.....	53
Anexo – Certificado Comissão de Ética na Utilização de Animais.....	62

1 Introdução

A diabetes *mellitus* (DM) é definida como sendo um grupo de alterações genética e clinicamente heterogêneas que tem em comum a intolerância aos carboidratos.

O número de indivíduos diabéticos está aumentando devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, maior urbanização, crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como a maior sobrevida do paciente com DM. Em estudo publicado no ano de 2009 realizado em todas as capitais brasileiras e Distrito Federal a prevalência de diabetes auto referida foi de 5,3%, sendo que esta foi maior em mulheres, pessoas em idade mais avançada e mais bem nutridas e, a partir desses dados foi possível estimar que mais de 6 milhões de adultos no país apresentam a doença (SCHMIDT et al, 2009) .

Os efeitos do diabetes na gestação têm sido bastante investigados, devido às complicações observadas tanto na mãe como no conceito. Além das complicações médicas que se demonstram ao nascimento dos filhos de mães diabéticas, uma série de estudos, realizados em humanos e animais, vem indicando que estes indivíduos possuem também alterações que permanecem ou se desenvolvem ao longo da vida, inclusive um estudo de Germani e colaboradores em 1999 sugere possíveis alterações no sistema sensorial nociceptivo.

Dada a grande prevalência do diabetes *mellitus* é fundamental que se conheçam as possíveis alterações sofridas por indivíduos que nascem de mães que apresentaram diabetes durante a gestação para que estes tenham um tratamento adequado. Alterações no desenvolvimento do sistema somestésico possivelmente estão ocorrendo e não são diagnosticadas nestes indivíduos. Por exemplo, estes indivíduos podem apresentar maior incidência de dores crônicas ou neuropáticas que muitas vezes não tem a causa estabelecida. O sistema nociceptivo é especialmente importante e qualquer alteração, seja uma sensibilidade aumentada ou diminuída causa prejuízo na qualidade de vida.

A transmissão da nocicepção está associada à atividade elétrica de algumas fibras nervosas aferentes primárias. Estas fibras possuem terminações nervosas livres, denominadas nociceptores, presentes nos tecidos periféricos e vísceras, as quais são capazes de transduzir e codificar os estímulos nociceptivos (LOESER; TREEDE, 2008). Os nociceptores são normalmente ativados por estímulos de alta intensidade, tanto mecânicos, quanto térmicos ou químicos.

Assim, a nocicepção é muito importante para detectar estímulos que possivelmente geraram lesão tecidual (LOESER; TREEDE, 2008) e estão geralmente envolvidos com o

processo de dor, que além dessa experiência sensorial está relacionada a uma experiência emocional desagradável. Daí a grande importância de se estudar prováveis alterações que podem ocorrer no sistema sensorial nociceptivo de filhos de mães que tem diabetes no período da gestação.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se a exposição do rato *in útero* ao diabetes materno altera o desenvolvimento do sistema sensorial nociceptivo periférico.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar se ocorrem alterações nos tipos de fibras sensoriais presentes em ratos controle comparados aos ratos filhos de gestantes diabéticas. A população de neurônios foi comparada através da análise morfométrica das proporções de corpos neuronais de diâmetros pequenos, médios e grandes e por meio da técnica de imunofluorescência usando marcadores específicos para os diferentes subtipos de fibras.
- 2) Avaliar a sensibilidade mecânica nas patas de animais controle e filhos de ratas diabéticas comparando-se as respostas basais e a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina.
- 3) Avaliar a sensibilidade termina nas patas de animais controle e filhos de mães diabéticas.
- 4) Avaliar o efeito da exposição ao diabetes materno *in útero* em dois modelos de dor manifesta, teste da formalina e injeção intraplantar de capsaicina.

3 Revisão e Atualização da Literatura

3.1 Diabetes mellitus

3.1.1 Definição e prevalência

O diabetes *mellitus* é uma doença metabólica de causa múltipla. É caracterizada pela hiperglicemia crônica resultante de distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, em função de secreção insuficiente e/ou ausente de insulina, como também por defeitos da sua ação nos tecidos-alvo da insulina como o fígado, os tecidos musculares e tecido adiposo (LEBOWITZ, 1998).

O diabetes *mellitus* é considerado um problema de saúde universal, com proporções endêmicas e afeta pessoas de todos os países em diferentes estágios de desenvolvimento. Nas últimas décadas, devido ao aumento da expectativa de vida, sedentarismo, dietas hipercalóricas e obesidade, a sua importância vem crescendo muito (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013).

A prevalência desta doença vem aumentando exponencialmente em vários países, e prevê-se que, em 2030, 366 milhões de indivíduos sejam portadores de DM (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

No Brasil, em 2000, havia aproximadamente 4,5 milhões de indivíduos portadores de diabetes com previsão de que em 2030 essa doença atinja 11 milhões de indivíduos. O número estimado de pessoas com diabetes nas Américas é de 62,8 milhões em 2010 e é esperado um aumento de 45%, 91,1 milhões em 2030. Mais de 80% das mortes por diabetes ocorrem em países de baixa e média renda e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que óbitos por diabetes aumentem em dois terços em 2030 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

3.1.2 Critérios Diagnósticos

De acordo com a American Diabetes Association em 2008, existem três formas pelas quais é possível o diagnóstico de Diabetes *mellitus*: sintomas clássicos de diabetes *mellitus* mais concentração de glicose plasmática casual (a qualquer momento do dia desconsiderando o tempo da última refeição) ser maior ou igual a 200 mg/dl, glicose plasmática de jejum (pelo

menos 8 horas) ser maior ou igual a 126 mg/dl e glicose pós-sobrecarga de glicose (75g de glicose anidra dissolvida em água) ser maior ou igual a 200 mg/dl.

3.1.3 Classificação dos tipos de diabetes *mellitus*

Os tipos de diabetes, com base em sua etiologia, são: tipo 1, tipo 2, gestacional e outros tipos específicos de diabetes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2007).

Diabetes de tipo 1 (anteriormente conhecido como insulino-dependente, juvenil ou de início na infância) é caracterizada pela produção de insulina deficiente e requer a administração diária de insulina. A causa da diabetes de tipo 1 resulta primariamente da destruição das células β pancreáticas, de natureza auto-imune ou idiopática e não pode ser evitada com o conhecimento atual. Os sintomas incluem a excreção excessiva de urina (poliúria), sede (polidipsia), fome constante, perda de peso, alterações na visão e fadiga. Estes sintomas podem ocorrer repentinamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

A destruição autoimune apresenta predisposições genéticas e influência ambiental ainda pouco conhecida. Os marcadores imunológicos incluem auto anticorpos à insulina e também as células da ilhota pancreática. As pessoas portadoras de diabetes *mellitus* tipo 1 têm mais propensão a desenvolver outras doenças autoimunes, tais como a doença celíaca, doença de Addison, miastenia grave, tireoidite de Hashimoto, hepatite autoimune e anemia perniciosa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

O metabolismo celular de um diabético tipo 1 não-tratado é semelhante ao da pessoa em inanição. Como a insulina não está presente, para ajudar a entrada de glicose para as células corporais, a maioria dessas células usa os ácidos graxos para produzir ATP. O acúmulo dos produtos de degradação dos ácidos graxos (corpos cetônicos) produz a forma de acidose chamada cetoacidose, que abaixa o pH do sangue, podendo resultar em morte. A degradação dos triglicerídeos e das proteínas armazenados também leva à perda de peso. Conforme os lipídeos são transportados pelo sangue, de seus locais de armazenamento, para as células, partículas lipídicas são depositadas nas paredes dos vasos sanguíneos, causando aterosclerose e numerosos problemas cardiovasculares, incluindo a insuficiência cérebro-vascular, doença cardíaca isquêmica, doença vascular periférica e gangrena. Umas das principais complicações do diabetes é a perda da visão, devido a cataratas (a glicose em excesso se prende às proteínas do cristalino, causando opacificação) ou à lesão de vasos sanguíneos da retina e problemas renais graves que também podem resultar da lesão dos vasos sanguíneos renais (TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

Diabetes tipo 2 (anteriormente chamado de não insulino-dependente ou de início adulto) resulta de um processo de resistência do receptor de insulina, de forma que a atuação deste hormônio nas células alvo fica comprometida. A diabetes tipo 2 acomete cerca de 90% de pessoas com diabetes em todo o mundo, e é em grande parte resultado de excesso de peso e sedentarismo. Os sintomas podem ser semelhantes aos da diabetes do Tipo 1, mas são muitas vezes menos intensos. Como resultado, a doença pode ser diagnosticada vários anos após o início, uma vez que já tenham surgido complicações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Estudos demonstram que a obesidade generalizada favorece o risco de desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 por induzir resistência a insulina. Esse risco é diretamente associado ao aumento do Índice de Massa Corporal (IMC), um método de avaliação do estado nutricional de adultos e idosos a partir do peso e altura (MARINHO et al, 2012).

Muitas vezes algum medicamento é usado para estimular a secreção de insulina pelas células β do pâncreas. Embora alguns diabéticos do tipo 2 precisem de insulina, muitos conservam quantidade suficiente (ou até mesmo um excesso) de insulina no sangue. Com o agravamento da patologia, os níveis constantemente altos de glicose podem induzir alterações nas células β pancreáticas e a produção de insulina pode se tornar deficiente. É nesta situação que a maior parte dos pacientes com diabetes do tipo 2 passa a necessitar de tratamento com insulina (TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

O diabetes gestacional é a hiperglicemia com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez. Os sintomas do diabetes gestacional são semelhantes a diabetes tipo 2. O diabetes gestacional é mais frequentemente diagnosticado através de exames pré-natal, ao invés de sintomas relatados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Tolerância diminuída à glicose e glicemia em jejum diminuída são condições intermediárias na transição entre a normalidade e o diabetes. As pessoas com essas características têm risco elevado de progressão para diabetes tipo 2, embora este risco não seja inevitável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

3.1.4 Efeitos crônicos do Diabetes *mellitus*

A glicose é o principal substrato energético para as células e na falta dela as células degeneram. Por outro lado, o excesso de glicose no sangue é uma condição danosa para as células de todos os tecidos, pois quando está acima do limite necessário para a nutrição

celular, liga-se quimicamente e de forma irreversível às proteínas estruturais dos tecidos - glicação proteica não enzimática, alterando estrutura e função, afetando o bem-estar tecidual, levando à rigidez dos músculos e tendões, das articulações e das paredes vasculares. Fato que está relacionado à doença vascular e às deformidades ósseas (COTRAN et al.,1996).

A maior sobrevida de indivíduos diabéticos aumenta as chances de desenvolvimento das complicações crônicas da doença que estão associadas ao tempo de exposição à hiperglicemia. Tais complicações, como a macroangiopatia, retinopatia, nefropatia e neuropatias podem ser muito debilitantes ao indivíduo e são muito onerosas ao sistema de saúde. A doença cardiovascular é a primeira causa de mortalidade de indivíduos com diabetes do tipo 2; a retinopatia representa a principal causa de cegueira adquirida e a nefropatia uma das maiores responsáveis pelo ingresso a programas de diálise e transplante; o pé diabético se constitui em importante causa de amputações de membros inferiores. Assim, além dos prejuízos na qualidade de vida dos pacientes, procedimentos diagnósticos e terapêuticos (cateterismo, bypass coronariano, fotocoagulação retiniana, transplante renal e outros), hospitalizações, absenteísmo, invalidez e morte prematura elevam substancialmente os custos diretos e indiretos da assistência à saúde da população diabética (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013).

3.1.5 Neuropatia Diabética Periférica

A dor neuropática é um tipo de dor que começa devido a alguma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso. Essa dor surge como sintoma de um grupo heterogêneo de condições, incluindo neuropatia diabética, neuralgia trigeminal, neuralgia pós-herpética e lesão da coluna dorsal (CHONG et al., 2003).

O comprometimento do sistema nervoso periférico é, inquestionavelmente, uma das complicações mais frequentes do diabetes *mellitus*, presente em 50% dos pacientes. As neuropatias diabéticas são heterogêneas, com ampla variedade de sintomas e mecanismos subjacentes, comprometimento neurofisiopatológico, curso evolutivo e fatores de risco implicados, destacando-se a exposição crônica à hiperglicemia como o mais comum para o desenvolvimento e progressão da neuropatia diabética (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013).

A alta glicemia da diabetes *mellitus* causa aumento da concentração de glicose, sorbitol e frutose no nervo periférico, provocando um edema osmótico no nervo, diminuição na síntese de acetilcolina, decomposição das células de Schwann e da bainha de mielina. Tudo

isso ocasiona alterações na velocidade de condução e mudanças na condução aferente e eferente (PICKUP; WILLIAMS, 1991).

No caso das células nervosas, o transporte de glicose para o interior da célula não depende da ativação do receptor para insulina, o que causa acúmulo de glicose dentro da célula e uma série de reações metabólicas que produzem fatores tóxicos responsáveis pela degeneração celular. Existem outros mecanismos que estão envolvidos com a patogênese da neuropatia diabética como as alterações vasculares e hipóxia endoneurial, diminuição de fatores neurotróficos, estresse oxidativo e mecanismos imunológicos. Essa degeneração nervosa ocorre inicialmente em locais distais para depois afetar nervos proximais (YAGIHASHI, YAMAGISHI, WADA, 2007).

A neuropatia diabética pode ser dividida em duas categorias: a primeira inclui fenômenos de duração rápida e reversíveis com parestesias distais nos membros e velocidade de condução nervosa reduzida; a segunda categoria se caracteriza por problemas mais persistentes como nas neuropatias focais e multifocais (cranial, tóraco-abdominal, nos membros, neuropatia motora assimétrica proximal nos membros inferiores), neuropatias simétricas como polineuropatia autonômica/sensorial e neuropatia motora proximal ou distal dos membros inferiores. Alguns diabéticos podem apresentar formas mistas de apresentação das neuropatias diabéticas (PICKUP; WILLIAMS, 1991).

A neuropatia sensitiva aguda tem aparecimento agudo com sintomas sensitivos graves, como dor em queimação e alodínia e sem alterações motoras, pode ter início com episódio de instabilidade glicêmica e a melhora gradual dos sintomas ocorre com tratamento sintomático apropriado e controle da glicemia. A neuropatia crônica tem manifestações mais pronunciadas em membros inferiores. Os sintomas podem ser dolorosos (queimação, congelante, choque) ou não (formigamento, adormecimento e anestesia) e são constantes. Uma vez que não há restauração da função neuronal, o tratamento farmacológico baseia-se no controle dos sintomas dolorosos (SPRUCE et al, 2003; BOULTON, 2005).

Mononeuropatias são neuropatias focais, que ocorrem principalmente em adultos mais velhos. Seu início é geralmente agudo, associado a dor, e curam-se espontaneamente, normalmente dentro de 6-8 semanas. Estas são neuropatias causadas por obstrução vascular, tipicamente em alguns nervos cranianos, como o III, VI, e VII, mediano, ulnar, e peroneal. Mononeuropatias são diferentes de outras síndromes que começam devagar, progridem e persistem sem intervenção. Entre as neuropatias difusas, se destacam a neuropatia motora proximal, caracterizada por fraqueza e perda de massa muscular, além de perda axonal, desmielinização que pode levar até a paralização; e também se destaca a polineuropatia

crônica sensitivo-motora distal, que é a mais comum forma de neuropatia diabética. Ela pode ser tanto sensorial ou motora, e envolve pequenas fibras, fibras grandes, ou ambas (VINIK et al, 2008).

O início da neuropatia sensitivo-motora crônica é insidioso, e os sintomas menores iniciais podem passar despercebidos pelo paciente. O dano às fibras sensoriais grossas (prejuízo às fibras de maior diâmetro A α/β) produz diminuída sensação ao toque leve e posicional, os pacientes apresentam diminuída propriocepção e senso de posição, além de ausente ou reduzida sensação de vibração, enquanto o dano às fibras finas (prejuízo às fibras de menor diâmetro A δ e às não-mielinizadas C) produz uma sensação diminuída de dor e temperatura. O paciente pode se apresentar com trauma não-detectado das extremidades, sintomas de amortecimento ou sensação de pés frios, bem como vários tipos de dor espontânea (SCHIMID et al, 2003; WITZKE; VINIK, 2005).

O envolvimento autonômico pode ser responsável por sinais que afetam quase todos os sistemas, mas geralmente os sintomas são vagos e permanecem não-reconhecidos por algum tempo. Contudo, a neuropatia autonômica grave pode se apresentar com uma variável combinação de hipotensão postural, diarreia noturna, problemas gástricos, sintomas urinários, sudorese anormal, impotência (em homens) e dificuldade de reconhecer a hipoglicemias. A maioria dos pacientes com neuropatia autonômica grave sintomática também tem avançada nefropatia, retinopatia e neuropatia somática (SCHIMID et al, 2003).

3.1.6 Diabetes e gestação

O DM gestacional ocorre em 1% a 14% de todas as gestações, dependendo da população estudada e está associado ao aumento da morbidade e mortalidade perinatal. Resulta de qualquer intolerância a glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação, não se excluindo, portanto, a possibilidade de a doença existir antes da gravidez (BRASIL, 2006; PEDROSA; MACEDO; RIBEIRO, 2006). Na maioria dos casos, há reversão para a tolerância normal a glicose após a gravidez, porém existe um risco de 17% a 63% de desenvolvimento de diabetes tipo 2 dentro de 5 a 16 anos após o parto (HANNA; PETERS, 2002).

A diabetes gestacional é definida como um agravamento da intolerância a carboidratos no período da gravidez (ARTAL, 2003). A prevalência de diabetes *mellitus* gestacional é em média de 10% e ocorre em cerca de 90% das gestações de mães com intolerância a glicose (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). Durante o período de gestação ocorre um

aumento da resistência à insulina, devido à interferência de hormônios que são produzidos pela placenta que servem para garantir um suprimento adequado de nutrientes para o feto em desenvolvimento (BEN-HAROUSH et al., 2004). Esta resistência insulínica, juntamente com o aumento na demanda energética, dificulta o adequado controle glicêmico em gestantes diabéticas.

É importante ressaltar que a diabetes gestacional é uma condição distinta da gravidez complicada por diabetes *mellitus* tipo 1 ou 2 (JOVANOVIC, 2009).

Os fatores de risco relacionados com a diabetes gestacional são: história de diabetes gestacional em gravidezes prévias; história familiar de diabetes *mellitus*, especialmente quando em familiares do 1º grau; excesso de peso; idade superior a 25 anos; gestação anterior com recém-nascido de peso superior a 4,1 Kg ou peso inferior a 2,7 Kg; história pessoal de anomalia de tolerância a glicose; pertencer a um grupo étnico específico (nos EUA: afro-americanas, latinas, população índia e asiática); aborto ou nascimento de criança com malformação inexplicados; mulher que ao nascimento pesava mais que 4,1 Kg ou peso inferior a 2,7 Kg; glicosúria na primeira visita pré-natal; síndrome do ovário policístico; terapêutica com esteroides durante a gravidez; hipertensão arterial prévia ou induzida pela gravidez e aumento de peso rápido na primeira metade da gravidez (JOVANOVIC, 2009).

A partir da segunda metade da gravidez ocorre a resistência fisiológica à insulina devido a alterações hormonais podem diminuir a quantidade de receptores de insulina, afetar mecanismos intracelulares de resposta a ela, e reduzir a captação de glicose mediada por insulina (YOGEV et al, 2003; METZGER et al, 2007). Em muitos casos parece que resistência à insulina já pode existir previamente e se agrava durante a gravidez (METZGER et al, 2007).

Durante a gestação, a insulino-resistência prolongada pode ocasionar uma disfunção das células β pancreáticas e consequente diminuição da produção de insulina, mas vários estudos indicam que a gravidez apenas evidencia esses defeitos que podem ser crônicos e estarem presentes antes e depois da gravidez (METZGER et al, 2007).

Apesar da evolução nos cuidados obstétricos e neonatais, a diabetes gestacional ainda condiciona inúmeros riscos para a mãe, o feto e o recém-nascido (COUTINHO et al., 2010). O aumento dos níveis de glicose na gravidez faz com que aumente a produção de insulina pelo feto e, ocorre lipogênese, conferindo maior risco para obesidade, macrossomia, hipoglicemias ao nascer e nascimento prematuro, resultando em acréscimo de taxas de mortalidade neonatal (OKEN et al, 2006; HILLIER et al, 2008). Para a gestante também pode ocorrer uma série de complicações como retinopatias, pré-eclâmpsia, hiperlipidemia, infecção

urinária e chances para desenvolver diabetes na próxima gestação, além de outras consequências negativas obstétricas e perinatais, como o parto prematuro (COETZEE, 2009; DAMM; NIELSEN, 2010; HEATH, 2010).

Além das complicações médicas que se evidenciam ao nascimento dos indivíduos filhos de mães diabéticas, uma série de estudos, realizados em humanos e animais, vem indicando que estes indivíduos possuem também alterações crônicas que predispõe essas pessoas a apresentarem patologias ao longo da vida. As alterações mais estudadas e evidentes são alterações metabólicas (para revisão, FETITA et al., 2006). Indivíduos que passaram por hiperglicemia *in útero* devido ao diabetes materno têm uma maior probabilidade de apresentar obesidade, alterações na tolerância à glicose, resistência insulínica aumentada, diabetes *mellitus*, hipertensão e doenças cardiovasculares. Essas alterações metabólicas estão normalmente associadas a um aumento de mediadores inflamatórios sistêmicos. Estudos em humanos mostram que indivíduos não diabéticos filhos de mães com diabetes do tipo 2 apresentam níveis aumentados de mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-1ra, IL-6 e a proteína C-reativa (RUOTSALAINEN et al, 2008, 2010).

O risco de malformações fetais está aumentado nas gestações de mulheres diabéticas. Estão descritos aumentos na incidência de defeitos ao nascimento, entre estes, defeitos nos sistemas cardíaco, esquelético, renal e no sistema nervoso central (CORREA et al., 2008, DAVIS et al., 2010, ANDERSON et al., 2005). Embora não exista descrição de alterações no desenvolvimento do sistema nervoso periférico, um estudo realizado em ratos por GERMANI et al. (1999) mostrou que os níveis de RNAm para os fatores neurotróficos NGF e BDNF estão bastante reduzidos na prole de ratas onde o diabetes foi induzido por injeção de aloxana. Os níveis de RNAm para NGF estão reduzidos em tecidos alvo do sistema sensorial, sendo observada uma diminuição de 90% da expressão do RNAm para NGF na língua e uma redução de 56% do mesmo no intestino. Também foi observada uma redução de RNAm para BDNF e um aumento no RNAm para NGF nas vibriças de embriões. Este estudo indica que deve haver alterações no desenvolvimento do sistema sensorial na prole de ratas diabéticas, visto que o NGF é essencial para a sobrevivência e crescimento axonal de fibras nociceptivas de pequeno diâmetro (tipo C e A δ) enquanto que o BDNF parece estar mais envolvido no desenvolvimento das fibras mielinizadas (tipo A β) envolvidas no tato e propriocepção (para revisão, DAVIES, 1994, SNIDER; WRIGHT, 1996). Um estudo realizado *in vitro* mostrou que células de Schwann cultivadas em meio com alta concentração de glicose produzem menos NGF e por esse motivo o meio condicionado por estas células induz menor crescimento axonal de neurônios do gânglio da raiz dorsal (TOSAKI et al., 2008).

Camundongos geneticamente modificados, em que foi deletado o receptor TrkA para NGF, além de serem insensíveis a dor e temperatura apresentam uma grande perda de neurônios nos gânglios da raiz dorsal e gânglios trigeminais (SMEYNE et al., 1994). Estes estudos sugerem que, na prole de ratas diabéticas, uma alteração na produção de NGF pode levar ao desenvolvimento anormal do sistema sensorial.

3.2 Sistema Sensorial Nociceptivo

3.2.1 Dor: Visão Geral

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos de tal dano”. A dor, portanto, constitui um dos componentes essenciais do sistema de defesa do organismo, que se origina de uma estimulação específica de nociceptores, e alerta o encéfalo acerca de perigos causados por estímulos nocivos (PURVES et al, 2010). Essa sensação fornece um rápido aviso ao sistema nervoso podendo iniciar uma resposta motora reflexa e minimizar o prejuízo físico. A falta da capacidade de experimentar a dor – como na rara condição de insensibilidade congênita à dor com anidrose – pode causar vários problemas sérios para a saúde, tais como: automutilações, autoamputações e perda da visão (AXELROD; HILZ, 2003).

3.2.2 Os neurônios nociceptivos primários.

As terminações nervosas que iniciam a sensação de dor são chamadas de nociceptores. Eles originam-se de corpos celulares nos gânglios das raízes dorsais (ou no gânglio do trigêmeo) que emitem um processo axonal para a periferia e outro para dentro da medula espinhal ou tronco encefálico (PURVES et al, 2010).

Os axônios associados aos nociceptores, ao contrário das fibras associadas aos receptores sensoriais (que são mielinizadas e por isso tem uma condução mais rápida do impulso), apresentam velocidade de condução mais lenta, sendo mielinizados apenas de leve ou, mais comumente, não mielizados (PURVES et al, 2010). Assim, axônios conduzindo informação nociceptiva estão no grupo A δ de axônios mielinizados, que conduzem a 5-30 m/s, ou no grupo de fibras C de axônios não mielinizados, que conduzem a velocidades quase

sempre menores do que 2 m/s, ou seja, há vias de condução rápidas e lentas (PURVES et al, 2010).

Levando em conta o critério funcional, as fibras A δ respondem à estimulação mecânica, porém podem ser sensibilizadas pelo calor, enquanto as fibras do tipo C respondem tanto a estímulos térmicos quanto mecânicos e químicos, sendo classificadas, por isso, como nociceptores polimodais (OLIVEIRA IN LENT, 2008).

O gânglio abriga também corpos celulares grandes, que contêm filamentos em seu interior e cujos axônios calibrosos e mielinizados constituem as fibras A β , que tem alta velocidade de condução. Essas fibras são encarregadas de detectar estímulos inócuos aplicados à pele, músculos e articulações, sendo responsáveis por sensações táteis e de propriocepção (OLIVEIRA IN LENT, 2008).

3.2.3 Gânglio da Raiz Dorsal

Situados na coluna vertebral e dispostos lateralmente ao longo da medula espinhal os gânglios da raiz dorsal contêm corpos celulares de neurônios sensoriais que levam ao sistema nervoso central toda a informação sensorial proveniente da pele, músculos, tendões e vísceras. Esses neurônios do gânglio da raiz dorsal são encapsulados por células satélites de origem glial, são pseudo-unipolares e o axônio se bifurca em dois ramos: um forma o terminal sensorial periférico e outro segue pela raiz dorsal até a medula espinhal, onde forma sinapses ou prossegue até o bulbo. No caso dos neurônios nociceptivos a sinapse com o neurônio sensorial de segunda ordem se dá no corno dorsal da medula espinhal. O neurossoma é desprovido de dentritos e aferências sinápticas. Essa morfologia garante que toda a informação que trafega pelo axônio seja proveniente exclusivamente da terminação sensorial que ele forma. Cada neurônio possui seu próprio conjunto de células satélites, ou células gliais, que limitam o contato dos neurônios com o interstício do gânglio e com os capilares sanguíneos. Os gânglios da raiz dorsal contêm ainda células dendríticas e macrófagos, além de uma rica rede de capilares sanguíneos. (BATISTA, 2008; OLSSON, 1990; BESSON, 1999; WILLIS, COGGESHALL, 2004).

3.2.4 Transdução de sinais nociceptivos

Estudos recentes mostraram que na membrana plasmática dos nociceptores encontram-se famílias de proteínas transmembranas constituindo receptores e canais que

participam no processo de transdução das várias modalidades de estímulos nocivos diversos (OLIVEIRA IN LENT, 2008).

Alguns receptores específicos são associados a terminações aferentes nociceptivas. Um exemplo muito importante são os receptores vaniloides membros de uma família maior de canais de potencial de receptor transitório (TRP) (PURVES et al, 2010). O receptor vanilóide TRPV1 é encontrado em fibras C e A δ e ativado por calor moderado (45º C – uma temperatura que é percebida como desfavorável) e também por capsaicina (princípio ativo responsável pela pungência das pimentas ardentes) (PURVES et al, 2010). No estágio ativado, aberto, esses receptores permitem um influxo de sódio e cálcio que inicia a geração de potenciais de ação nas fibras nociceptivas (PURVES et al, 2010).

Existem ainda nociceptores do tipo C cujo estímulo natural é de difícil identificação, só respondem quando o tecido é lesado e ocorre a sensibilização dos mesmos (OLIVEIRA IN LENT, 2008). Estes nociceptores são conhecidos como nociceptores silenciosos.

Os estímulos nocivos intensos que ocasionam a lesão tecidual, frequentemente conduzem a um aumento na resposta a estímulos dolorosos subsequentes, denominado hiperalgesia, sendo que a hiperalgesia primária ocorre devido à sensibilização do nociceptor ou a hipersensibilidade (FEIN, 2011).

3.2.5 Vias Nociceptivas

As vias responsáveis pela nocicepção originam-se junto a outros neurônios sensoriais nos gânglios das raízes dorsais, e os axônios centrais das células nociceptivas entram na medula espinhal através das raízes dorsais (PURVES et al, 2010). O corno dorsal da medula espinhal funciona como uma estação para a transmissão da dor. Os nociceptores chegam de forma ordenada no corno dorsal da medula espinhal, com as fibras mielinizadas A δ terminando principalmente nas lâminas I e V e as fibras C, não mielinizadas, na lâmina II (MILLAN, 1999). A partir destas regiões, são acionados neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem na medula espinhal, sendo que alguns são ativados somente por estímulos nocivos (específicos para a nocicepção) (MILLAN, 1999). O glutamato é o principal neurotransmissor liberado na medula por neurônios nociceptivos primários. Dentre os nociceptores existe ainda uma subpopulação que libera, possivelmente junto com o glutamato, substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), sendo denominados neurônios peptidérgicos e uma subpopulação de neurônios não peptidérgicos

que tem como característica a ligação à isolectina B4 (BATTAGLIA; RUSTONI, 1988; MILLAN, 1999).

As vias ascendentes da dor podem ser divididas em vias monossinápticas e polissinápticas. As primeiras projetam para centros cerebrais superiores e incluem os tratos espinomesencefálico, espinoparabraquial, espinotalâmico e espinorreticular (MILLAN, 1999). As vias polissinápticas possuem uma estação de neurônios de segunda ordem antes de projetarem aos centros cerebrais superiores, sendo estas as vias pós-sináptica da coluna dorsal e do trato espinocervical (MILLAN, 1999). Esses axônios dos neurônios de segunda ordem no corno dorsal cruzam a linha média e ascendem ao tronco encefálico e ao tálamo no quadrante anterolateral, via conhecida como sistema anterolateral (PURVES et al, 2010).

O tálamo está envolvido na recepção, integração e transferência do potencial nociceptivo. As diferentes projeções para seus núcleos e deles para o córtex definem a circuitaria funcional de processamento da dor (WENG et al., 2000). Aspectos sensoriais e discriminativos são interpretados no córtex somatossensorial e aspectos afetivos e motivacionais são direcionados a outras regiões como amígdala, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, colículo superior, formação reticular e núcleos talâmicos da linha média (PURVES et al, 2010; WENG et al., 2000).

Em relação a modulação da dor, o sistema nervoso central contém opiáceos endógenos: a encefalina, cuja distribuição parece ser paralela aos locais de ligação de receptor opiáceo e a β -endorfina. Assim, os receptores opioides e os opioides endógenos compõem um sistema de supressão de dor intrínseco. As fibras C parecem liberar glutamato e substância P, o que justifica a dupla sensação de dor rápida e lenta, que seria produzida no início pela liberação de glutamato e, logo depois, pela substância P. Um grande número de neurônios que se originam nos núcleos da rafe, no tronco cerebral, projeta-se para a medula liberando encefalina e serotonina. A encefalina, de certo modo, pode inibir a liberação de substância P. A ação analgésica dos peptídeos opioides endógenos é produzida pelo acoplamento dos mesmos com os diferentes tipos de receptores opioides. A maior densidade de receptores e dos peptídeos opioides endógenos coincide com os locais do sistema nervoso central cuja estimulação induz analgesia, e é onde atua a morfina, produzindo seu efeito analgésico (OLIVEIRA IN LENT, 2008; INSTITUTO PAULO BRITO, 2013).

4 Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas e machos (neonatos e adultos com 300 g) mantidos em sala com temperatura e luminosidade controladas e acesso à água e comida ad libitum até o dia do experimento. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (International Association for the Study of Pain) (ZIMMERMANN, 1983). Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo 093/11)

4.2 Indução de diabetes *mellitus* em ratas gestantes

Foram utilizadas 30 ratas Wistar pesando no mínimo 180g e 15 ratos Wistar pesando mais de 300g para acasalamento. As fêmeas de ratos Wistar foram colocadas para acasalamento na proporção de 2 a 3 fêmeas para um macho, a gravidez foi constatada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. Após a constatação da gravidez, as fêmeas foram separadas, mantidas em jejum por 8 horas e foram tratadas por injeção intraperitoneal com solução salina 0,9% (controle) ou com aloxana (100 mg/kg). A glicemia das ratas grávidas foi avaliada (dosagem da glicemia com o aparelho Accu Check) 3 dias após a injeção de aloxana, sendo consideradas diabéticas e utilizadas no experimento as mães com glicemia acima de 150mg/dl no período da manhã, às 8 horas.

4.3 Teste de pressão crescente: Von Frey eletrônico

A avaliação da hipernocicepção mecânica na pata de ratos foi realizada pelo método de pressão crescente previamente descrita por Möller et al., (1998). Avaliou-se a sensibilidade mecânica utilizando esse teste de von Frey eletrônico nas patas traseiras dos animais em condições basais e depois de indução de hipernocicepção (hiperalgesia), por injeção subcutânea intraplantar de carragenina (1%). Resumidamente, este método utiliza-se de um anestesiômetro eletrônico (von Frey eletrônico, Insight, Ribeirão Preto, Brasil). Este aparelho é composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a

qual é expressa em gramas. Ao transdutor é adaptada uma ponteira Universal Tips 10 μ L (T-300, Axygen) que estimula diretamente a pata do animal. O experimentador é treinado a aplicar a ponteira em angulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o qual provoca uma resposta de flexão característica com retirada da pata. O estímulo é interrompido após a observação da resposta característica, descrita acima. Foram realizadas três medidas distintas para cada animal, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hipernocicepção mecânica é quantificada como a variação na pressão (D de reação em gramas) obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 hora) do valor de reação (após a administração do estímulo inflamatório). Durante os experimentos os animais foram mantidos em caixas acrílicas medindo 12 x 100 por 17cm de altura, com assoalho formado por uma rede de malhas medindo cerca de 5mm² constituída de arame não maleável de 1mm de diâmetro. Essas caixas foram mantidas a cerca de 25 cm da superfície de uma bancada, de modo que a estimulação da pata traseira dos animais fosse realizada. Antes do inicio dos experimentos os animais permaneceram nessas caixas por quinze minutos para a adaptação.

4.4 Teste da Placa Quente

A sensibilidade térmica foi avaliada por meio do teste da placa quente (EDDY; LEIMBACH, 1953), que consiste em um modelo comportamental de nocicepção no qual o animal é colocado sobre uma placa aquecida (55 ° C), e a latência para a manifestação de qualquer resposta de um comportamento nociceptivo como sacudir a pata ou saltar é registrado.

4.5 Teste da formalina

O sistema sensorial nociceptivo foi avaliado através de um modelo de nocicepção induzida por injeção de formalina na pata de ratos. Este teste induz uma resposta bifásica que parece envolver mecanismos de sensibilização central e periférica (CODERRE et al, 1990, 1994, PARADA et al. 2001). Os animais foram colocados em uma câmara de acrílico e mantidos por 15 minutos para adaptação ao ambiente. Foi então realizada uma injeção intraplantar subcutânea (50 μ l) de uma solução contendo 2,5% de formalina. Os animais retornaram para a câmara e foram observados por 60 minutos. O tempo de registro foi separado em blocos de 5 minutos e um escore de dor foi determinado para cada bloco

determinando-se o número de vezes que o animal sacodiu ou levantou a pata afetada (sem que fosse para se locomover).

4.6 Teste da injeção intraplantar de capsaicina

Esse modelo foi proposto por Sakurada et al em 1992, para o estudo de compostos que atuam sobre a dor neurogênica. A injeção de capsaicina induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos e causa a liberação de vários neuropeptídios envolvidos na transmissão dolorosa. Os animais foram colocados em uma câmara de vidro e mantidos por 15 minutos para adaptação ao ambiente. Foi então realizada uma injeção intraplantar subcutânea (50 μ l) de uma solução contendo 10 μ g de capsaicina. Os animais retornaram para a câmara e foram observados por 5 minutos. Foi registrado o número de vezes que o animal sacodiu e o tempo em segundos que o animal lambeu a pata afetada. A reação nociceptiva foi considerada como sendo a somatória dos dois comportamentos observados.

4.7 Cultura primária de células dos gânglios da raiz dorsal

Ratos Wistar machos neonatos (1 dia) foram eutanasiados por decaptação e os gânglios da raiz dorsal da região lombar e torácica foram removidos (16 a 20 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank's estéril com 10 mM de tampão HEPES. As células foram dissociadas por incubação a 37°C por 30 minutos em solução contendo 0,25 mg/ml de tripsina. Os gânglios foram lavados em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina. As células foram dissociadas mecanicamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e foram cultivadas em placas cobertas com Matrigel e mantidas em atmosfera de 5% CO₂ e temperatura de 37°C com o mesmo meio de cultura já descrito. As culturas foram fixadas em paraformaldeído utilizadas após 24 horas e estocadas em freezer até sua utilização nos ensaios de imunofluorescência.

4.8 Obtenção de cortes congelados de gânglios da raiz dorsal de animais adultos.

Foram retirados os gânglios sensoriais de animais anestesiados em halotano após perfusão cardíaca com salina (250 ml) e paraformaldeído 4% (PFA, 150 ml). Estes gânglios

foram pós-fixados por 2 horas em PFA 4% e desidratados em solução de sacarose 30% por 48 horas. Foram realizados cortes de 14 μ m em criostato em lâminas silanizadas.

4.9 Imunofluorescência

Para o ensaio em culturas primárias, as culturas foram lavadas duas vezes em PBS e então fixadas por 20 minutos em PFA 4%. O protocolo descrito a seguir foi utilizado tanto nos cortes quanto nas culturas. Os tecidos foram incubados por 30 minutos em tampão salina fosfato (PBS) contendo glicina (0,1M) para inativar os aldeídos livres presentes no PFA. Em seguida, foi feita a permeabilização com triton X-100 0,1% por 20 minutos e bloqueio com 3% de albumina bovina sérica (BSA) diluída em PBS durante 30 minutos. Depois disso foi feita a incubação com os anticorpos primários em solução PBS contendo BSA 3% por 1 hora em temperatura ambiente. Os tecidos foram lavados 3 vezes por 5 minutos com PBS e em seguida, os anticorpos secundários foram incubados por 1 hora em solução igual à utilizada para incubação dos anticorpos primários. Os cortes ou culturas foram então lavados 3 vezes por 5 minutos em PBS, as lâminas montadas em fluoromount e as culturas reservadas com PBS. As imagens foram inicialmente observadas em microscópio de fluorescência e depois fotografadas em microscópio confocal (LSM 510 Meta, Zeiss).

4.10 Análise estatística

Nos ensaios comportamentais, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de pelo menos 6 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita pelo teste t, quando apenas duas médias foram comparadas ou por análise de variância (ANOVA), quando mais de duas médias foram comparadas. Foi realizada ANOVA de uma via ou duas, conforme necessário. Quando o nível de significância indicou diferença estatística entre as médias testadas foi utilizado o Teste Bonferroni para comparar os tratamentos. O nível de significância foi de $P<0.05$.

5 Resultados

5.1 Glicemia das mães diabéticas e de seus filhos

Para a realização desse estudo foram avaliados dois grupos experimentais de ratas grávidas. Um dos grupos, o controle, após detectada a gravidez foi tratado com uma injeção de solução salina 0,9% (veículo da aloxana), enquanto o outro grupo foi tratado com aloxana para a indução do diabetes. O acompanhamento da glicose sanguínea realizado mostrou que a glicemia média das mães que desenvolveram diabetes após a injeção de aloxana e tiveram seus filhos foi de 325.1 mg/dl, enquanto que as mães que desenvolveram diabetes, mas não pariram foi de 360.6 mg/dl.

Em relação aos animais neonatos utilizados no experimento, o grupo controle apresentou uma média de peso de 8.1g e média de glicose sanguínea de 86.4mg/dl; já o grupo dos filhos de mães diabéticas apresentou média de peso de 7.3 g e média de glicose sanguínea de 89 mg/dl. Não foi detectada diferença estatística nos valores de glicemia e peso entre estes dois grupos.

5.2 Imunofluorescência e avaliação morfométrica dos neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal de ratos neonatos e adultos

Avaliação dos neurônios sensoriais primários de recém-nascidos (1-3 dias após o nascimento) foi realizada em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal e foram utilizados 7 a 8 animais por grupo.

A avaliação histológica dos neurônios sensoriais primários em animais adultos (200 a 300 g) foi realizada utilizando-se seções congeladas de gânglios da raiz dorsal (L5) de 6 a 7 animais por grupo experimental.

Para avaliar se houve mudanças na proporção dos tipos de fibras sensoriais, foi realizada uma análise morfométrica e determinada a proporção de neurônios pequeno (<30 μm), médio (entre 30 e 40 μm) e grande diâmetro (> 40 μm) de acordo com Harper e Lawson, 1985. Não foi observada diferença quanto à distribuição dos neurônios quando separados por diâmetro de soma neuronal, como pode ser observado nas figuras 1 e 2.

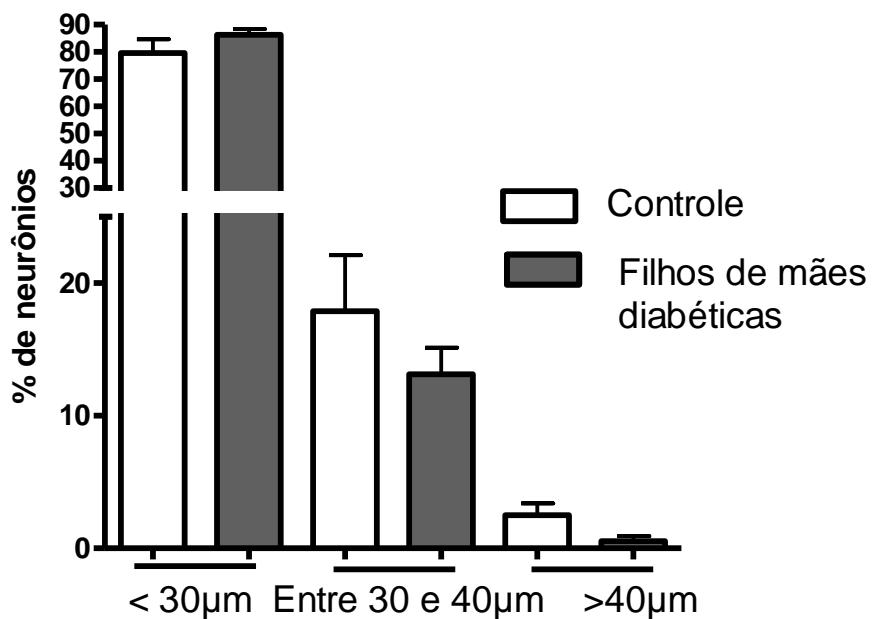


Figura 1: Porcentagem de neurônios de pequeno ($<30 \mu\text{m}$), médio (entre 30 e 40 μm) e grande diâmetro ($>40 \mu\text{m}$) em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de animais recém-nascidos. Está sendo mostrada a média e E.P.M. de 7-8 animais por grupo experimental.

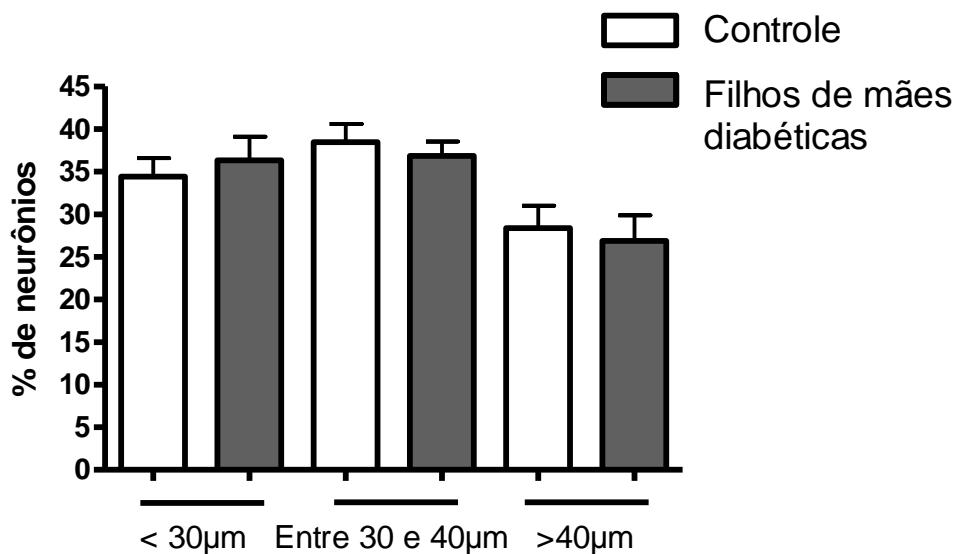


Figura 2: Porcentagem de neurônios de pequeno ($<30 \mu\text{m}$), médio (entre 30 e 40 μm) e grande diâmetro ($>40 \mu\text{m}$) em cortes congelados de gânglios da raiz dorsal (L5) de animais adultos. Está sendo mostrada a média e E.P.M. de 7-8 animais por grupo experimental.

Os subtipos de neurônios também foram classificados através de imunofluorescência utilizando anticorpos contra as moléculas: TRPV1 - receptor vaniloide presente apenas em nociceptores; NFH - neurofilamento H presente em fibras de maior diâmetro e Substância P -

presente em neurónios nociceptivos peptidérgicos. A marcação dos neurónios nociceptivos não-peptidérgicos foi realizada utilizando IB4 (Isolectina B4) fluorescente que se liga especificamente a este subtipo de neurónios. A figura 3 ilustra as marcações obtidas em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de animais recém-nascidos e a Figura 4 ilustra as marcações observadas em cortes congelados de gânglios da raiz dorsal de animais adultos.

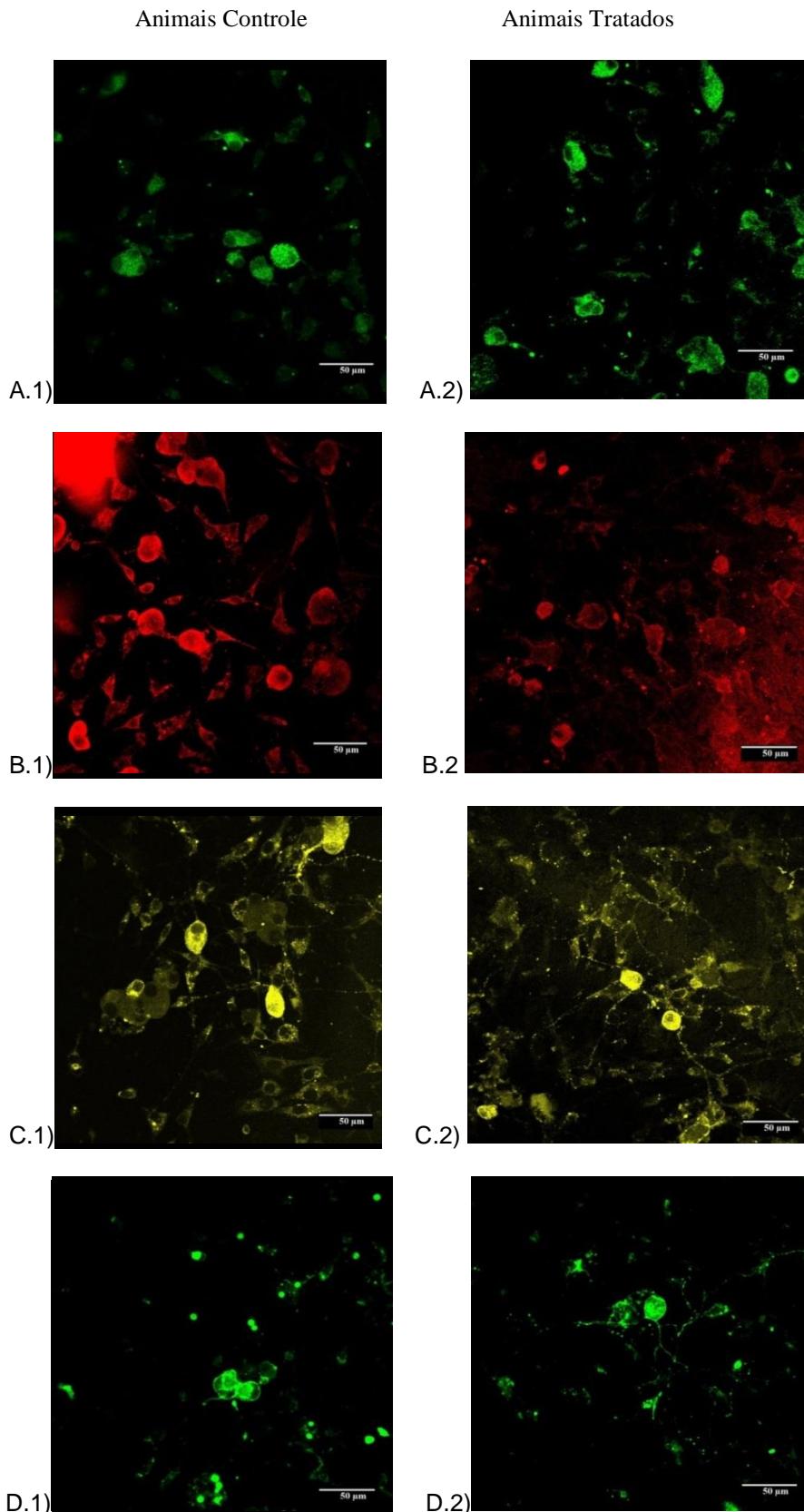


Figura 3: Imagens de imunofluorescência de culturas primárias de gânglios da raiz dorsal obtidas de ratos recém-nascidos. À esquerda estão sendo mostradas culturas de animais controles e à direita imagens de culturas de ratos filhos de mães diabéticas. A) Imunofluorescência para NFH. B) Imunofluorescência para VR1. C) Imunofluorescência Substância P. D) Marcação fluorescente para IB4.

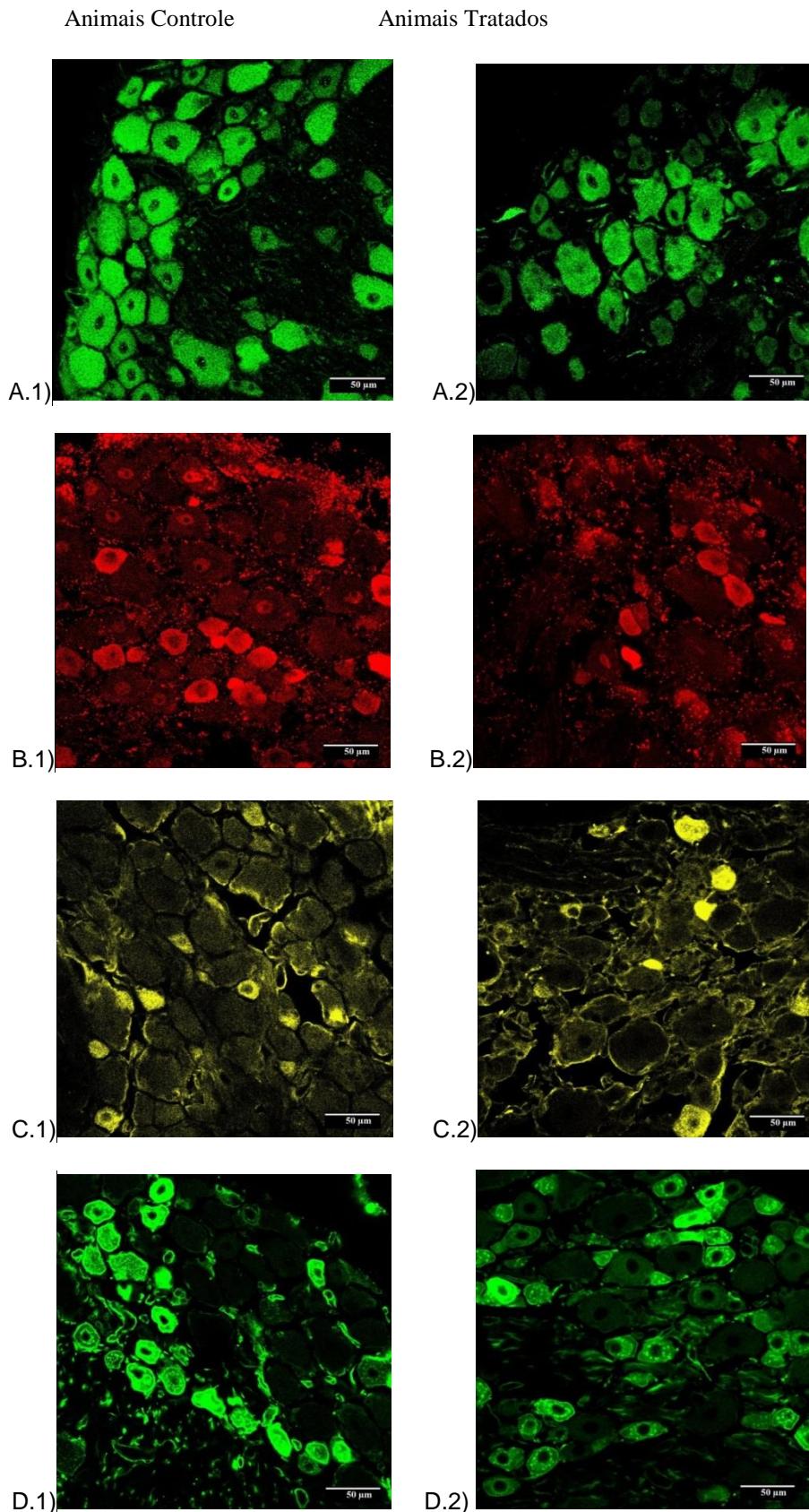


Figura 4: Imagens de imunofluorescência de cortes congelados de gânglios da raiz dorsal obtidos de ratos adultos. À esquerda estão sendo mostrados cortes de gânglios de animais controles e à direita imagens de cortes de gânglio de ratos filhos de mães diabéticas. A) Imunofluorescência para NFH. B) Imunofluorescência para VR1. C) Imunofluorescência Substância P. D) Marcação fluorescente para IB4.

Nos experimentos de imunofluorescência realizados em culturas de ratos recém-nascidos, não foi observada diferença entre as proporções de neurônios que apresentaram marcação positiva para os diferentes marcadores testados, tal como mostrado na figura 5.

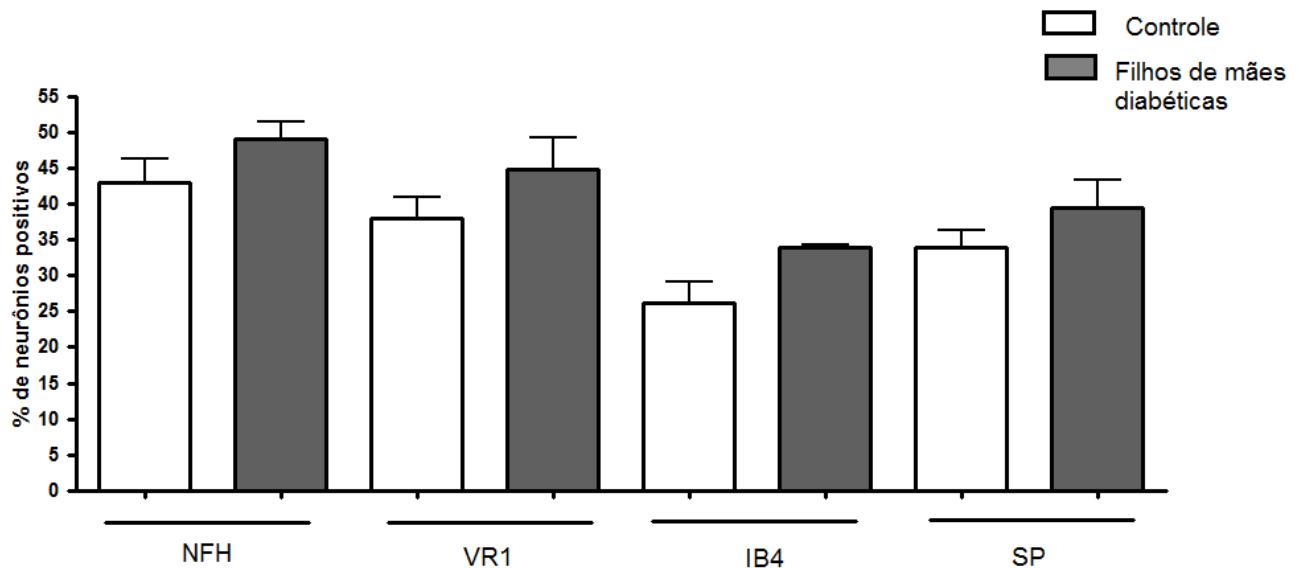


Figura 5: Porcentagem de neurônios positivos para cada marcação fluorescente (NFH, VR1, IB4 e SP) em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de animais recém-nascidos. Está sendo mostrada a média e E.P.M. de 7-8 animais por grupo experimental.

Já nos animais adultos, quando são comparadas as marcações entre o grupo controle e o grupo de animais filhos de mães diabéticas, podem ser observadas algumas diferenças estatisticamente significantes mostradas na figura 6. Os animais filhos de mães diabéticas apresentam menos marcação de neurônios grandes (neurofilamento H) que os animais tratados ($P=0.0078$). Além disso, os animais filhos de mães diabéticas apresentam maior porcentagem de neurônios marcados positivamente para Substância P ($P=0.0291$) e Isolectina B4 ($P=0.0353$).

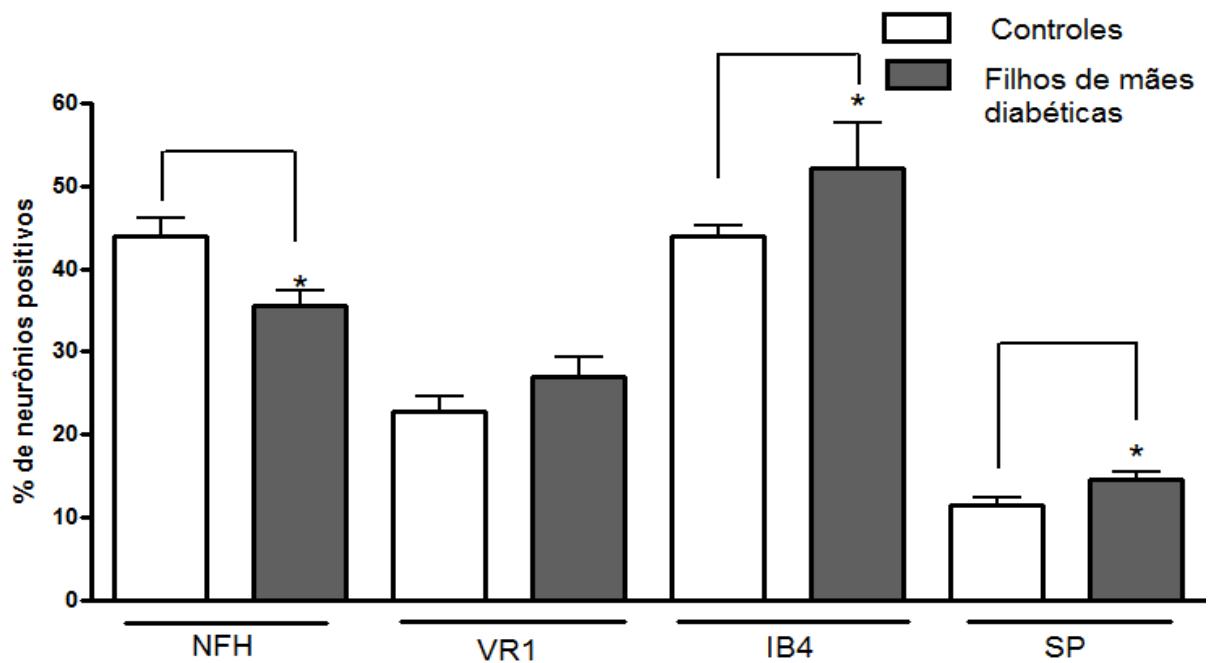


Figura 6: Porcentagem de neurônios positivos para cada marcação fluorescente (NFH, VR1, IB4 e SP) em cortes congelados de gânglios da raiz dorsal (L5) de animais adultos. Está sendo mostrada a média e E.P.M. de 7-8 animais por grupo experimental. * $p < 0,05$ quando comparado ao respectivo controle.

5.3 Avaliação da sensibilidade mecânica em patas de animais adultos

Para avaliar se as alterações funcionais ocorrem no sistema sensorial de ratos submetidos a diabetes materno no útero foi utilizado o teste Von Frey eletrônico nas patas traseiras direitas dos animais adultos em condições basais e após a injeção intraplantar de carragenina (1%). Não foi observada diferença na sensibilidade mecânica basal nos dois grupos avaliados (dados não mostrados). No entanto, os ratos filhos de mães diabéticas apresentaram menor intensidade da hiperalgesia ($P = 0,045$) na 6^a hora após a injeção de carragenina, como se mostra na Figura 7.

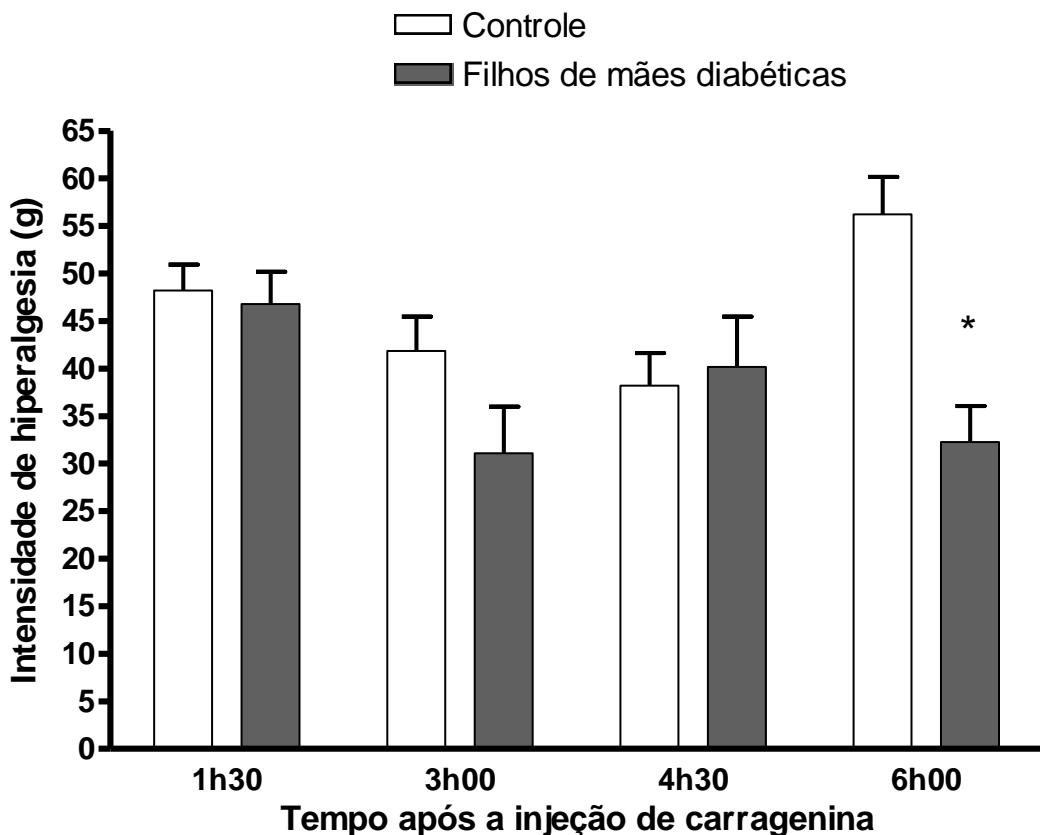


Figura 7: Teste Von Frey eletrônico: avaliação da sensibilidade mecânica em patas de animais adultos. A intensidade de hiperalgesia induzida por carragenina (100 µg/pata, i.pl.) foi obtida através da subtração do limiar obtido em cada momento do limiar basal de cada animal. Está sendo mostrada a média e E.P.M. de 6 animais por grupo experimental. *significativamente diferente do grupo controle no mesmo tempo de resposta ($p<0,05$).

5.4 Avaliação da sensibilidade térmica em patas de animais adultos

O teste da placa quente avaliou a latência da resposta de lamber ou sacudir a pata de animais adultos após serem submetidos a uma placa aquecida a 55°C. Esse teste foi realizado com o objetivo de avaliar a sensibilidade térmica. Observou-se uma diferença de sensibilidade térmica nociceptiva entre animais controle e filhos de mães diabéticas. A figura 8 mostra que os animais filhos de mães diabéticas tem mais sensibilidade térmica uma vez que a latência desses animais na placa quente é menor ($P<0.0001$).

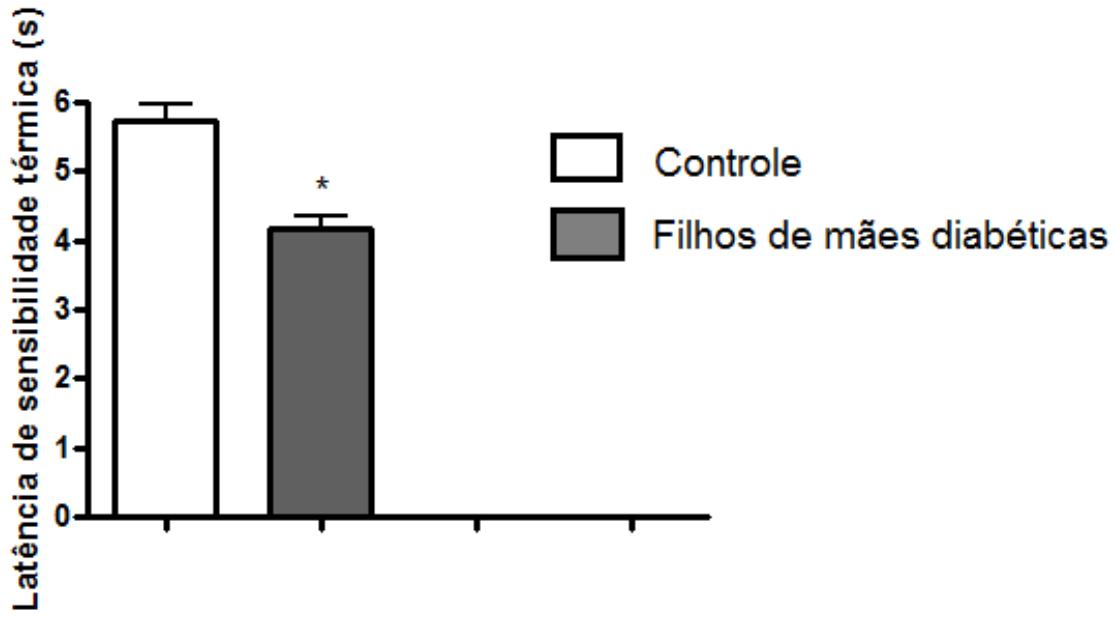


Figura 8: Teste da Placa Quente: avaliação da sensibilidade térmica em patas de animais adultos. Está sendo mostrada a média e E.P.M. de 10-12 animais por grupo experimental. * significativamente diferente do grupo controle ($p<0,0001$).

5.5 Avaliação da nocicepção induzida por formalina nas patas de animais adultos

O sistema sensorial nociceptivo dos animais adultos também foi avaliado pela nocicepção induzida por formalina, um teste que apresenta duas fases. A primeira fase (0-5 minutos pós-injeção) é chamada de fase neurogênica, na qual, supostamente, ocorre a ativação direta dos nociceptores locais pela formalina, e a segunda (15-30 minutos após a injeção) é chamada de fase inflamatória, na qual o comportamento observado é resultante da ação de mediadores inflamatórios liberados pelo estímulo. Na primeira fase de nocicepção induzida por formalina não há diferença significativa entre o grupo controle e os filhos de mães diabéticas. No entanto, no início da segunda fase, o número de flinches dos animais filhos de mães diabéticas foi maior que o do grupo controle ($P=0.02$) como mostrado na figura 9.

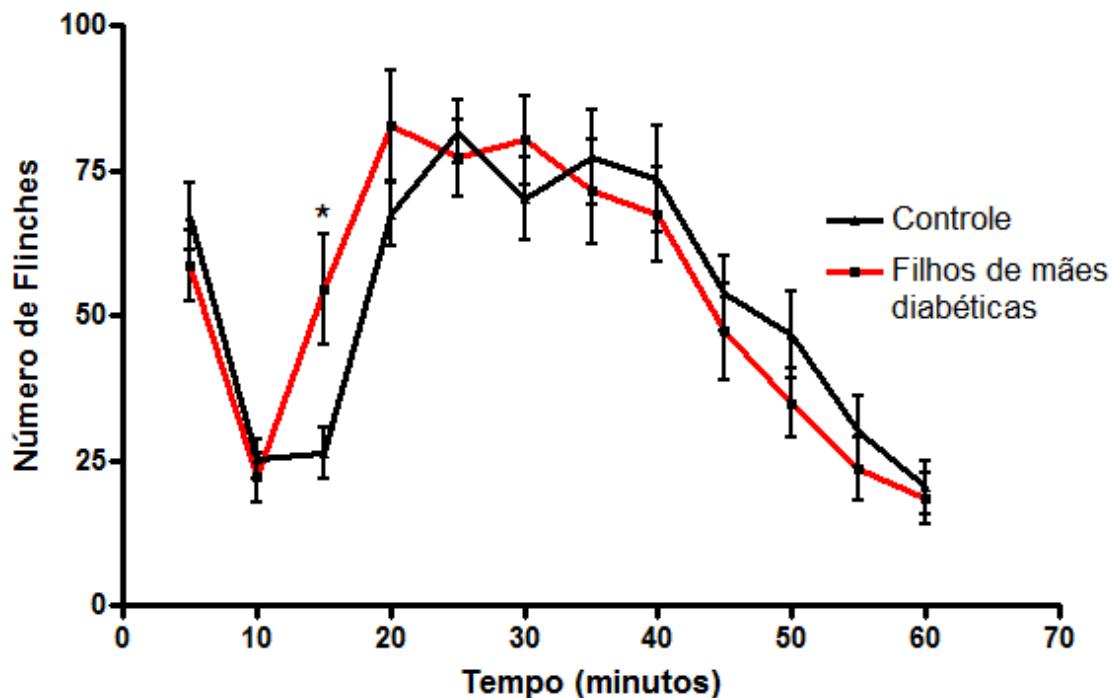


Figura 9: Teste da Formalina: avaliação da nocicepção induzida por formalina (2,5%, i.pl) em patas de animais adultos. Está sendo mostrada a média e E.P.M. de 9-10 animais por grupo experimental. *significativamente diferente do grupo controle no mesmo tempo de resposta ($p<0,05$).

5.6 Avaliação da nocicepção induzida por injeção de capsaicina em patas de animais adultos

O receptor TRPV1 também é conhecido como receptor de capsaicina, portanto, para avaliar a funcionalidade desses canais e estimulação dos neurônios nociceptivos foi realizado o teste da injeção intraplantar de capsaicina. Não houve diferença significativa na sensibilidade entre os dois grupos de animais estudados, como mostrado na figura 10.

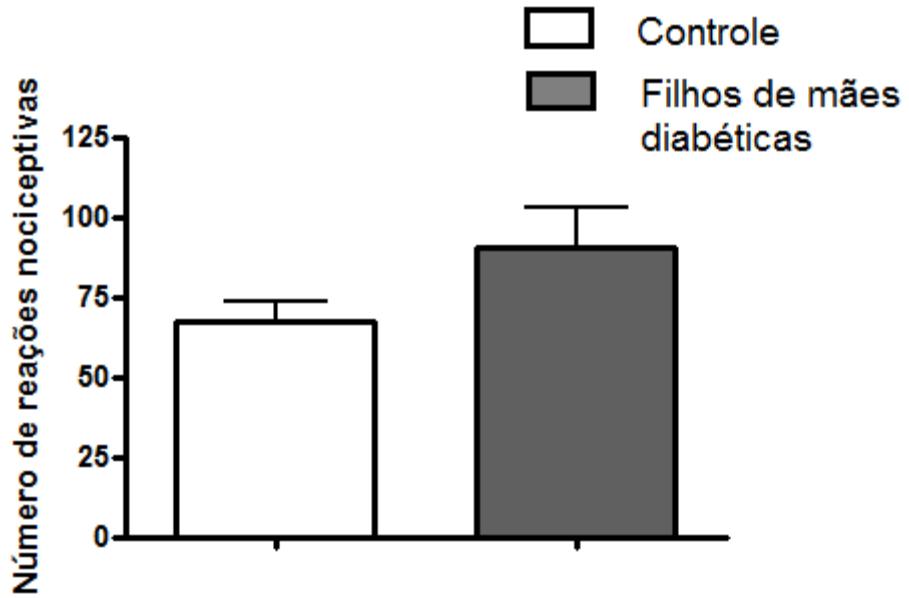


Figura 10: Teste da capsaicina: Efeito do diabetes materno sobre a nocicepção induzida por capsaicina. Está sendo mostrado o número de reações nociceptivas composto pela quantidade de vezes em que o animal sacode a pata tratada somada ao tempo que os animais ficaram lambendo as patas, sendo que cada segundo lambendo a pata foi contabilizado como uma reação. Está sendo mostrada a média e E.P.M. de 5-6 animais por grupo experimental.

6 Discussão

Neste estudo foi verificado que as respostas nociceptivas estão alteradas na prole de ratas diabéticas. Além dos ensaios com recém-nascidos, os experimentos foram realizados também em ratos adultos, muito tempo após o seu contato com o ambiente hiperglicêmico no útero, o que indica que o diabetes materno pode influenciar nas sensações nociceptivas ao longo da vida. O diabetes materno foi induzido no início do período gestacional utilizando aloxana para destruir parcialmente as células β do pâncreas. Portanto, esse modelo é bastante similar a uma situação de diabetes tipo 1 não-controlada, onde a produção/ administração de insulina não é suficiente para compensar a hiperglicemia. No entanto, nos casos em que a diabetes do tipo 2 já está presente antes de gestação, alterações semelhantes seriam de se esperar, uma vez que a produção de insulina pelo feto em desenvolvimento se dá ainda no início da gestação (SCHARFMANN, 2000) levando a hiperinsulinemia em ambos os tipos de diabetes maternos (GASPAR; NASCIMENTO, 2004). No caso de diabetes gestacional, que geralmente se desenvolve durante o segundo ou terceiro trimestre de gestação o risco de malformações congênitas são reduzidos uma vez que esse é maior quando a hiperglicemia está presente durante a fase de organogênese. Por outro lado, o crescimento de terminais periféricos e centrais de neurônios sensoriais primários ocorre tardiamente durante o desenvolvimento fetal e continua após o nascimento (JACKMAN; FITZGERALD, 2000). Uma vez que a neuropatia diabética é geralmente causada pela degeneração do nervo periférico, é possível que a hiperglicemia em fases tardias da gestação possa ainda causar alterações sensoriais.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que existem diferenças entre as populações de neurônios dos animais controle e dos animais filhos de ratas diabéticas. Nos animais adultos, detectou-se um aumento dos neurônios com marcação típica de nociceptores não peptidérgicos e peptidérgicos, IB4 e Substância P, respectivamente. Ocorreu uma tendência de aumento também na proporção de neurônios nociceptivos positivos para o receptor vanilóide TRPV1. Seria de se esperar que animais recém-nascidos apresentassem alterações semelhantes ou ainda mais evidentes do que as observadas nos animais adultos. No entanto, não foi possível observar diferença entre as populações de neurônios nos experimentos realizados com os animais neonatos. Apesar disto, acreditamos que diferenças possam estar presentes nos animais neonatos e que o método utilizado para avaliar este grupo de animais não tenha sido eficiente para detectar estas possíveis alterações. Devido à pequena dimensão dos gânglios da raiz dorsal dos animais neonatos, decidiu-se por avaliar as

populações neuronais através de imunofluorescências obtidas de culturas primárias dos gânglios destes animais. Durante o procedimento de dissociação das células e plaqueamento das culturas é normal ocorrer perda neuronal. Entretanto, a morte neuronal ocorrida durante os procedimentos de cultura nos nossos experimentos parecem que afetaram principalmente os neurônios de maior diâmetro (figura 1), de forma que a quantidade de neurônios de diâmetro grande ficou muito reduzida se compararmos com os resultados obtidos em cortes de gânglios de animais adultos. É possível que as populações neuronais difiram entre animais neonatos e adultos, embora não tenhamos encontrado dados na literatura que suportem esta ideia. Portanto, acreditamos que a diferença é mais bem explicada por uma maior sensibilidade dos neurônios de diâmetro grande às condições de cultura. Deste modo, outros experimentos serão necessários para que seja possível avaliar as prováveis alterações no desenvolvimento nociceptivo dos animais neonatos filhos de ratas diabéticas. Atualmente, está sendo iniciado um novo estudo em que provavelmente será possível avaliar diferenças no desenvolvimento dos animais neonatos.

Além disso, em relação a proporção de marcações imunofluorescentes em animais neonatos não foram observadas diferenças significativas, diferente dos resultados obtidos de animais adultos. Como seria de se esperar que esses animais apresentassem alterações semelhantes ou maiores que animais adultos, isso também pode ser provavelmente explicado devido às condições das células em cultura. Deste modo, os resultados aqui apresentados mostram que o diabetes materno causa alterações no desenvolvimento dos neurônios sensitivos periféricos e que estas alterações se mantêm nos animais adultos. Visto que as subpopulações de neurônios com características de nociceptores está aumentada nos animais filhos de ratas diabéticas podemos esperar que estes animais apresentem uma sensibilidade maior a estímulos nociceptivos do que animais controle. Por outro lado, existem diversos outros fatores que não foram avaliados em nossos experimentos e que podem afetar a sensibilidade tátil e dolorosa, como, por exemplo, uma expressão diferenciada de canais iônicos dependentes de voltagem. Alterações na expressão ou função de canais iônicos parecem ser os mecanismos responsáveis por produzir as variações de sensibilidade observadas nas desordens neuropáticas (para revisão, LIU; WOOD, 2011, ZULIANI et al., 2010). Alterações em correntes ou na expressão dos canais de Na^+ TTX-R, que são característicos de nociceptores, foram observadas na neuropatia diabética (HONG; WILEY, 2005, HONG et al., 2004) e, portanto, um estudo acerca da expressão destes canais em ratos filhos de mães diabéticas está sendo proposto pelo nosso grupo e poderá trazer informações adicionais importantes.

Além de afetar direamente os neurônios do sistema sensorial nociceptivo, em animais diabéticos, as lesões provocadas após estresse oxidativo se desenvolvem em outras células do gânglio da raiz dorsal. As lesões que ocorrem nas células da glia irão acarretar o processo de desmielinização, explicando a redução na velocidade de condução do nervo e manifestações dolorosas da neuropatia. O estresse oxidativo também é pró-infamatório e altera a produção de mediadores inflamatórios (DOBRETSOV, ROMANOVSKY, STIMERS, 2007).

Os estudos de Ruotsalainen et al em 2008 e 2010 mostraram que humanos não diabéticos filhos de mães com diabetes do tipo 2 apresentam níveis aumentados de mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-1ra, IL-6 e a proteína C reativa. Várias observações sugerem que a liberação de IL-1 logo após a lesão do nervo periférico pode ser de particular importância no aumento duradouro na excitabilidade do neurônio sensorial, bem como o estabelecimento de comportamento relacionado à dor neuropática. Por exemplo, a expressão do mRNA do receptor de IL-1, o IL-1RI, em neurônios sensoriais (COPRAY et al. 2001) implica que IL-1 afeta diretamente aferentes primários. Os estudos de Stemkowski e Smith, em 2012, mostraram que a exposição a IL-1 β aumenta a excitabilidade em neurônios do gânglio da raiz dorsal com pequenos e médios corpos neuronais marcados positivamente para IB4, achados que podem preceder o desenvolvimento da dor neuropática. Neste estudo foram realizados dois testes comportamentais em que há envolvimento de hiperalgesia inflamatória; o teste da formalina (figura 9) e a sensibilidade mecânica frente à administração intraplantar de carragenina (figura 7). No teste da formalina pudemos detectar um aumento da resposta nociceptiva no início da segunda fase deste teste, que é a fase onde ocorre um maior envolvimento de mediadores inflamatórios (PARADA et al, 2001). Deste modo, este teste sugere que os animais filhos de ratas diabéticas teriam uma susceptibilidade maior dos neurônios aos efeitos dos mediadores inflamatórios, ou ainda, uma resposta inflamatória que se desenvolve mais rapidamente. Por outro lado, no teste de sensibilidade mecânica após administração de carragenina, os animais filhos de ratas diabéticas apresentaram uma diminuição na sensibilidade mecânica após 6 horas da administração do agente inflamatório. Novamente, não podemos, através dos nossos resultados, determinar o motivo desta diminuição. É possível que o efeito da carragenina também tenha se dado de forma mais rápida nestes animais, visto que nos intervalos de tempo testados não pudemos observar o início da resposta, e que por este motivo a resposta inflamatória também termine mais cedo nestes animais. Embora não tenha sido observada diferença estatística, pudemos observar na figura 8 que a segunda fase do teste da formalina parece acontecer mais cedo e que existe uma tendência de que esta fase termine também mais cedo nos animais filhos das ratas diabéticas.

Em resumo, o que pode estar ocorrendo é uma antecipação da resposta inflamatória, talvez devido ao aumento crônico de mediadores inflamatórios, como detectado por outros autores (RUOTSALAINEN et al, 2008, 2010), ou ainda, uma alteração na cinética de sensibilização dos neurônios nociceptivos. O aumento na proporção de neurônios nociceptivos observada nos animais filhos de ratas diabéticas pode ser um dos fatores que altera a cinética de resposta aos mediadores inflamatórios.

Já analisando os nossos achados em relação aos canais TRPV1 e a sensibilidade térmica, o receptor vanilóide de capsaicina TRPV1 é um canal de cátions expresso em neurônios sensoriais primários que tem o soma neuronal pequeno ou médio e estão envolvidos no estímulo de dor, provocando uma sensação de queimação (HOLZER, 1991; CATERINA et al, 1997).

Embora nossos resultados apontem para a existência de uma quantidade semelhante ao grupo controle desses canais TRPV1 nos animais filhos de mães diabéticas, nós observamos uma tendência de aumento tanto nos recém-nascidos quanto nos animais adultos. Essa tendência pode ser importante para explicar uma maior sensibilidade térmica e também à injeção capsaicina dos animais filhos de mães diabéticas, uma vez que esses receptores canais são indispensáveis para esse tipo de sensibilidade (CATERINA et al, 2000). Os estudos de Caterina et al, em 2000, mostraram que neurônios sensoriais de ratos sem TRPV1 são muito deficientes em resposta a estímulos nocivos, como a resposta após injeção de capsaicina, que fica muito prejudicada e também em resposta a temperatura elevada, observada no teste da placa quente (55°C), em que os animais nocaute para TRPV1 apresentam uma latência maior na placa comparada ao grupo controle. Nesse mesmo estudo de Caterina et al, em 2000, quando foi avaliada a sensibilidade mecânica dos animais com expressão de TRPV1 e animais nocaute para TRPV1, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos após a realização do teste de Von Frey e teste de pressão na cauda. Portanto, essa maior sensibilidade térmica e a capsaicina observada em nossos resultados pode ser resultante desse ligeiro aumento de receptores TRPV1 nos neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal. Esses resultados são compatíveis com os encontrados em animais diabéticos portadores de neuropatia diabética dolorosa, como demonstrados dos estudos de Hong e Wiley em 2005, onde esses animais têm maior expressão de TRPV1 na membrana das células e também uma maior expressão de uma proteína tetramérica formadora desses canais, apoiando assim um aumento do número de receptores TRPV1 funcionais nas membranas das células. O trabalho de Ochoa et al, em 2005, também sugere a expressão ou modulação alterada de receptores TRPV1 em pacientes humanos portadores de neuropatia dolorosa.

A captação de glicose pelos neurônios sensoriais primários não é dependente de insulina (PATEL et al., 1994). No entanto, estes neurônios possuem receptores funcionais para insulina (SUGIMOTO et al., 2002). Nestes neurônios, a insulina e o IGF-1 parecem atuar como fatores neurotróficos colaborando para a sobrevivência e crescimento de neuritos (RECIO-PINTO et al., 1986) sendo atualmente discutida a possibilidade de que estes hormônios também sejam importantes para o desenvolvimento da neuropatia diabética. Van BUREN e colaboradores (2005) mostraram que insulina e IGF-1 sensibilizam o receptor TRPV1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal, causando aumento nas correntes induzidas por capsaicina e translocação do receptor para a membrana. Além disso, em modelo de diabetes induzido por injeção de estreptozotocina foi verificado que tanto animais hiperglicêmicos quanto animais que não apresentaram hiperglicemia tiveram uma diminuição do limiar mecânico e térmico nociceptivos (ROMANOVSKY et al., 2004, 2010). Tudo isso implica que, não só o ambiente hiperglicêmico ao qual os animais estão submetidos no útero materno pode provocar alterações no seu sistema nociceptivo sensorial, mas também outros fatores podem ocasionar esse processo, como a hiperinsulinemia que se desenvolve nesses animais na tentativa de compensar a hiperglicemia materna, os fatores de crescimento envolvidos nesse processo e também mediadores inflamatórios podem alterar o limiar de excitabilidade neuronal.

Embora aferentes não mielinizados geralmente desempenhem um papel mais significativo na dor neuropática diabética, alterações patológicas da neuropatia diabética ocorrem principalmente nas fibras mielinizadas. Um estudo mostrou que animais diabéticos desenvolvem alodinia tátil e os registros eletrofisiológicos registraram maior atividade em fibras A β e A δ , sendo estas, portanto, muito importantes no desenvolvimento da neuropatia diabética (KHAN; CHEN; PAN, 2002). Este envolvimento maior das fibras mielinizadas se dá principalmente devido à sensibilidade das células de Schwann à hiperglicemia o que induz à desmielinização dos neurônios (TOSAKI et al., 2008) e consequente alteração na velocidade de condução. É interessante notar que os animais filhos de ratas diabéticas apresentaram uma proporção menor de neurônios com características de neurônios mielinizados (marcação para NFH) quando comparados aos animais controle. Esta menor quantidade de neurônios pode estar relacionada a esta maior sensibilidade destes há hiperglicemia, embora também possa ser causada por alteração na expressão do fator de crescimento BDNF, conforme verificado por Germani et al. em 1999. Este resultado sugere que, além de diferenças nas sensações nociceptivas, os indivíduos filhos de mães diabéticas podem apresentar também alterações nas sensações tátteis e proprioceptivas. Estas alterações são difíceis de serem detectadas em

animais experimentais. Esperamos que este estudo realizado em animais possa servir de base para estudos em humanos, em que poderão ser avaliadas tanto as sensibilidades aos diferentes estímulos nociceptivos quanto as possíveis alterações táteis em indivíduos filhos de mulheres que apresentaram diabetes durante a gestação. Conforme mencionado anteriormente, não há em nosso conhecimento, relato de alterações no sistema somestésico em indivíduos filhos de mães diabéticas. Desta forma, este estudo é pioneiro e importante por demonstrar que o sistema nociceptivos periférico se desenvolve de forma diferente devido ao diabetes materno. Ainda, observamos que estas alterações estão presentes em animais adultos, muito tempo depois do contato com o ambiente hiperídrico. Alterações somestésicas congênitas são difíceis de serem detectadas a menos que muito intensas. Se o indivíduo nasceu com uma maior ou menor sensibilidade tática ou dolorosa, é bem provável que não vá perceber esta diferença. Especialmente tratando-se do sistema nociceptivo, onde variações individuais na sensibilidade são normalmente grandes, uma possível diferença provavelmente será detectada apenas em estudos que avaliem um número grande de indivíduos. Isto não significa, entretanto, que estas alterações não sejam importantes. Por exemplo, estes indivíduos podem apresentar uma maior ou menor propensão em desenvolver neuropatias e também podem responder de forma diferenciada aos fármacos analgésicos. Devido à grande e ainda crescente prevalência do diabetes *mellitus* faz-se necessário conhecer qualquer alteração decorrente desta patologia a fim de prevenir e/ou tratar adequadamente os indivíduos por ela afetados.

7 Conclusão

A partir desse estudo podemos então concluir que:

- Animais adultos filhos de ratas diabéticas apresentam uma menor proporção de neurônios com características de neurônios não nociceptivos e uma maior proporção de neurônios nociceptivos.
- Animais adultos filhos de mães diabéticas apresentam sensibilidade térmica aumentada.
- Animais adultos filhos de mães diabéticas apresentam alterações na resposta nociceptiva associada a efeitos de mediadores inflamatórios.
- Animais adultos filhos de mães diabéticas apresentam diminuição da sensibilidade mecânica após seis horas da administração de um agente inflamatório.

Portanto, neste estudo foi verificado que as respostas nociceptivas estão alteradas em animais adultos filhos de ratas diabéticas e que estas alterações são acompanhadas por mudanças no perfil dos neurônios presentes no gânglio da raiz dorsal.

8 Referências Bibliográficas

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Clinical practices recommendation. **Diabetes Care**, New York, v. 31, p.s1-s96, Jan. 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes--2011. **Diabetes Care** .34 S. 1:S11-S61. 2011.

ANDERSON J.L., WALLER D.K., CANFIELD M.A., SHAW G.M., WATKINS M.L., WERLER M.M. Maternal obesity, gestational diabetes, and central nervous system birth defects. **Epidemiology** 16:87-92. 2005.

ARTAL R. Exercise: the alternative therapeutic intervention for gestational diabetes. **Clin Obstet Gynecol** 46:479-487. 2003.

AXELROD F.B., HILZ M.J. Inherited autonomic neuropathies . **Semin Neurol**; 23(4):381-90. 2003.

BATISTA, D.R. Estudo dos receptores purinérgicos em células gliais do gânglio da raiz dorsal. 21fl. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica) Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **J. Comp. Neurol.**, v.277, n.2, p.302-312. 1988.

BEN-HAROUSH A., YOGEV Y., HOD M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. **Diabet Med** 21:103-113. 2004.

BEESON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**. v.353, p.1610-1615. 1999.

BOULTON, A.J.M. Management of Diabetic Peripheral Neuropathy. **Clin Diabetes**. 23: 9-15. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes mellitus. Brasília: MS, 2006.

CATERINA M. J. et al. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. **Science**. 288, 306. 2000.

CATERINA M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. 389, 816. 1997.

CHONG, M. S.; BAJWA, Z. H. Diagnosis and Treatment of Neuropathic Pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 25, Sup. 1, p. S4-S11. 2003.

CODERRE, T.J, EMPEL, I.V. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. I. Comparison of the antinociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. **Pain**. V. 59; p.345-352. 1994.

CODERRE, T.J, VACCARINO, A.L.; MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Research**. V.535; p.155-158. 1990.

COETZEE E.J. Pregnancy and diabetes scenario around the world: Africa. **Int J Gynaecol Obstet** 104 S.1:S39-S41. 2009.

COPRAY J.C., MANTINGH I., BROUWER N., BIBER K., KUST B.M., LIEM R.S., HUITINGA I., TILDERS F.J., VAN DAM A.M., BODDEKE H.W..Expression of interleukin-1beta in rat dorsal root ganglia. **J Neuroimmunol** 118: 203–211, 2001.

CORREA A., GILBOA S.M., BESSER L.M., BOTTO L.D., MOORE C.A., HOBBS C.A., CLEVES M.A., RIEHLE-COLARUSSO T.J., WALLER D.K., REECE E.A. Diabetes mellitus and birth defects. **Am J Obstet Gynecol** 199:237-239. 2008.

COTRAN R., KUMAR V., ROBBINS S. Robins patologia estrutural e funcional. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1996.

COUTINHO T., COUTINHO C.M., DUARTE A.M.B.R., ZIMMERMMANN J.B., COUTINHO L.M. Gestacional diabetes: how to treat? **Femina**, v. 38, n.10, p.517-525. 2010.

DAMM P., NIELSEN L.B. Diabetes: pregnancy in women with type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol.** 6:246-248. 2010.

DAVIES A.M. Neurobiology. Tracking neurotrophin function. **Nature** 368:193-194. 1994.

DAVIS E.M., PECK J.D., THOMPSON D., WILD R.A., LANGLOIS P. Maternal diabetes and renal agenesis/dysgenesis. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.** 88:722-727. 2010.

DOBRETSOV M., ROMANOVSKY D., STIMERS J.R. Early diabetic neuropathy: Triggers and mechanisms. **World J Gastroenterol.** 14; 13(2): 175–191. 2007.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** 107:3, pp. 385-393. 1953.

FEIN, A. Nociceptors: The Cells That Sense Pain. Disponivel em: <<http://www.dol.inf.br/nociceptores>> Petrov P, Francischi JN, Ferreira SH, et al. tradutores. Acesso em 18 de janeiro de 2013. 2011.

FETITA L.S., SOBNGWI E., SERRADAS P., CALVO F., GAUTIER J.F. Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring. **J Clin Endocrinol Metab** 91:3718-3724. 2006.

GASPAR C.N., NASCIMENTO M.J.P. Repercussões da Diabete materna no neonato. **Rev Enferm UNISA;** 5: 57-61. 2004.

GERMANI E., LESMA E., DI GIULIO A.M., GORIO A. Progressive and selective changes in neurotrophic factor expression and substance p axonal transport induced by perinatal diabetes: protective action of antioxidant treatment. **J Neurosci Res** 57:521-528. 1999.

HANNA, F. W. F.; PETERS, J. R. Screening for gestational diabetes: past, present and future. **Diabetic Medicine UK**, v.19, n.5, p.351-8. 2002.

HARPER, A. A AND LAWSON, S. N. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurons. **J. Physiol.** (1985), 359, pp. 31-46. 1985.

HEATH V. Diabetes: Progression of diabetic retinopathy found to be a potential risk during pregnancy. **Nat Rev Endocrinol.** 6:354. 2010.

HILLIER T.A., PEDULA K.L., VESCO K.K., SCHMIDT M.M., MULLEN J.A., LEBLANC E.S., PETTITT D.J. Excess gestational weight gain: modifying fetal macrosomia risk associated with maternal glucose. **Obstet Gynecol.** 112:1007-1014. 2008.

HOLZER P., Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.** 43, 143. 1991.

HONG, S., MORROW T. J., et al. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. **J Biol Chem**, v.279, n.28, Jul 9, p.29341-50. 2004.

HONG, S., WILEY, J.W. Early Painful Diabetic Neuropathy Is Associated with Differential Changes in the Expression and Function of Vanilloid Receptor 1. **The Journal Of Biological Chemistry**. V. 280, No. 1 , pp. 618–627. 2005.

INSTITUTO PAULO BRITO. O Sistema Sensitivo – Prof. Paulo Brito. Disponível em: <http://www.institutopaulobrito.com.br/pdf/pdf_programa_residencia/sistema_sensitivo/visao_geral_sistema_sensitivo.pdf> Acesso em 27 de janeiro de 2013. 2013.

JACKMAN A. E FITZGERALD M., Development of peripheral hindlimb and central spinal cord innervation by subpopulations of dorsal root ganglion cells in the embryonic rat. **Journal of Comparative Neurology.** V. 418, Issue 3, p. 281–298. 2000.

JOVANOVIC, L. Definition, size of the problem, screening and diagnostic criteria: who should be screened, cost-effectiveness, and feasibility of screening. **Int J Gynaecol Obstet.** 104:S17-S19. 2009.

KHAN, G.M, CHEN, S.R., PAN, H.L. Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. **Neuroscience**, v. 114, p. 291-299. 2002.

LEBOWITZ H.E. Goals of treatment. In: Lebowitz H.E, editor. Therapy for diabetes mellitus and related disorders. 3rd ed. Alexandria: American Diabetes Association; p. 1-4. 1998.

LIU, M. e J. N. WOOD. The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of neuropathic pain. **Pain Med**, v.12 Suppl 3, Jul, p.S93-9. 2011.

LOESER, J.D., TREEDE R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n.3, p. 473-477. 2008.

MARINHO, N.B.P., VASCONCELOS, H.C.A., ALENCAR, A.M.P.G., ALMEIDA, P.C., DAMASCENO, M.M.C. Diabetes *mellitus*: fatores associados entre usuários da Estratégia Saúde da Família. **Acta Paulista de Enfermagem**. V.25.N.4. 2012.

METZGER B.E., BUCHANAN T.A., COUSTAN D.R., et al. Summary and recommendations of the fifth International Workshops-conference on gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 30(S2):S251-S260. 2007.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v.57, p.1- 164, n.1. 1999.

MOLLER K.A., JOHANSSON B., BERGE O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **J Neurosci Methods** 84:41-47. 1998.

OCHOA, J.L.; CAMPERO, M.; SERRA, J.; BOSTOCK, H. Hyperexcitable polymodal and insensitive nociceptors in painful human neuropathy. **Muscle & Nerve**, 32: 459-472. 2005.

OLIVEIRA, L. M. As Dores. In: Lent, R. Neurociência da Mente e do Comportamento. 1^a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 8. P. 183-201. 2008.

OKEN E., NING Y., RIFAS-SHIMAN S.L., RADESKY J.S., RICH-EDWARDS J.W., GILLMAN M.W. Associations of physical activity and inactivity before and during pregnancy with glucose tolerance. **Obstet Gynecol** 108:1200-1207. 2006.

OLSSON, Y. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. **Critical Review in Neurobiology**. v.5, n.3, p.265-311. 1990.

PARADA, C.A., TAMBELI, C.H., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced Nociception. **Neuroscience**. V. 102; P.937-944. 2001.

PATEL, N. J., LLEWELYN J. G., et al. Glucose And Leucine Uptake By Rat Dorsal Root Ganglia Is Not Insulin Sensitive. **J Neurol Sci**, V.121, N.2, P.159-62. 1994.

PEDROSA, H. C.; MACEDO, G. C.; RIBEIRO, J. Diabetes Mellitus. Pe Diabetico. In: Lyra, R.; Cavalcanti, N.. Rio De Janeiro: Diaphanic, P.557-68. 2006.

PICKUP, J. C. E WILLIAMS G.M.D. Textbook of Diabetes.1991.

PURVES, D. et al. Neurociências – Cap. 10. 4 Ed. P. 231-250. 2010.

RECIO-PINTO, E., M. M. RECHLER, et al. Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. **J Neurosci**, v.6, n.5, May, p.1211-9. 1986.

ROMANOVSKY, D., DOBRETSOV, M. Pressure-induced pain: Early sign of diabetes-associated impairment of insulin production in rats. **Neuroscience Letters** 483: 110–113. 2010.

ROMANOVSKY, D. HASTINGS, S.L., STIMERS J.R., DOBRETSOV, M. Relevance of hyperglycemia to early mechanical hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetes. **Journal of the Peripheral Nervous System.** V 9, p. 62–69. 2004.

RUOTSALAINEN E., STANCAKOVA A., VAUHKONEN I., SALMENNIEMI U., PIHLAJAMAKI J., PUNNONEN K., LAAKSO M. Changes in cytokine levels during acute hyperinsulinemia in offspring of type 2 diabetic subjects. **Atherosclerosis** 210:536-541. 2010.

RUOTSALAINEN E., VAUHKONEN I., SALMENNIEMI U., PIHLAJAMAKI J., PUNNONEN K., KAINULAINEN S., JALKANEN S., SALMI M., LAAKSO M. Markers of endothelial dysfunction and low-grade inflammation are associated in the offspring of type 2 diabetic subjects. **Atherosclerosis.** 197:271-277. 2008.

SAKURADA, T. KATSUMATA, K., TAN-NO K., SAKURADA, S. KISARA, K. The Capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology.** V.31; p.1279-1285. 1992.

SCHARFMANN, R. Control of early development of the pancreas in rodents and humans: implications of signals from the mesenchyme. **Diabetologia.** V. 43, Issue 9, p. 1083-1092. 2000.

SCHIMID, H., NEUMANN, C., BRUGNARA, L. Diabetes and polyneuropathy of the lower limbs in the perspective of diabetologists. **J Vasc Br**, Vol. 2, N°1. 2003.

SCHMIDT, M. I., DUNCAN B. B., et al. Prevalence of diabetes and hypertension based on self-reported morbidity survey, Brazil, 2006. **Rev Saude Publica**, v.43 Suppl 2, p.74-82. 2009.

SMEYNE R.J., KLEIN R., SCHNAPP A., LONG L.K., BRYANT S., LEWIN A., LIRA S.A., BARBACID M. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. **Nature** 368:246-249. 1994.

SNIDER W.D., WRIGHT D.E. Neurotrophins cause a new sensation. **Neuron**. 16:229-232. 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diabetes na prática clínica (2013). Disponível em: <<http://www.diabetesebook.org.br/modulo-1/2-aspectos-epidemiologicos-do-diabetes-mellitus-e-seu-impacto-no-individuo-e-na-sociedade>> Acesso em 16 de Janeiro de 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso brasileiro de tratamento e acompanhamento do diabete mellitus. Rio de Janeiro: Diagrafic, 2007.

SPRUCE, M.C., POTTER, J., COPPINI, D.V. The pathogenesis and management of painful diabetic neuropathy: a review. **Diabet Med**; 20: 88-98. 2003.

STEMKOWSKI, P.L. E SMITH, P.A. Long-Term IL-1 β Exposure Causes Subpopulation-Dependent Alterations In Rat Dorsal Root Ganglion Neuron Excitability. **J Neurophysiol** 107: 1586–1597. 2012.

SUGIMOTO, K., MURAKAWA Y., et al. Expression And Localization Of Insulin Receptor In Rat Dorsal Root Ganglion And Spinal Cord. **J Peripher Nerv Syst**, V.7, N.1, Mar, P.44-53. 2002.

TORTORA, G.J., GRABOWSKI, S.R. Princípios De Anatomia E Fisiologia. 9^a Ed. Cap 18; P.515-551. 2002.

TOSAKI T., KAMIYA H., YASUDA Y., NARUSE K., KATO K., KOZAKAE M., NAKAMURA N., SHIBATA T., HAMADA Y., NAKASHIMA E., OISO Y., NAKAMURA J. Reduced NGF secretion by Schwann cells under the high glucose condition decreases neurite outgrowth of DRG neurons. **Exp Neurol** 213:381-387. 2008.

VAN BUREN, J. J., S. BHAT, et al. Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. **Mol Pain**, v.1, p.17. 2005.

VINIK, S.I., STROTMEYER, E.S., NAKAVE, A.A., PATEL, C.V. Diabetic Neuropathy in Older Adults. **Clin Geriatr Med**. 24(3): 407–v. 2008.

WENG, H. R.; LEE, J. I.; LENZ, F. A.; SCHWARTZ, A.; VIERCK, C.; ROWLAND, L.; DOUGHERTY, P. M. Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord. **Neuroscience**, v. 101, p. 393-401. 2000.

WILLIS, W. D. JR.; COGGESHALL, R. E. Ascending Sensory Tracts And Their Descending Control. In: Willis W. D.; Coggeshall R. E., ed. **Sensory mechanisms of the spinal cord**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 857-881. 2004.

WITZKE K.A. E VINIK A.I. Diabetic neuropathy in older adults. **Rev Endocr Metab Disord**. 6(2):117-127. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes Programme. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>>. Acesso em 15 de Janeiro de 2013.

YAGIHASHI, S., YAMAGISHI, S. WADA, R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. **Diabetes Res Clin Pract**; 77(1): 184-189. 2007.

YOGEV Y., BEN-HAROUSH A., HOD M. Pathogenesis of gestacional diabetes mellitus in **Textbook of diabetes and pregnancy** (Hod M. et al. ed) pp 39-49. London : Martin Dunitz. 2003.

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain** 16:109-110. 1983.

ZULIANI, V., M. RIVARA, et al. Sodium channel blockers for neuropathic pain. **Expert Opin Ther Pat**, v.20, n.6, Jun, p.755-79. 2010.

Anexo 1: Aprovação pela Comissão de Ética na Utilização de Animais



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 093/11, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Avaliação morfológica e funcional sensorial nociceptivo na prole de ratas com diabetes melito”, sob a responsabilidade da **Professora Doutora Celina Monteiro da Cruz Lotufo**, está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **11 de novembro de 2011**.

(We certify that the protocol nº 093/11, about “Morphologic and functional evaluation of the nociceptive system in the offspring of diabetic rats”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 11/11/2011).

Uberlândia, 11 de novembro de 2011.

Evandro
Prof. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da Comissão de Ética
Na Utilização de Animais

Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA-Comissão de Ética na Utilização de
Animais-Portaria R Nº 1220/2009