

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

**HIPERGLICEMIA INDUZ HIPERALGESIA MECÂNICA E DESPOLARIZAÇÃO
DO POTENCIAL DE REPOUSO DA MEMBRANA DE NEURÔNIOS
NOCICEPTIVOS PRIMÁRIOS: PAPEL DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS
AO ATP**

TAÍS DE CAMPOS LIMA

DOUTORADO

2018

TAÍS DE CAMPOS LIMA

HIPERGLICEMIA INDUZ HIPERALGESIA MECÂNICA E DESPOLARIZAÇÃO DO POTENCIAL DE REPOUSO DA MEMBRANA DE NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS PRIMÁRIOS: PAPEL DOS CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

UBERLÂNDIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L732h
2018 Lima, Taís de Campos, 1989
 Hiperglicemia induz hiperalgesia mecânica e despolarização do potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos primários [recurso eletrônico] : papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP / Taís de Campos Lima. - 2018.

Orientadora: Celina Monteiro da Cruz Lotufo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.489>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. 2. Diabetes. 3. Hiperglicemia. 4. Neuropatias diabéticas. I. Lotufo, Celina Monteiro da Cruz, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Tese de Doutorado Nº 013/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa 3: Fisiopatologia das doenças e dos agravos à saúde.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Mecanismos celulares e moleculares da dor.

Discente: **Taís de Campos Lima** – Matrícula nº **11413CSD021**.

Título do Trabalho: **"A hiperglicemia induz hiperalgesia mecânica e despolarização do potencial repouso da membrana de neurônios nociceptivos primários: papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP."** Às 14:00 horas do dia 27 de agosto do ano de 2018, na sala 112 do Bloco 2A - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Djane Braz Duarte (UNB) por videoconferência, Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues (UFTM), Cassia Regina da Silva (UFU), Renata Graciele Zanon (UFU) e Celina Monteiro da Cruz Lotufo (UFU) – orientadora da discente, presentes no recinto. Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público e concedeu a discente palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a argüir a candidata. Ultimada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata aprovada ()reprovada. Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 18:00 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo *Celina Lotufo*

Profa. Dra. Djane Braz Duarte por videoconferência

Prof. Dr. Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues *Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues*

Profa. Dra. Cassia Regina da Silva *Cassia Regina da Silva*

Profa. Dra. Renata Graciele Zanon *Renata Graciele Zanon*

AGRADECIMENTOS

Não quero fazer um agradecimento curto, pois foram muitos anos e percalços para chegar até aqui, e poucas palavras não são suficientes, aliás, acredito que todas as palavras não são suficientes para exprimir o quanto eu tenho a agradecer. Ainda assim, com certeza irei falhar em reconhecer todos que foram importantes nesse caminho até aqui.

À Deus, meu agradecimento pelas pessoas com as quais ele cercou a minha vida, sem elas, nem se tivesse me sido dada toda a coragem do mundo eu conseguiria.

À Mariah e Catarina. Meu bebê anjo e meu bebê arco-íris. Não dá pra esquecer a linda existência de vocês em minha vida. Ainda que tenha estado por aqui por um tempo curto demais, Mariah mudou minha vida e sem dúvidas é responsável pela pessoa que me tornei hoje. À Catarina só posso agradecer pela sua vida e pelos sorrisos em todos os dias difíceis, e nos fáceis também.

Ao meu marido Raphael quero dizer que não se pode comprar a lealdade, e por isso mesmo a sua é tão importante para mim. Obrigada por ter segurado a minha mão mesmo nos momentos tão difíceis pelos quais tivemos que passar. E agradeço por ter me ajudado a continuar mesmo quando tudo era muito distante. Amo você.

Aos meus pais, Hermes e Solange, agradeço o otimismo sem igual. Vocês são os que sempre acreditam em mim, não importa qual seja o meu propósito ou o quanto a tarefa pareça impossível. Exemplos de dedicação e cuidado. Agradeço ao amor incondicional e ao valor que vocês sempre deram a educação. Sei que esse sonho que estou realizando também é de vocês.

Aos meus irmãos, Hermes, Guilherme e Rafael, por serem alicerces e também exemplos de insistência para conseguir o que se deseja, apesar de tão jovens. Obrigada pela força e torcida que dedicaram a mim.

À minha orientadora e amiga, Professora Celina, por sempre confiar em mim e por tudo que me ensinou até aqui. Obrigada pela paciência e cuidado. Você é sempre um exemplo em tudo que faz. Uma inspiração da profissão que tanto almejo seguir.

A todos os amigos do grupo de pesquisa de dor, pela companhia de todos os dias, companheirismo, risadas, amizade e ajuda nos experimentos. Em especial a Júlia, que tanto me ensinou e ajudou no desenvolvimento desse trabalho, e Maria Vitória e Paulla, pela presença, conversas, por estarem sempre dispostas a tudo.

À minha amiga Débora, por tudo. Por estar sempre comigo, dividir todos os momentos, por ser meu braço direito e às vezes o esquerdo também. Eu jamais teria conseguido sem você.

Aos meus amigos do Arfis, Cristiane, Danielle, Simone, Bruno e tantos outros por todo o apoio e pela companhia diária.

A todos os amigos, em especial Daniel e Moline, pela presença e torcida sempre, apesar da distância física.

Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas UFU por toda a força e apoio.

Aos meus familiares pelas orações.

A todos os professores que passaram pelo meu caminho, por me ensinarem tudo que sei e por serem fontes de inspiração. Um agradecimento especial aos professores do Arfis, pela presença constante na minha vida e porque muitos de vocês contribuíram diretamente para que eu chegasse até aqui. Com muito carinho agradeço a professora Benvinda e professora Ana Paula pelas palavras sempre amigas.

Agradeço também a todos os professores que aceitaram fazer parte da minha banca de Doutorado, pelas contribuições para esse trabalho.

À Mariani, pelo suporte técnico e amizade.

Aos funcionários da Universidade Federal de Uberlândia, instituição que me acolheu tão especialmente, muito obrigada.

Meu agradecimento a todos vocês!

*“Um leitor vive mil vidas antes de morrer,
o homem que nunca lê vive apenas uma”*

George R.R. Martin

RESUMO

Introdução: A diabetes é um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia e é um problema crescente e relevante de saúde pública. A hiperglicemia crônica resulta no desenvolvimento de neuropatia diabética, que muitas vezes ocasiona dor crônica difícil de ser tratada. Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de neuropatia diabética dolorosa não são bem conhecidos, mas alguns estudos sugerem que alterações nos canais iônicos de neurônios nociceptivos parecem estar envolvidas. **Objetivos:** Estudar o efeito direto da hiperglicemia sobre o potencial de repouso de neurônios nociceptivos primários e sobre o limiar mecânico nociceptivo, além de investigar o envolvimento dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) nesses processos. **Material e Métodos:** Foram realizadas culturas primárias de neurônios dos gânglios da raiz dorsal (GRD) de ratos adultos e as variações no potencial de membrana foram registradas por microscopia confocal através da variação de fluorescência emitida pelos neurônios na presença do indicador DiBAC₄(3). Avaliou-se o efeito da administração de glicose em diferentes concentrações, insulina, um bloqueador de canais K^+_{ATP} , a glibenclamida, e um ativador de canais K^+_{ATP} , o diazóxido nos neurônios em cultura. Também foi avaliado o limiar de sensibilidade mecânica de animais tratados *in vivo* com injeção intraganglionar (L5) de diferentes concentrações de glicose, manitol e diazóxido, utilizando o teste von Frey eletrônico. **Resultados:** Altas concentrações de glicose (300, 450 e 600 mg/dL) causaram despolarização de neurônios do gânglio da raiz dorsal em cultura de maneira dependente de concentração, e essa alteração no potencial de repouso das células não ocorreu devido a adição de uma solução hiperosmótica, o que foi comprovado com a administração de uma solução isosmótica de glicose (600 mg/dL). *In vitro*, a administração de insulina (1 μ M) inibiu a despolarização induzida por glicose, assim como o diazóxido (10 μ M), um ativador de canais K^+_{ATP} . Glibenclamida (10 μ M), um bloqueador de canais K^+_{ATP} , provocou despolarização dos neurônios em cultura assim como a glicose. A injeção de altas concentrações de glicose por via intraganglionar (L5), *in vivo*, induziu um estado de hiperalgesia nos animais. A injeção do ativador diazóxido (10 μ M) aumentou o limiar de sensibilidade mecânica que havia diminuído com a injeção de glicose. A injeção de solução hiperosmótica de manitol, que é inerte metabolicamente, não provocou alterações no limiar mecânico, indicando que alterações na osmolaridade não são responsáveis pelo efeito da glicose *in vivo*. **Conclusão:** Em conclusão, esse estudo sugere que os canais K^+_{ATP} expressos nos neurônios sensoriais periféricos podem estar envolvidos no desenvolvimento da neuropatia diabética periférica. Como as sulfonilureias (como a glibenclamida, por exemplo),

que agem bloqueando a abertura de canais K^+_{ATP} são usadas no tratamento de pacientes com diabetes tipo 2, é muito importante avaliar os possíveis efeitos colaterais de tais drogas nos neurônios sensoriais primários.

Palavras chave: canais K^+_{ATP} , diabetes, gânglio da raiz dorsal, hiperglicemia, neuropatia, nocicepção.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, which is growing and relevant problem for public health. Chronic hyperglycemia eventually results in the development of diabetic neuropathy, which often causes chronic pain, difficult to treat. The mechanisms responsible for the development of painful diabetic neuropathy are not well known, but some studies suggest that alterations in ion channels expressed by nociceptive neurons might be involved. **Objectives:** To study the direct effect of hyperglycemia on the resting membrane potential of primary nociceptive neurons and the nociceptive mechanical threshold in rats. To investigate the involvement of potassium channels sensitive to ATP (K^+_{ATP}) in this process. **Material and methods:** Variations in membrane potential were recorded by confocal microscopy using the fluorescence variation emitted by primary cultured neurons of the dorsal root ganglia in the presence of the fluorescent indicator DiBAC₄(3). It was tested the effect of different glucose concentrations, insulin, the K^+_{ATP} channel blocker glibenclamide, and the K^+_{ATP} channel activator diazoxide. The mechanical sensitivity threshold of rats treated *in vivo* with intraganglionic injection (L5) of different concentrations of glucose, mannitol and diazoxide was evaluated using the electronic von Frey test. **Results:** High glucose concentrations (300, 450 and 600 mg/dL) induced depolarization of dorsal root ganglion neurons in culture in a concentration-dependent manner. Changes in resting membrane potential were not due to the addition of a hyperosmotic solution, which was tested by the administration of an isosmotic glucose solution (600 mg/dL). *In vitro*, insulin administration (1 μ M) inhibited glucose-induced depolarization as well as diazoxide (10 μ M), a K^+_{ATP} channel opener. Glibenclamide (10 μ M), a K^+_{ATP} channel blocker, caused depolarization of cultured neurons. Intraganglionic injection (L5) of high concentrations of glucose, *in vivo*, induced a state of hyperalgesia detected by a reduced mechanical threshold. Co-administration of diazoxide (10 μ M) inhibited glucose induced hyperalgesia. Injection of hyperosmotic solution of mannitol, which is metabolically inert, did not cause changes in the mechanical threshold, indicating that changes in osmolarity are not responsible for the effect of glucose *in vivo*. **Conclusion:** Results suggest that closure K^+_{ATP} channels expressed in peripheral sensory neurons are responsible for a direct glucose effect on nociceptive neurons and, therefore, might be involved in the development of diabetic painful neuropathy. Since sulfonylureas (like glibenclamide, for example) that act by blocking K^+_{ATP} are used to treat type 2 diabetic

patients, it is important to evaluate possible side effects of such drugs at primary sensory neurons.

Key words: diabetes, dorsal root ganglia, hyperglycemia, K^+ _{ATP} channels, neuropathy, nociception.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Injeção intraganglionar. A) Material utilizado para fazer a injeção direta (seringa de vidro, cateter e agulha gengival. B) Animal anestesiado recebendo a injeção da droga via intraganglionar.....38

Figura 2: Cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal. Imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando o indicador fluorescente DiBAC₄(3) (Molecular Probes). A: Fluorescência basal. B: Após 10 minutos da administração de glicose 600 mg/dL. C: Após 2 minutos da administração de capsaicina. As setas indicam neurônios representativos do aumento de fluorescência. Aumento 400x..... 40

Figura 3: Efeito da glicose no potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos em cultura. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração de glicose a uma concentração final de 300, 450 ou 600 mg/dL. Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μ M) foram considerados para análise. Dados apresentados como média \pm E.P.M de 31 a 125 neurônios. ***p<0.0001; **p<0.001. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).
..... 41

Figura 4: Despolarização induzida pela glicose em neurônios sensoriais primários. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração de glicose a uma concentração final de 600 mg/dL, em Hank's ou H₂O. Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μ M) foram considerados para análise. Dados apresentados como média \pm E.P.M de 34 a 125 neurônios. ***p<0.0001. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni)..... 42

Figura 5: Efeito da glicose na despolarização celular na presença do abridor do canal K⁺_{ATP}. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração de glicose (450 ou 600 mg/dL) ou glicose mais

diazóxido (10 μ M). Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μ M) foram considerados para análise. Dados apresentados como média \pm E.P.M de 20 a 125 neurônios. **p<0.05. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).43

Figura 6: Efeito do diazóxido no potencial de repouso de neurônios nociceptivos periféricos. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração diazóxido (10 μ M). Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μ M) foram considerados para análise. Dados apresentados como média \pm E.P.M de 40 a 125 neurônios. ***p<0.0001. (Dados avaliados por teste t).....44

Figura 7: Efeito do diazóxido (10 μ M) sobre o potencial de repouso de um neurônio nociceptivo periférico. O efeito foi avaliado durante 10 minutos e imediatamente após a administração da droga.45

Figura 8: Efeito da glicose na despolarização celular na presença de um bloqueador do canal K⁺_{ATP}. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração de glicose (600 mg/dL) ou glicose mais glibenclamida (10 μ M) ou glibenclamida sozinha. Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μ M) foram considerados para análise. Dados apresentados como média \pm E.P.M de 18 a 125 neurônios. ***p<0.0001. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).46

Figura 9: Insulina inibe a despolarização celular induzida por glicose. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração de glicose (600 mg/dL) ou glicose mais insulina (1 μ M). Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μ M) foram considerados para análise. Dados apresentados como média \pm E.P.M de 14 a 125 neurônios. *p<0.05. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).....47

Figura 10: Efeito da insulina no potencial de repouso de neurônios nociceptivos periféricos. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10

minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração insulina (1 μ M e 10 μ M). Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μ M) foram considerados para análise. Dados apresentados como média \pm E.P.M de 48 a 125 neurônios. * p <0.05. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni). 48

Figura 11: Efeito da insulina (10 μ M) sobre o potencial de repouso de um neurônio nociceptivo periférico. O efeito foi avaliado durante 10 minutos e imediatamente após a administração da droga. 49

Figura 12: Efeito dependente da concentração de glicose no limiar de sensibilidade mecânica. É mostrado o limiar de sensibilidade mecânica, em gramas, de glicose (300, 450 ou 600 mg/dL), manitol (600 mg/dL) ou administração de veículo (solução salina) nos gânglios da raiz dorsal (L5 direito, 5 μ L). Dados apresentados como médias \pm E.P.M. 6 animais por grupo. * p <0.05. (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni)..... 50

Figura 13: Efeito da glicose no limiar de sensibilidade mecânica na presença do abridor de canal K^+_{ATP} . É mostrado o limiar de sensibilidade mecânica, em gramas, da administração de glicose (600 mg/dL), glicose (600 mg/dL) mais diazóxido (10 μ M), diazóxido (10 μ M) ou veículo (DMSO 1% em solução salina) nos gânglios da raiz dorsal (L5 direito, 5 μ L). Dados apresentados como médias \pm E.P.M. 6 animais por grupo. * p <0.05. (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni). 51

Figura 14: Efeito da injeção intraganglionar no gânglio L5 direito no limiar de sensibilidade mecânica da pata traseira esquerda do animal. É mostrado o limiar de sensibilidade mecânica, em gramas, da administração de glicose (300, 450 ou 600 mg/dL), manitol (600 mg/dL), glicose (600 mg/dL) mais diazóxido (10 μ M), diazóxido (10 μ M) ou veículo (solução salina) nos gânglios da raiz dorsal (L5 direito, 5 μ L). Dados apresentados como médias \pm E.P.M. 6 animais por grupo. * p <0.05. (ANOVA)..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGEs	Produtos de glicação avançada
ADP	Adenosina difosfato
Akt	Proteína cinase B
ANOVA	Análise de variância
ASIC	Canal iônico sensível a ácido
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DiBAC ₄ (3)	Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)TrimethineOxonol
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
GLUT2	Transportador de glicose 2
GRD	Gânglio da raiz dorsal
HbA1c	Hemoglobina glicada
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etanolsulfônico
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
I.Ig	Injeção intraganglionar
K ⁺	Potássio
K ⁺ _{ATP}	Canal de potássio sensível a ATP
Kir	Canal de potássio retificador de influxo
L5	5º Gânglio da raiz dorsal região lombar
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
Na ⁺	Sódio
Na ⁺ TTX-R	Canal de sódio resistente a tetrodotoxina
NaCl	Cloreto de sódio
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (oxidado)
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (reduzido)
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
Nav	Canal de sódio dependente de voltagem
NO	Óxido nítrico

P2X	Canal sensível a ATP
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PKB	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
RNA	Ácido ribonucleico
SP	Substância P
Sur	Receptor sulfonilureia
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPV1 e TRPV4	Receptor de potencial transitório vanilóide1 e 4

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 Diabetes mellitus.....	21
2.1.1 Conceitos gerais	21
2.1.2 Classificação e diagnóstico	21
2.1.3 Metabolismo da glicose nas células	23
2.1.4 Insulina	24
2.1.5 Efeitos crônicos da hiperglicemia	25
2.1.6 Neuropatia Diabética.....	26
2.2 Sistema sensorial nociceptivo	28
2.2.1 Dor e nocicepção	28
2.2.2 Nociceptores, transdução, transmissão e vias nociceptivas	28
2.2.3 Sensibilização de neurônios nociceptivos periféricos	30
2.2.4 Canais de potássio	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Animais	34
4.2 Drogas	34
4.3 Experimentos <i>in vitro</i>	35
4.3.1 Cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal	35
4.3.2 Microscopia Confocal	36
4.4 Experimentos <i>in vivo</i>	37
4.4.1 Administração intraganglionar de drogas	37
4.4.2 Teste de avaliação da sensibilidade mecânica.....	38
4.5 Análise estatística	39

5. Resultados.....	40
5.1 Alteração induzida pela glicose no potencial de membrana dos neurônios dos gânglios da raiz dorsal.....	40
5.2 Envolvimento dos canais K^+_{ATP} na despolarização induzida por glicose nos neurônios sensoriais primários	42
5.2.1 Ativação farmacológica dos canais K^+_{ATP} com diazóxido	42
5.2.2 Inativação farmacológica dos canais K^+_{ATP} com glibenclamida	45
5.3 A administração de insulina reduz a despolarização celular induzida por glicose	46
5.4 Diminuição do limiar nociceptivo induzida por glicose	49
5.5 O abridor de canais K^+_{ATP} bloqueia o aumento da sensibilidade induzida por glicose ..	50
6. Discussão	53
7. Conclusão	58
Referências	59
Anexo I: Aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais/UFU	69

1. INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizado pela hiperglicemia resultante de distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, em função de defeitos na secreção de insulina e/ou da ação da insulina em órgãos alvo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). A diabetes é um relevante e crescente problema de saúde para os países independente do grau de desenvolvimento. Em 2015, a Federação Internacional de Diabetes estimou cerca de 8,8% da população mundial entre 20 e 79 anos vivendo com diabetes. Persistindo essa estimativa, o número de pessoas com diabetes será superior a 629 milhões em 2045 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

As neuropatias diabéticas constituem as complicações crônicas mais prevalentes entre indivíduos com diabetes, afetando mais de 50% dos doentes. Elas são caracterizadas por sinais de disfunção em nervos do sistema nervoso periférico e/ou autonômico, com manifestações clínicas muito variadas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017), que vão desde sensibilidade diminuída até sensibilidade aumentada (POP-BUSUI et al., 2017).

A alta glicemia do diabetes *mellitus* causa um acréscimo da concentração de glicose, sorbitol e frutose no nervo periférico, gerando um edema osmótico no nervo, redução na síntese de acetilcolina, decomposição das células de Schwann e da bainha de mielina. Tudo isso ocasiona alterações na velocidade de condução e outras mudanças na condução aferente e eferente (PICKUP & WILLIAMS, 1991). Além disso, a formação de produtos de glicação avançada por meio de ligações não enzimáticas causa uma série de prejuízos na função da célula, inclusive no processo de transcrição e sinalização celular (BARBOSA et al., 2009). Portanto, a perda de sensações parece ocorrer devido à desmielinização e degeneração axonal (DOBRETSOV et al., 2007). O mecanismo responsável pelo aumento de sensações somestésicas, como a dor neuropática, no entanto, é menos compreendido.

Alguns estudos apontam que efeitos diretos sobre os neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal podem ocasionar a dor neuropática, como trabalhos que sugerem que 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).

Além dos efeitos crônicos da hiperglicemia que levam ao desenvolvimento da neuropatia diabética, alguns estudos sugerem que, tanto a hiperglicemia (ROMANOVSKY et

al., 2004; VINCENT et al., 2005a; VINCENT et al., 2005b; RUSSEL et al., 1999) quanto a insulinemia ou insulinopenia (ROMANOVSKY et al., 2006; BRUSSEE et al., 2004), podem atuar diretamente promovendo efeitos rápidos nos neurônios sensoriais, possivelmente alterando o limiar de excitabilidade neural.

Visto isso, nesse estudo avaliamos se as alterações de potencial de repouso da membrana neuronal ocorrem em decorrência da abertura ou fechamento de canais de potássio sensíveis a ATP (K^+_{ATP}) em mecanismo semelhante ao que ocorre nas células β -pancreáticas, onde o papel desse canal está bem definido (ASHCROFT, 2006; SMITH et al., 2007). Além disso, já se sabe da importância desses K^+_{ATP} em neurônios, onde participam da manutenção do potencial de repouso da membrana e na analgesia periférica induzida por opióides (CUNHA et al., 2010; 2012). Portanto, glicose e insulina poderiam atuar por meio dos K^+_{ATP} , sendo que a hiperglicemia poderia induzir uma despolarização enquanto que a insulina induziria uma hiperpolarização da membrana neuronal, utilizando esses canais. Sendo assim, os canais de potássio sensíveis ao ATP nos neurônios sensoriais podem ser importantes para o desenvolvimento da neuropatia diabética e possivelmente um alvo terapêutico para a prevenção ou tratamento desta complicação crônica associada ao diabetes.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Diabetes mellitus

2.1.1 Conceitos gerais

A diabetes é um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia e associadas a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos. Pode resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, por exemplo, destruição das células β -pancreáticas, resistência à ação da insulina, distúrbios da secreção da insulina, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O aumento da prevalência da diabetes está associado a diversos fatores, como por exemplo, a acelerada urbanização, transição epidemiológica, transição nutricional, estilo de vida sedentário, maior frequência de excesso de peso, crescimento, envelhecimento populacional e, também, à maior sobrevivência dos indivíduos com diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Em 2017, o Brasil se destacou entre outros países com um alto número de pessoas diabéticas contando com 12,5 milhões de casos em indivíduos com idade entre 20 e 79 anos, uma prevalência de 8,7%, sendo que esse número pode passar de 20 milhões em 2045 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Além disso, os gastos em saúde pública têm aumentado já que um indivíduo diabético representa um gasto em média duas vezes maior que uma pessoa que não tem diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Sendo assim, a diabetes é considerada um dos problemas de saúde pública com maior importância em nível mundial, pela elevada prevalência, morbidade e mortalidade (GUARIGUATA et al., 2014).

2.1.2 Classificação e diagnóstico

DM é uma doença crônica e complexa que requer cuidados médicos contínuos. O DM pode ser subdividido em vários tipos etiológicos, sendo o DM tipo 1 (DM1) e o DM tipo 2 (DM2) os mais prevalentes (DE OLIVEIRA et al., 2017).

Outro tipo de diabetes encontrado com maior frequência e cuja etiologia ainda não está esclarecida é o diabetes gestacional, que, em geral, é um estágio pré-clínico de diabetes, detectado no rastreamento pré-natal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A Diabetes *mellitus* tipo 1 é caracterizada pela destruição das ilhotas de Langerhans e das células secretoras do tipo β no pâncreas mediada por resposta imune, e seu tratamento é baseado na reposição de insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017). Os sintomas da diabetes incluem aumento da sede e da micção, perda de peso, fadiga, visão turva, aumento da fome e feridas que não cicatrizam (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

A DM1 corresponde de 5% a 10% do total de casos, é mais comum entre crianças e jovens de ambos os sexos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Ela se subdivide em DM1A, confirmada pela positividade de um ou mais autoanticorpos e relacionada ao antígeno leucocitário humano (HLA) e a resposta autoimune é desencadeada por predisposição genética e fatores ambientais (TEDDY, 2008) e DM1B, na qual não são detectados autoanticorpos, sendo considerada idiopática (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

A Diabetes *mellitus* tipo 2 corresponde a 90% - 95% dos casos de diabetes, ela possui etiologia complexa e multifatorial e envolve componentes genéticos e ambientais (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017). DM2 resulta de uma deficiência relativa de insulina, devido a resistência à insulina, que acontece quando tecidos muscular, adiposo e hepático não respondem de forma adequada à ela. Assim, a captação de glicose é diminuída e a gliconeogênese continua sem regulação, resultando na elevação dos níveis de glicose no sangue. A resistência à insulina está intimamente associada à obesidade e ao aumento dos níveis circulantes de ácidos graxos livres e secreções de adipocinas (isto é, o mediador pró-inflamatório TNF- α) que inibem a sinalização de insulina (KAHN et al., 2006; MUOIO; NEWGARD, 2008). Inicialmente pode haver um aumento da produção de insulina para compensar, ocasionando hiperinsulinemia, mas, eventualmente a produção fica insuficiente devido a disfunção das células β -pancreáticas, com a evolução da doença, o que resulta em um ambiente hiperglicêmico (MUOIO; NEWGARD, 2008).

A diabetes gestacional se refere à intolerância aos carboidratos de gravidade variável que se inicia durante a gestação (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Durante o período de gestação ocorre aumento da resistência à insulina, pois há influência de hormônios que são produzidos pela placenta e são necessários 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 (BEN-HAROUSH et al., 2004).

A DM é diagnosticada usando testes para avaliar os níveis de glicose no sangue, incluindo a glicemia de jejum, um teste oral de tolerância à glicose, e níveis de hemoglobina A1C (HbA1C) ou hemoglobina glicada. Os pacientes são diagnosticados com diabetes se a glicemia de jejum de 8 horas estiver acima de 126 mg/dL, enquanto pacientes com níveis entre 100 mg/dL e 125 mg/dL são considerados com intolerância à glicose e pré-diabéticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). Se o valor da glicose no sangue for de 99 mg/dL ou abaixo (até o limite de 70 mg/dL) é considerado normal. Além disso, a diabetes também pode ser diagnosticada se os níveis de glicose no sangue permanecerem acima de 200 mg/dL 2 horas após um teste oral de 75g de tolerância à glicose ou se HbA1C estiver acima de 6,5 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

2.1.3 Metabolismo da glicose nas células

A entrada de glicose nas células beta é facilitada pelo transportador GLUT2. Uma vez que a glicose entra nas células β -pancreáticas, ela é fosforilada em Glicose-6-fosfato pela glicocinase. O metabolismo de Glicose-6-P nas células β -pancreáticas aumenta a proporção de ATP/ADP e induz o fechamento de canais de potássio sensíveis ao ATP. Isto resulta na despolarização da membrana celular, que promove abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, ativando a exocitose de vesículas contendo a insulina (KOEPPEN et al., 2009; SZETO et al., 2018).

Estudos indicam que o mesmo mecanismo de despolarização induzido por glicose nas células beta pode ocorrer em alguns neurônios sensoriais. O trabalho de Zhou et al. (2011) mostrou que a inibição de motilidade gástrica induzida por hiperglicemia ocorre devido ao fechamento de canais K^+_{ATP} presentes em neurônios sensoriais primários do gânglio nodoso. Caso o mesmo efeito ocorra em neurônios sensoriais nociceptivos pode-se esperar um aumento da excitabilidade e, portanto, uma diminuição do limiar para estímulos dolorosos. Sabemos que os canais K^+_{ATP} estão presentes especificamente nestes neurônios visto que a abertura destes parece ser o mecanismo responsável pelo efeito analgésico periférico de opióides e da dipirona (RODRIGUES E DUARTE, 2000; CUNHA et al., 2012, 2010) e que esta ativação hiperpolariza ou impede a despolarização neuronal (CUNHA et al., 2010).

2.1.4 Insulina

A insulina é um hormônio sintetizado pelas células β -pancreáticas, que estão localizadas nas ilhotas de Langerhans do pâncreas. É o principal hormônio regulador do metabolismo da glicose e seus receptores estão presentes em diversos tecidos. Ela é produzida como pré-pró-insulina e no retículo endoplasmático rugoso dá origem a pró-insulina, que é transportada ao complexo de Golgi até a formação de grânulos de secreção, sendo que nessa última parte do transporte ocorre mais uma clivagem e a pró-insulina se transforma em insulina, que fica armazenada até que algum estímulo promova a sua exocitose (ORÍÁ & BRITO, 2016).

O receptor de insulina (IR) é um receptor do tipo tirosina cinase que leva a ativação de uma série de cinases com subsequente fosforilação de proteínas intracelulares. Dentre as vias intracelulares ativadas pelo receptor de insulina, merece destaque a ativação da enzima fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI3K) que fosforila e ativa a proteína Akt/PKB (BURGERING; COFFER, 1995). A Akt tem um papel importante no controle do crescimento, da proliferação, do metabolismo, da apoptose e da migração celular, porque é responsável pela fosforilação de diversas proteínas (ORÍÁ & BRITO, 2016). Um estudo de Kim et al. em 2011 demonstrou que a ativação de IR em neurônios do gânglio da raiz dorsal leva à fosforilação de Akt e ainda que a hiperinsulinemia induz uma diminuição da atividade desta via de sinalização celular, o que indica que a hiperinsulinemia pode causar um processo de resistência insulínica também nestes neurônios periféricos.

O fato desta via de sinalização poder ser ativada pela insulina em neurônios nociceptivos é de particular interesse. Em estudos de Cunha et al., em 2010 e 2012, foi verificado que a via de sinalização PI3K/Akt é responsável pelo efeito analgésico periférico induzido por opióides em ratos e camundongos. Nestes trabalhos foi demonstrado que a ativação de receptores opióides leva à ativação da via PI3K/Akt com subsequente ativação da enzima óxido nítrico sintase e produção de óxido nítrico (NO). O NO, por sua vez, promove a abertura de canais K^+ _{ATP} que leva à hiperpolarização da membrana neuronal e consequente diminuição na excitabilidade dos neurônios nociceptivos. Visto que a mesma via de sinalização é ativada pelo receptor de insulina, podemos inferir que a insulina também pode ser capaz de promover a abertura de canais e, possivelmente, aumentar o limiar de ativação dos neurônios nociceptivos.

Em resumo, resultados anteriores indicam que a hiperglicemia possivelmente leve ao fechamento de canais K^+_{ATP} e que a insulina tenha o efeito inverso em neurônios nociceptivos periféricos.

2.1.5 Efeitos crônicos da hiperglicemia

A hiperglicemia crônica é o principal desencadeador das complicações da DM e acarreta alterações fisiológicas e metabólicas (FERREIRA et al., 2011).

O aumento da glicose sérica permite formação endógena dos produtos de glicação avançada (AGEs), e eles são responsáveis por complicações macrovasculares, incluindo danos celulares e teciduais, pois englobam moléculas sintetizadas a partir de interações aminocarbonilo, de origem não-enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (BARBOSA et al., 2009). O processo de glicação é também conhecido como reação de Maillard, que se inicia com a formação da base de Schiff (grupo carbonila de açúcar redutor se une a um grupamento amino), que sofre rearranjos, formando os produtos de Amadori, como a hemoglobina glicada e a frutossamina, e esses produtos possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos amins formando os produtos avançados da reação de Maillard ou produtos de glicação avançada (BIERHAUS et al., 1998; MONNIER, 2003). Os AGEs tem a capacidade de se ligar a receptores na membrana das células (PONTES et al., 2007). O prejuízo para a célula também pode ser devido a modificações das estruturas intracelulares, envolvidas com a transcrição gênica, alteração da sinalização entre as moléculas da matriz extracelular e a célula (AGEs interagem com proteínas da matriz) e pelas mudanças das proteínas ou lipídeos plasmáticos (BARBOSA et al., 2009).

Esse processo de glicação aumentado, também acontece no interior da célula beta pancreática, levando a secreção de insulina glicada, que tem atividade biológica reduzida, ou seja, esse processo também deve contribuir para ocorrência de resistência a insulina (MCKILLOP et al., 2002).

A hiperglicemia pode afetar também a transdução da sinalização celular, em particular, a ativação do diacilglicerol e a proteína cinase C que são moléculas sinalizadoras responsáveis por várias funções na célula (que inclusive podem alterar a produção de RNA mensageiro). O estado de hiperglicemia também aumenta o stress oxidativo pela ativação dependente da proteína cinase sobre a NADPH oxidase, que gera radicais livres em neutrófilos e outros fagócitos (AZEVEDO, 1986; MEALEY; OCAMPO, 2007).

Além dos prejuízos causados pela hiperglicemia via glicação não-enzimática de proteínas, existem também os prejuízos causados pela via dos polióis, com formação de sorbitol, e que só acontece nas células que são sensíveis a insulina, como por exemplo os neurônios. Nesse caso, a glicose livre forma sorbitol, que não tem transportadores e se acumula na célula, sendo lentamente metabolizado em frutose, que também fica acumulada no interior da célula, ocorrendo assim um aumento da pressão osmótica intracelular e subsequente lesão da célula e apoptose (AZEVEDO, 1986).

2.1.6 Neuropatia Diabética

A neuropatia diabética é definida como sendo a complicação mais comum da diabetes e, de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde, “abrange um conjunto de síndromes clínicas que afetam o Sistema Nervoso Periférico sensitivo, motor e autonômico, de forma isolada ou difusa, nos segmentos proximal ou distal, de instalação aguda ou crônica, de caráter reversível ou irreversível, manifestando-se silenciosamente ou com quadros sintomáticos extremos” e que afeta de 30% a 50% das pessoas com diabetes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; FELDMAN et al., 2017). No Sistema Nervoso Sensorial a neuropatia diabética pode se manifestar tanto com redução ou com aumento da sensibilidade (POP-BUSUI et al., 2017).

O desenvolvimento da neuropatia é multifatorial e pode inclusive envolver doenças prévias. Uma das principais vias de desenvolvimento é o acúmulo de sorbitol ocasionado pelo ambiente hiperglicêmico, que resulta em alteração do equilíbrio osmótico e acúmulo de espécies reativas de oxigênio devido a diminuição da disponibilidade de NADPH (que atua em sistemas enzimáticos antioxidantes) (KUZUMOTO et al., 2006). Além disso, o metabolismo do sorbitol em frutose e a oxidação dessa substância gera um composto reativo que pode levar a formação de AGEs, além de reduzir NAD^+ a NADH (AZEVEDO, 1986). NADH inibe gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, aumentando as concentrações de trioses fosfato, que formam um precursor intracelular de AGEs e que leva a formação de diacilglicerol e consequente ativação da proteína cinase C (PKC), que leva a indução ou inibe a expressão de vários genes na célula (OLIVEIRA et al., 2013).

Outra via possível para o desenvolvimento de neuropatias é a formação dos produtos de glicação avançada devido ao ambiente hiperglicêmico, produtos esses, que, como explicado anteriormente podem alterar as funções de algumas proteínas, se ligar a receptores

na membrana de outras células e modificar liberação de hormônios e citocinas e também se ligar a proteínas da matriz extracelular e alterar a transdução de sinal (BROWNLEE, 1995).

A neuropatia diabética é caracterizada também, em vários casos, pela desmielinização segmentar e degeneração axonal dos neurônios periféricos, que acompanham alterações funcionais, como a redução da condução nervosa e também do fluxo sanguíneo (BARBOSA et al., 2008). Enquanto a sensibilidade reduzida parece ocorrer principalmente devido a esses mecanismos (DOBRETsov et al., 2007), o mecanismo responsável pelo aumento nas sensações somestésicas, como a dor neuropática, entretanto, é pouco compreendido.

Alterações na expressão ou função de canais iônicos parecem ser os principais mecanismos responsáveis por produzir as variações de sensibilidade observadas nas desordens neuropáticas (para revisão, LIU; WOOD, 2011; ZULIANI et al., 2010). Além dos efeitos crônicos da hiperglicemia que levam ao desenvolvimento da neuropatia diabética, alguns estudos sugerem que tanto a hiperglicemia (ROMANOVSKY et al., 2004; VINCENT et al., 2005a; VINCENT et al., 2005b; RUSSEL et al., 1999) quanto a insulinemia ou insulinoopenia (ROMANOVSKY et al., 2006; BRUSSEE et al., 2004), podem atuar diretamente nos neurônios sensoriais alterando o limiar de excitabilidade neural.

Já é conhecido que a sensibilização periférica envolve alterações bioquímicas nos nociceptores periféricos, como alguns íons e prostaglandinas, por exemplo (MÁRQUEZ, 2006). Vários canais podem estar envolvidos na fisiopatogênese dessa doença, como os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav), que fazem parte da propagação do estímulo doloroso e alguns estudos apontam um aumento da expressão desses canais em neurônios do gânglio da raiz dorsal (SUN et al., 2012; CUMMINS et al., 2004). Alterações em correntes ou na expressão dos canais de Na^+ TTX-R, que são característicos de nociceptores, também foram observadas na neuropatia diabética (HONG; WILEY, 2005; HONG et al., 2004).

Ou seja, a excitação dos neurônios somatossensoriais periféricos é o primeiro passo da geração da maioria dos sinais de dor, e essa excitação é controlada por um intrincado conjunto de canais iônicos que trabalham juntos e de forma coordenada (DU; GUMPER, 2013), sendo assim, qualquer desequilíbrio nesse sistema pode ocasionar problemas que levam o desenvolvimento de neuropatias. Portanto, a etiologia da neuropatia diabética é muito complexa e com vários fatores implicados no seu desenvolvimento (LEITE et al., 2017).

Sendo assim, é muito importante estudar os efeitos diretos da alta concentração de glicose e da insulina nos neurônios periféricos e ainda estudar o envolvimento dos canais K^+ _{ATP} nesse processo, já que são prováveis de estarem ligados aos mecanismos de desenvolvimento de neuropatia diabética periférica.

2.2 Sistema sensorial nociceptivo

2.2.1 Dor e nocicepção

A dor é definida pela Associação Internacional de Estudo para a Dor (IASP) como “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Já a nocicepção é o processo neural de codificação e processamento do estímulo nocivo (NAIDU; PHAM, 2015).

2.2.2 Nociceptores, transdução, transmissão e vias nociceptivas

As terminações nervosas que iniciam a sensação de dor originam-se de corpos celulares nos gânglios das raízes dorsais ou no gânglio do trigêmeo, que emitem um processo axonal para a periferia (inervam um órgão alvo, como a pele) e outro para dentro da medula espinhal ou tronco encefálico, ou seja, eles apresentam uma morfologia pseudo-unipolar e são chamados de nociceptores (PURVES et al., 2010; PLATANO et al., 2008; BENNETT; WOODS, 2014). O termo nociceptor foi originalmente inventado para descrever neurônios sensoriais que detectam estímulos de alto limiar que causam ou tem potencial para causar lesão tecidual (SHERINGTON, 1903).

Os estímulos dolorosos, ou nociceptivos, se iniciam nas terminações nervosas livres dispostas na pele, tecido muscular, paredes articulares e viscerais e são veiculados por fibras nervosas mielinizadas $A\beta$ e $A\delta$ e fibras não mielinizadas do tipo C, cada uma com propriedades distintas e que permitem a resposta e a transmissão de diferentes tipos de informações sensoriais (PERENA et al., 2000).

As fibras $A\delta$, que são mielinizadas, respondem à estimulação mecânica, mas podem ser sensibilizadas pelo calor, enquanto as fibras do tipo C, não mielinizadas, respondem tanto aos estímulos térmicos quanto aos mecânicos e químicos, sendo classificadas, por isso, como nociceptores polimodais (OLIVEIRA, 2008). As fibras $A\beta$, que tem alta velocidade de condução, são encarregadas de detectar estímulos inócuos aplicados à pele, músculos e articulações, sendo responsáveis por sensações táteis e proprioceptivas (OLIVEIRA, 2008).

Os axônios que formam os 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, e tem uma fina camada de mielina, ou, o que é mais comum, não mielizados (PURVES et al., 2010). De tal modo, axônios que

conduzem informação nociceptiva estão no grupo A δ de axônios mielinizados, com velocidade de 5-30 m/s, ou no grupo de fibras C de axônios não mielinizados, com velocidade de condução menor do que 2 m/s. Dessa maneira, temos vias de condução rápida e lenta, caracterizando dois tipos de dor, a dor rápida e a dor lenta (PURVES et al., 2010).

Na membrana plasmática dos nociceptores existem famílias de proteínas transmembrana que constituem receptores e canais que participam da transdução de sinais nociceptivos (OLIVEIRA, 2008). Estas células expressam nos seus terminais periféricos canais iônicos sensíveis a estímulos mecânicos e térmicos de alta intensidade, além de canais sensíveis a alterações de pH, e sensíveis a algumas moléculas exógenas (EID; CORTRIGHT, 2009).

Os canais iônicos que participam do processo de excitabilidade dos neurônios sensoriais nociceptivos são: os canais de potássio dependentes de voltagem, que quando inibidos podem produzir efeito excitatório; os canais de sódio dependentes de voltagem, que geram o potencial de ação e seu acionamento tem um efeito excitatório; canais sensoriais e dependentes de ligante, que são canais catiônicos abertos pelos estímulos nocivos (por exemplo, os canais iônicos do receptor de potencial transitório - TRP, que uma vez abertos permitem um grande influxo de sódio e cálcio), ou por ligantes pró-inflamatórios, tais como ATP e H⁺ (canais P2X e ASIC, respectivamente), cuja ativação também possui um efeito excitatório nos neurônios (MILLAN, 1999; LINLEY et al., 2010; EID E CORTRIGHT, 2009).

A família de canais iônicos de receptores de potencial transitório (TRP) possui vários membros responsáveis pela detecção de estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos (LINLEY; ROSE; OOI, 2010). O receptor vanilóide TRPV1 é encontrado em fibras C e ativado por calor moderado, cerca de 45° C, uma temperatura que é percebida como desfavorável e também por capsaicina, que é o princípio ativo responsável pela pungência das pimentas ardentes (PURVES et al., 2010). No estágio ativado esses receptores permitem um influxo de sódio e cálcio que inicia a geração de potenciais de ação nas fibras nociceptivas (PURVES et al., 2010).

As aferências nociceptivas são transmitidas via nociceptores periféricos para a medula espinhal ou núcleo trigeminal e, a partir daí, levados por tratos ascendentes até o tálamo e córtex somatosensorial. As aferências são integradas e moduladas em múltiplos níveis do circuito neural (PLATANO et al., 2008).

As cinco vias ascendentes principais são: trato espinotalâmico, trato espinoreticular, trato espinomesencefálico, trato cervicotalâmico e trato espino-hipotalâmico, e elas

contribuem para o processamento central da informação nociceptiva (KANDEL et al., 2014). Além dessas vias, o tálamo contém vários núcleos de retransmissão que participam do processamento central da informação nociceptiva (KANDEL et al., 2014).

O glutamato é o principal neurotransmissor liberado na medula pelos neurônios nociceptivos primários, mas existe também uma subpopulação que libera substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), sendo denominados neurônios peptidérgicos e uma subpopulação de neurônios não peptidérgicos que são identificados pela presença de isolectinas específicas (BATTAGLIA; RUSTIONI, 1988; MILLAN, 1999).

A modulação da dor também ocorre na medula e é um fenômeno complexo que modifica a qualidade, a severidade e a duração da percepção dolorosa (NAIDU; PHAM, 2015). O Sistema Nervoso Central contém opióides endógenos, a encefalina e a β -endorfina. Assim, os receptores opióides e os opióides endógenos compõem um sistema de supressão de dor intrínseco (MILLAN, 1999).

2.2.3 Sensibilização de neurônios nociceptivos periféricos

A excitabilidade neuronal é controlada por canais iônicos presentes na membrana plasmática dos nociceptores e a ativação das vias intracelulares neuronais leva à fosforilação de canais iônicos, modificando a sua atividade (ALVES NETO et al., 2008). E as modificações que ocorrem na estrutura ou atividade de canais iônicos são comumente as responsáveis pela desregulação na excitabilidade neuronal (ROZA et al., 2003; RAOUF, et al., 2010).

Quando estímulos antes inócuos passam a causar dor (alodínia) devido à facilidade de despolarização (diminuição do limiar de excitabilidade) dos neurônios aferentes nociceptivos polimodais acontece o fenômeno chamado de hiperalgesia, ou seja, um aumento da sensibilidade dolorosa, uma resposta exacerbada a um estímulo nocivo (JENSEN; FINNERUP, 2014). Quando ocorre lesão tecidual, substâncias algogênicas são liberadas no local de recebimento do estímulo nociceptivo e agem como sensibilizadoras dos receptores periféricos, elas são pró-inflamatórias e entre elas se destacam prostaglandina E₂, substância P, calcitonina e somatostatina. Essas substâncias reduzem o limiar dos nociceptores e iniciam o processo de sensibilização (OLIVEIRA et al., 2016).

A dor em curso ou alodínia associada à hiperexcitabilidade do nociceptor é uma marca das síndromes de dor crônica incluindo dor neuropática, a dor causada por lesão do nervo. As

tentativas de identificar os canais responsáveis por esta atividade se direcionam principalmente aos canais iônicos de sódio e potássio (CREGG et al., 2010).

Periféricamente, os principais canais iônicos até o momento implicados na sensibilização dos nociceptores são os canais catiônicos, sendo que, os canais de potássio (K^+) e de cálcio (Ca^{2+}) são mais relacionados à alteração do potencial de repouso neuronal, enquanto os canais de sódio (Na^+) são mais associados à diminuição do limiar de ativação do nociceptor (ALVES NETO et al., 2008).

Alterações em correntes ou na expressão dos canais de Na^+ tetrodoxina-resistentes, que são característicos de nociceptores, foram observadas na neuropatia diabética (HONG; WILEY, 2005, HONG et al., 2004). Canais de Na^+ dependentes de voltagem também estão envolvidos em várias síndromes de dor no Sistema Nervoso Periférico (PRIEST et al., 2005; ESTACION et al., 2010).

A perda de função de canais de potássio envolvidos na determinação do limiar do potencial de ação ou na repolarização pode resultar em neurônios com hiperexcitabilidade, que conseqüentemente leva ao aumento da sensibilidade a estímulos nocivos e menor sensibilidade a analgésicos (CREGG et al., 2010).

2.2.4 Canais de potássio

O potencial de membrana é determinado pela sua permeabilidade diferencial aos diversos íons e por sua distribuição relativa nos compartimentos que a membrana separa. Os canais de potássio são um grupo de canais iônicos encontrados na maioria das células eucarióticas. Normalmente, existe uma alta concentração de potássio no meio intracelular (~ 140 mEq/L) e uma baixa concentração no meio extracelular (~ 4 mEq/L) e esses canais são proteínas que permitem o movimento dos íons potássio (K^+) através da membrana plasmática. E eles são importantes no controle da excitabilidade neuronal, pois controlam o potencial de repouso (canais de K^+ ficam abertos, enquanto o K^+ sai da célula, se abrirem ainda mais canais, sai muito potássio e a célula hiperpolariza; e caso os canais se fechem o oposto acontece) e participam da recuperação da voltagem após o disparo de potenciais de ação (JAN E JAN, 1992; ALVES NETO et al., 2008).

Os canais de potássio se distribuem em algumas classes principais: canais de K^+ regulados por voltagem, que se abrem quando a membrana está despolarizada; canais de K^+ ativados por ligação de Ca^{2+} , que são inibidos por alta concentração intracelular de Ca^{2+} ; canais de K^+ retificadores de influxo, que permitem que o K^+ entre mais rápido que saia e

regulados por interação com a proteína G ou sensíveis a ATP; canais de K^+ com domínio de dois poros, que exibem retificação externamente dirigida e se opõe a qualquer tendência à excitação e contribuem para a condutância do K^+ em repouso (DU; GAMPER, 2013; RANG et al., 2016).

O canal de potássio sensível a ATP (K^+_{ATP}) é um complexo hetero-octamérico de quatro subunidades Kir6.x formadoras de poros e quatro subunidades reguladoras do receptor sulfonilureia (SURx), e conduz uma corrente de potássio que é inibida pela ligação do ATP às subunidades Kir6.x e estimulada pela interação do ADP com subunidades SURx (HIBINO et al., 2010).

Drogas sulfonilureias como a glibenclamida são comumente utilizadas para tratar pacientes com diabetes do tipo 2 porque inibem a atividade desse canal de potássio sensível ao ATP, promovendo seu fechamento, levando a despolarização da membrana da célula e consequente liberação de vesículas contendo insulina (LUZI; POZZA, 1997). Esse mecanismo induzido pelas sulfonilureias é semelhante ao processo fisiológico na célula beta pancreática, onde estão presentes os canais de K^+ sensíveis ao ATP e, quando tem uma concentração elevada de glicose plasmática, aumenta a concentração intracelular de ATP que inibe a atividade desses canais, por meio de seu fechamento e permitindo a despolarização da membrana da célula. Há então influxo de Ca^{2+} , que faz com que vesículas contendo insulina sejam liberadas. (RANG et al., 2016; NICHOLS, 2006; ASHCROFT AND RORSMAN, 2012, 2013). O contrário do que acontece quando há queda das concentrações intracelulares de ATP em consequência da deficiência de nutrientes da célula (RANG et al., 2016).

Sendo assim, o fechamento de canais K^+_{ATP} é essencial para a liberação de insulina pelas células β -pancreáticas, já que a secreção de insulina é inibida pela hiperpolarização da membrana (NICHOLS, 2006). Uma vez que os neurônios sensoriais periféricos também são permeáveis à glicose, e também têm a enzima glicocinase (GARDINER et al., 2007) e canais K^+_{ATP} (RISTOIU et al., 2002; RANG et al., 2016), o mesmo mecanismo de despolarização induzido por glicose nas células β -pancreáticas pode estar ocorrendo nos neurônios sensoriais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito direto da hiperglicemia sobre o potencial de repouso de neurônios nociceptivos primários e sobre o limiar mecânico nociceptivo em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito agudo de altas concentrações de glicose sobre o potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos.
- Determinar o efeito direto da insulina no potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos.
- Avaliar o envolvimento dos canais de potássio sensíveis ao ATP no efeito da glicose sobre o potencial de repouso da membrana dos neurônios nociceptivos por meio da ativação e inativação farmacológica desses canais.
- Determinar *in vivo* o efeito da hiperglicemia sobre a sensibilidade nociceptiva mecânica.
- Avaliar *in vivo* o envolvimento dos canais de potássio sensíveis ao ATP no efeito da hiperglicemia sobre a sensibilidade nociceptiva.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, fêmeas pesando aproximadamente 100g para os experimentos *in vitro* e machos de 200g para os experimentos *in vivo*, mantidos em ciclo claro-escuro de 12/12 h, recebendo ração e água ad libitum. 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, 1986). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo nº 050/17- ANEXO I). Os animais foram adquiridos do biotério da Universidade Federal de Uberlândia e mantidos, até o momento da realização dos experimentos, no depositário de animais da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS), na mesma Instituição.

4.2 Drogas

Para os experimentos *in vitro*, todas as drogas foram diluídas em solução Hank's/Hepes em uma concentração 10 vezes superior a concentração final desejada.

- Capsaicina (Sigma): É um agonista de receptores TRPV1, expressos em fibras C, sendo assim utilizada para a seleção de neurônios sensoriais nociceptivos e funcionais nas culturas primárias. Inicialmente foi diluída em dimetilsulfóxido 1% (DMSO) e estocada na concentração de 10 mM, e posteriormente diluída em Hank's/Hepes e utilizado *in vitro* na concentração de 1 μ M.
- Diazóxido (Sigma): Promove a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP. Foi diluído a partir de uma solução estoque em Hank's/Hepes e utilizado nos ensaios *in vitro* na concentração de 10 μ M.
- DiBAC₄(3) (*Molecular Probes*): É um indicador de potencial de repouso celular que penetra em células despolarizadas devido a sua carga negativa e se liga à membrana plasmática ou proteínas intracelulares e exibe fluorescência. Foi inicialmente diluído em DMSO 1% e estocado na concentração de 10 mM, e posteriormente diluído em Hanks/Hepes e utilizado *in vitro* na concentração de 5 μ M.

- Glibenclamida (Sigma): Bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP. Foi diluído a partir de uma solução estoque em Hank's/Hepes e utilizado nos ensaios *in vitro* na concentração de 10 μ M.
- Glicose (Êxodo): Diluída em meio de cultura Hank's/Hepes e utilizada nas concentrações finais 300 mg/dL, 450 mg/dL, 600 mg/dL. Para um experimento foi diluída em H₂O para a concentração final 600 mg/dL.
- Insulina (Sigma): Diluída a partir de uma solução estoque para a concentração final 1 μ M.

Para os experimentos *in vivo*, as drogas foram diluídas diretamente em solução salina 0,9%, o veículo, ou a partir de soluções estoque, preparadas em DMSO 1%.

- Diazóxido (Sigma): Promove a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, foi diluído a partir de uma solução estoque e utilizado nos ensaios *in vivo* na concentração de 10 μ M.
- Glicose (Êxodo): Diluída em solução salina 0,9% e utilizada nas concentrações finais 300 mg/dL, 450 mg/dL, 600 mg/dL. Para um experimento foi diluída em DMSO 1%.
- Manitol (Synth): Diluído em solução salina 0,9% e utilizado na concentração final 600 mg/dL.

4.3 Experimentos *in vitro*

4.3.1 Cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal

As culturas de GRD seguiram protocolo descrito por Linhart e colaboradores (2003). Os animais foram anestesiados em isofurano (Cristália), eutanasiados por decapitação, e os gânglios da raiz dorsal da região lombar e torácica removidos (16 a 18 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank's (Sigma) estéril com 10 mM de tampão Hepes (ácido 4-(2- hidroxietil)-1-piperazin-etanolsulfônico) (Sigma). As células foram dissociadas enzimaticamente por incubação a 37°C durante 75 minutos em meio Hank's/Hepes contendo 0,28 U/mL de colagenase (Sigma) e depois por 12 minutos em solução contendo 0,25 mg/mL de tripsina (Sigma). Os gânglios foram lavados em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco- Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 2mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina. As células foram dissociadas mecanicamente utilizando uma pipeta Pasteur de

vidro, e então cultivadas em placas de cultura cobertas com Matrigel e mantidas em atmosfera de 5% CO₂ (37°C) com o mesmo meio de cultura DMEM e utilizadas após 24 horas.

4.3.2 Microscopia Confocal

Após 24 horas de incubação as placas de cultura foram lavadas em meio Hank's/Hepes e incubadas com 5 µM do indicador de potencial de repouso DiBAC₄(3) (*Molecular Probes*) por 30 minutos, em temperatura ambiente e no escuro. Este indicador penetra em células despolarizadas, de tal modo que o aumento da despolarização celular resulta em um influxo maior do indicador e, por consequência, aumento da fluorescência. Por outro lado, a hiperpolarização é indicada por uma diminuição da fluorescência.

A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de séries temporais de imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta). Inicialmente foram selecionados os parâmetros de filtro de emissão (510-574) e comprimento de onda de excitação (488 nm). A área de interesse foi selecionada nas placas de cultura utilizando um aumento de 400x, e após a seleção do campo, as imagens foram registradas durante 10 minutos em intervalos de 3 segundos, imediatamente após administração de 10µL de glicose, insulina, diazóxido e glibenclamida (placas diferentes para cada substância testada). Após cada teste, as placas receberam capsaicina (1 µM) e uma nova série de imagens foi registrada durante 2 minutos. Apenas os neurônios nos quais houve uma despolarização da membrana em resposta à capsaicina foram selecionados para a análise. A sensibilidade à capsaicina permitiu a seleção de neurônios nociceptivos e que estavam funcionais nas culturas primárias.

Para a análise das imagens foi utilizado o software de domínio público ImageJ (Desenvolvido por Wayne Rasband, *National Institute of Health*, USA). Utilizando este software, inicialmente foram selecionadas as áreas correspondentes a neurônios (ROI– *region of interest*) nas séries temporais de imagens obtidas durante tratamento com capsaicina, o qual foi obtido ao final dos experimentos. Em seguida foram obtidos os valores médios de fluorescência, dos mesmos neurônios selecionados, no período dos 10 minutos iniciais (série temporal de imagens antes da capsaicina). Assim, foi obtido o valor de intensidade de fluorescência ao longo do tempo para cada neurônio tratado. Em seguida os valores foram normalizados utilizando a primeira imagem de cada série, considerada F0. Deste modo, obtivemos a variação de fluorescência em relação à fluorescência basal ($\Delta F/F_0$) de maneira que os resultados mostrassem a variação do potencial de repouso após os tratamentos. Para

análise estatística foram considerados os valores máximos de variação de fluorescência para cada um dos neurônios avaliados.

4.4 Experimentos *in vivo*

4.4.1 Administração intraganglionar de drogas

Para a inoculação de drogas no gânglio da raiz dorsal (GRD) foi utilizado o método de injeção direta no quinto GRD lombar (L5) conforme descrito em estudos anteriores (FERRARI et al., 2007). Esse método permite a verificação dos efeitos das drogas apenas sobre neurônios nociceptivos primários e células satélites, sem a possibilidade de ação dessas em neurônios secundários ou em outras células do tecido periférico.

Os animais inalaram o anestésico isoflurano (Cristália) enquanto o procedimento de injeção era realizado. Foram utilizados diferentes animais para cada grupo experimental, sendo que eram 6 animais por grupo.

Foi administrado um volume de 5 μ L em cada injeção e para eliminar o risco de permear estruturas adjacentes ao gânglio, foi confeccionada uma escala utilizada para controle fino da quantidade de solução injetada. Esta escala foi adaptada a um cateter de 30 cm PE-10 (*Intramedic Clay Adams*, diâmetro interno de 0.28 mm e externo de 0.61 mm), calibrado de maneira que 25 mm de deslocamento da solução dentro do cateter corresponderiam ao depósito de 1 μ l de solução. O cateter foi conectado a uma agulha gengival (Dentbras, 30G curta), e, em sua outra extremidade, a uma seringa de vidro (Figura 1A). Após tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas, os animais foram anestesiados por via inalatória por isoflurano e posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, de modo que sua região lombar ficasse hiperfletida. A 1,5 cm lateralmente à coluna vertebral, cerca de 0,5 cm em direção caudal a uma linha imaginária passando pelas bordas rostrais das cristas ilíacas, foi inserida uma cânula-guia (agulha hipodérmica 25x7) com o objetivo de facilitar a penetração da agulha gengival na pele dos animais. A agulha gengival foi inserida, através da cânula-guia, em direção ao espaço intervertebral entre a quinta e a sexta vértebra lombar, até que o processo ósseo lateral vertebral seja atingido (Figura 1B). Com movimentos finos a agulha atinge o GRD e neste momento ocorre um reflexo característico da pata ipsilateral, indicando a penetração da ponta da agulha no gânglio da raiz dorsal do quinto nervo espinal lombar, o qual está localizado sob o processo transversal da quinta vértebra lombar.

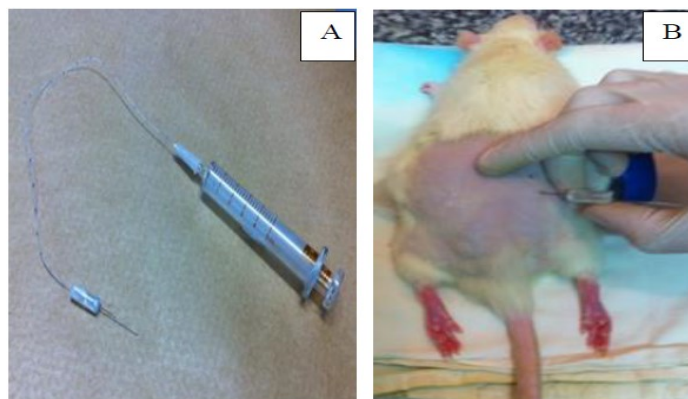


Figura 1: Injeção intraganglionar. A) Material utilizado para fazer a injeção direta (seringa de vidro, cateter e agulha gengival. B) Animal anestesiado recebendo a injeção da droga via intraganglionar.

4.4.2 Teste de avaliação da sensibilidade mecânica

O limiar nociceptivo mecânico foi medido pelo método de Von Frey Eletrônico, como descrito anteriormente (VIVANCOS et al., 2004). Foi registrado o limiar de sensibilidade mecânica dos animais na pata traseira direita antes e após a injeção intraganglionar (15, 30 e 60 minutos). Foram utilizados 6 animais por grupo experimental e sendo 7 grupos no total: Veículo (controle – salina), glicose 300 mg/dL, glicose 450 mg/dL, glicose 600 mg/dL, manitol 600 mg/dL, glicose 600 mg/dL (diluída em DMSO), glicose + diazóxido e diazóxido.

Em uma sala silenciosa, os ratos foram colocados no aparelho (Von Frey eletrônico, Insight, Ribeirão Preto, Brasil), em gaiolas de acrílico ($12 \times 20 \times 17$ cm) com piso de grade de arame (malha 5 mm^2 , constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura), 15 a 30 minutos antes do início do teste para um período de adaptação. O teste consistiu em evocar um reflexo de flexão da pata traseira com um transdutor de força manual adaptado a uma ponta de polipropileno de $0,7 \text{ mm}^2$. Um espelho inclinado colocado 25 cm sob a grade forneceu uma visão clara da pata traseira do rato. O investigador foi treinado para aplicar a ponta no centro da pata traseira com um aumento gradual da pressão. O estímulo foi automaticamente descontinuado, e sua intensidade foi registrada quando a pata foi retirada. O ponto final foi caracterizado pela remoção da pata em uma resposta clara de sacudida (“flinch”) a aplicação da ponteira. Os animais foram testados antes e depois dos tratamentos (injeção intraganglionar), por 15, 30 e 60 minutos, nas patas traseiras direitas. As patas traseiras esquerdas também foram usadas como controle. Um investigador diferente do que administrou as injeções intraganglionares realizou o teste, sem conhecimento das drogas que foram injetadas.

4.5 Análise estatística

Os dados dos experimentos de fluorescência *in vitro* e dos experimentos comportamentais *in vivo* são apresentados como média \pm SEM e comparados por teste t (comparação entre duas médias) ou ANOVA (mais de duas médias) de uma ou duas vias, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($P < 0,05$). As análises foram realizadas usando o *software GraphPad Prism*.

5. RESULTADOS

5.1 Alteração induzida pela glicose no potencial de membrana dos neurônios dos gânglios da raiz dorsal

O potencial de repouso de neurônios em culturas primárias de GRD foi avaliado por meio de microscopia confocal utilizando o indicador fluorescente DiBAC₄(3). A glicose foi administrada diretamente nos neurônios em cultura nas concentrações de 300, 450 e 600 mg/dL após as primeiras(1-2) imagens e uma sequência de imagens (uma a cada 3 segundos) foi adquirida por 10 minutos (figuras 2A-B e Figura 3). Após administração de glicose, foi realizada administração de capsaicina (figura 2C). A capsaicina ativa receptores TRPV1, característicos de fibras C nociceptivas. A administração de capsaicina foi utilizada como controle positivo para permitir a seleção de neurônios nociceptivos viáveis na cultura. Deste modo, para quantificação (Figura 3) foram considerados aqueles neurônios que responderam à capsaicina.

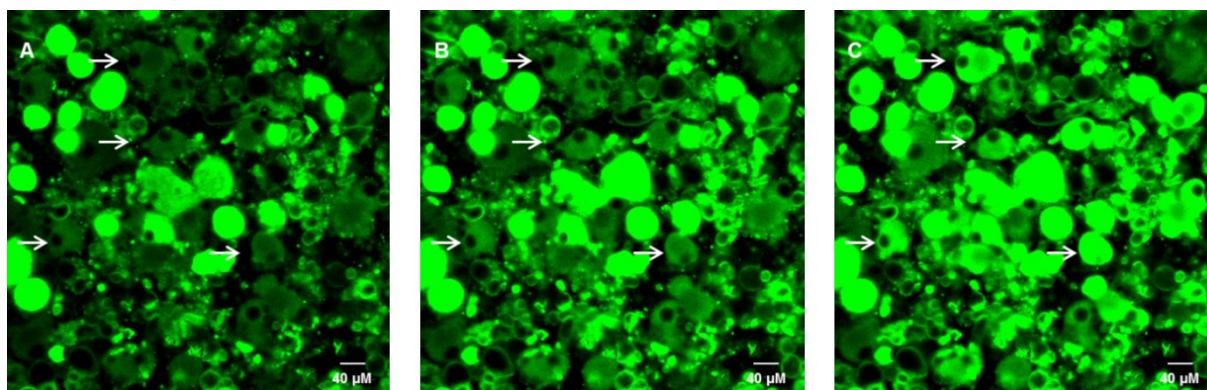


Figura 2: Cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal. Imagens obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando o indicador fluorescente DiBAC₄(3) (Molecular Probes). A: Fluorescência basal. B: Após 10 minutos da administração de glicose 600 mg/dL. C: Após 2 minutos da administração de capsaicina. As setas indicam neurônios representativos do aumento de fluorescência. Aumento 400x.

A hiperglicemia induziu despolarização do potencial de repouso da membrana em neurônios nociceptivos sensíveis à capsaicina de maneira dependente da concentração (Figura 3). Todas as concentrações de glicose testadas causaram aumento na fluorescência do DiBAC₄(3), indicando despolarização da membrana. As alterações de fluorescência induzidas pela hiperglicemia foram: glicose 300 mg/dL (0.1505 ± 0.04496 ; n=60); 450 mg/dL de glicose (0.2420 ± 0.03510 ; n=31) e 600mg/dL (0.3405 ± 0.05428 ; n=34). A administração de

Hank's - veículo (100 mg/dL glicose) não induziu alterações de fluorescência (0.0005373 ± 0.01768 ; $n=125$).

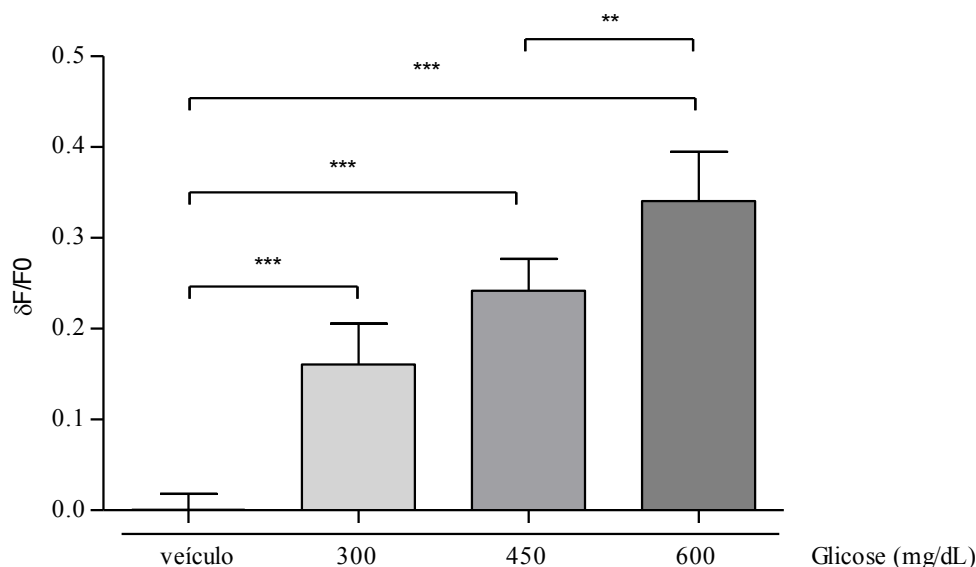


Figura 3: Efeito da glicose no potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos em cultura. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração de glicose a uma concentração final de 300, 450 ou 600 mg/dL. Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μM) foram considerados para análise. Dados apresentados como média ± E.P.M de 31 a 125 neurônios. *** $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

Os testes com as diferentes concentrações de glicose foram realizados complementando a quantidade de glicose de 100 mg/dL presente no tampão de Hank's até a concentração desejada. Para este propósito, a glicose foi adicionada em uma concentração 10X superior a desejada em solução de Hank's e era diluída até a concentração final na placa de cultura durante a aquisição de imagens. Portanto, à medida que a glicose era adicionada, a osmolaridade da solução estava sendo aumentada. Ao ponto que, na maior concentração de glicose testada, 600 mg/dL, a administração de glicose causou um aumento de 28 mOsm na solução que banhava as células. Como as alterações na osmolaridade podem afetar a função das células, testou-se então a administração de glicose a 600 mg/dL em solução isosmótica. Isto foi conseguido com a diluição de uma concentração de 10X superior a desejada de glicose (5 g/dL) em água (Figura 4) e depois diluindo até a concentração final em Hank's na própria placa de cultura. A osmolaridade da solução de glicose 5g/dL é de 280 mOsm, compatível com a osmolaridade da solução de Hank's.

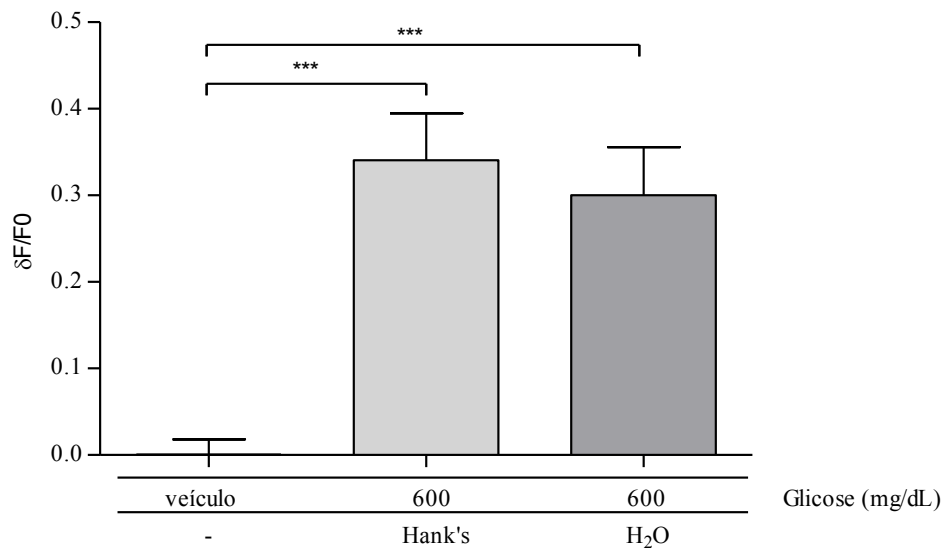


Figura 4: Despolarização induzida pela glicose em neurônios sensoriais primários. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração de glicose a uma concentração final de 600 mg/dL, em Hank's ou H₂O. Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μM) foram considerados para análise. Dados apresentados como média ± E.P.M de 34 a 125 neurônios. ***p<0.0001. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

O resultado mostrou que a despolarização da glicose é causada pela própria glicose e não pela alteração da osmolaridade, pois não houve diferença significativa entre a administração de glicose diluída em Hank's (0.3405 ± 0.05428; n=34) e glicose diluída em água (0.3003 ± 0.05521; n=41). Já comparando com a administração de Hank's, o veículo (100 mg/dL de glicose) (0.0005373 ± 0.01768; n=125), as duas soluções de glicose mostraram diferença significativa.

5.2 Envolvimento dos canais K⁺_{ATP} na despolarização induzida por glicose nos neurônios sensoriais primários

5.2.1 Ativação farmacológica dos canais K⁺_{ATP} com diazóxido

Para testar a participação dos canais de K⁺_{ATP}, a glicose (450 ou 600 mg/dL) foi administrada na presença de diazóxido (10 μM), uma droga que atua seletivamente nos canais K⁺_{ATP} provocando sua abertura. Os resultados mostram que o diazóxido inibiu a despolarização neuronal induzida pela glicose (Figura 5). O tratamento com diazóxido (450 mg/dL: 0.003080 ± 0.01958; n=20) (600 mg/dL: 0.1552 ± 0.07947; n=20) ocasionou bloqueio

ou diminuição da despolarização celular, respectivamente, quando comparada com a despolarização induzida pela concentração mais baixa (450 mg/dL) (0.2420 ± 0.03510 ; $n = 31$) ou mais alta (600 mg/dL) (0.3405 ± 0.05428 ; $n=34$) de glicose. A administração do veículo Hank's (100 mg/dL de glicose) não induziu alterações de fluorescência (0.0005373 ± 0.01768 ; $n = 125$).

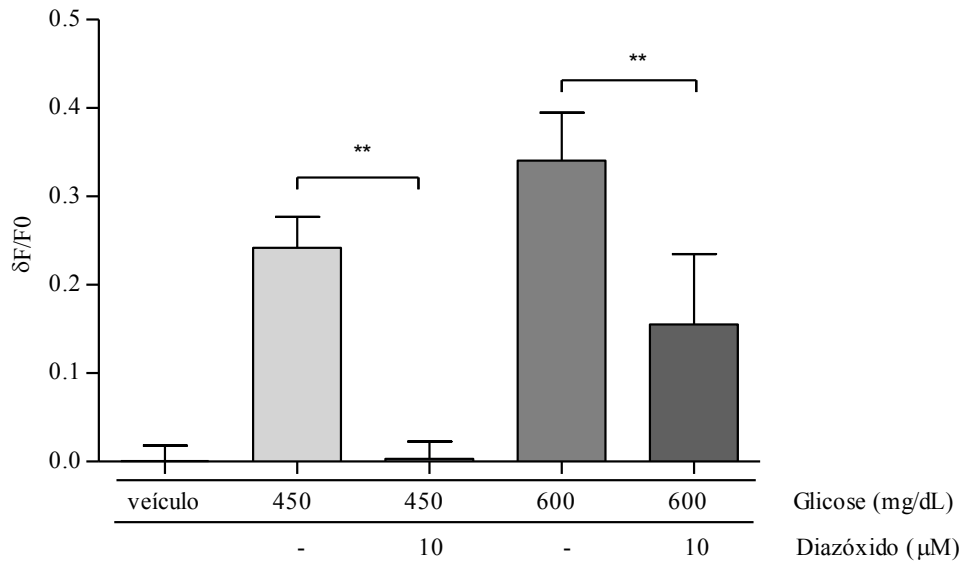


Figura 5: Efeito da glicose na despolarização celular na presença do abridor do canal K^+_{ATP} . É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração de glicose (450 ou 600 mg/dL) ou glicose mais diazóxido (10 μ M). Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μ M) foram considerados para análise. Dados apresentados como média \pm E.P.M de 20 a 125 neurônios. ** $p < 0.05$. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

Também foi avaliado o efeito direto do diazóxido (10 μ M) sobre o potencial de repouso dos neurônios nociceptivos (Figura 6). Houve uma diferença significativa, pois enquanto a administração do veículo Hank's (100 mg/dL de glicose) não induziu alterações de fluorescência (0.0005373 ± 0.01768 ; $n = 125$), a administração de diazóxido provocou um aumento de fluorescência, ou seja, despolarização desses neurônios em cultura (0.3055 ± 0.02415 ; $n=40$).

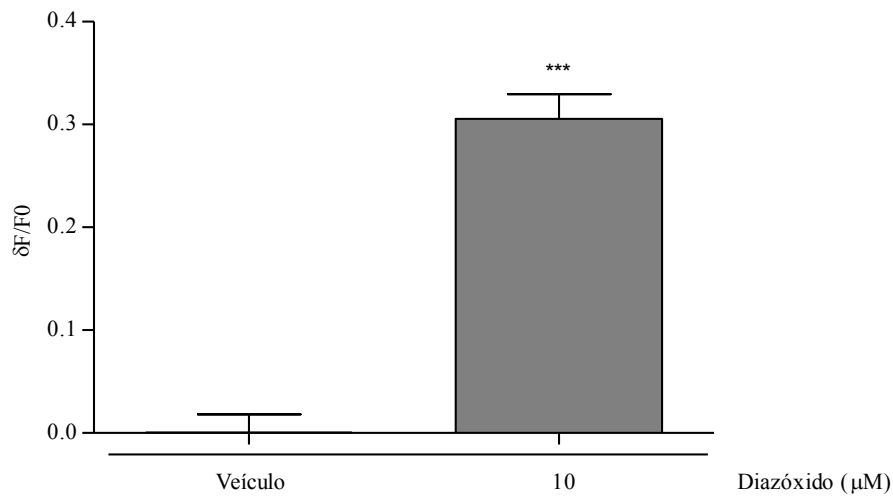


Figura 6: Efeito do diazóxido no potencial de repouso de neurônios nociceptivos periféricos. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração diazóxido (10μM). Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μM) foram considerados para análise. Dados apresentados como média ± E.P.M de 40 a 125 neurônios. ***p<0.0001. (Dados avaliados por teste t).

Esse resultado de despolarização a princípio não era esperado, uma vez que o diazóxido, como mencionado anteriormente, promove a abertura dos canais K⁺_{ATP}. Contudo, análise da resposta ao diazóxido durante os 10 minutos (Figura 7) mostrou que existe um período inicial de hiperpolarização do neurônio, seguido então da despolarização deste. A abertura de canais K⁺_{ATP} causada pelo diazóxido poderia induzir, em sequência, a abertura de outros canais, como resposta, ocasionando o resultado encontrado.

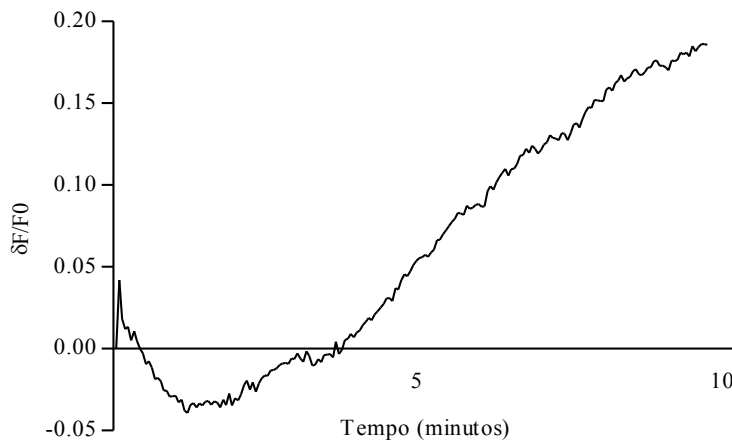


Figura 7: Efeito do diazóxido (10 μM) sobre o potencial de repouso de um neurônio nociceptivo periférico. O efeito foi avaliado durante 10 minutos e imediatamente após a administração da droga.

5.2.2 Inativação farmacológica dos canais K^+_{ATP} com glibenclamida

Avaliou-se o efeito da glibenclamida 10 μM , um inibidor do canal de K^+_{ATP} , também com o objetivo de entender o papel dos canais de K^+_{ATP} no potencial de repouso da membrana neuronal (Figura 8). A administração de glibenclamida (10 μM) sozinha (2.709 ± 0.4845 ; n = 18) ou mesmo na presença de alta concentração de glicose (600 mg/dL) (3.254 ± 0.1713 ; n = 30) resultou em forte despolarização, como observado pelo aumento da fluorescência emitidos por DiBAC₄(3), comparando com a própria glicose (600 mg/dL) (0.3405 ± 0.05428 ; n=34) e com o veículo Hank's (0.0005373 ± 0.01768 ; n = 125).

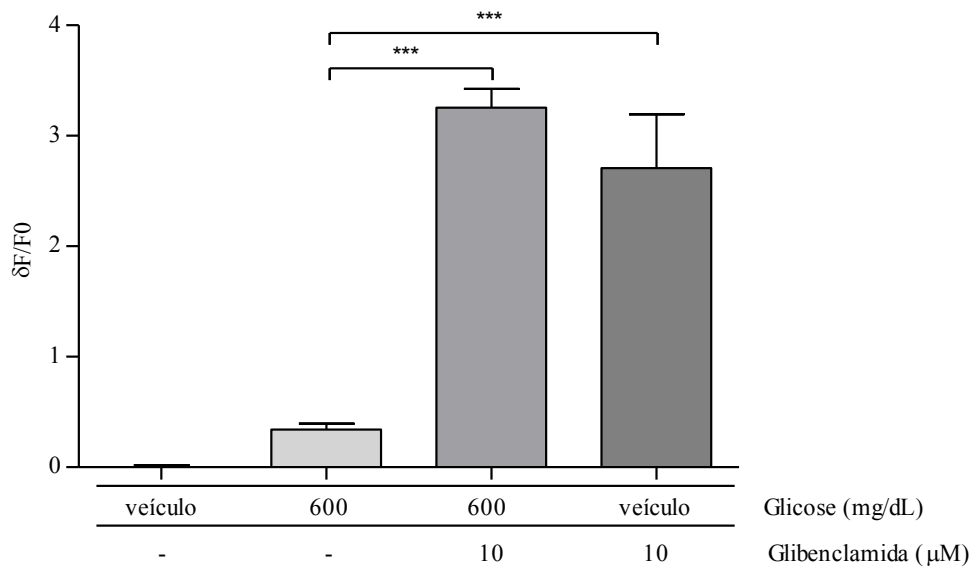


Figura 8: Efeito da glicose na despolarização celular na presença de um bloqueador do canal K^+_{ATP} . É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração de glicose (600 mg/dL) ou glicose mais glibenclamide (10μM) ou glibenclamide sozinha. Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μM) foram considerados para análise. Dados apresentados como média ± E.P.M de 18 a 125 neurônios. ***p<0.0001. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

5.3 A administração de insulina reduz a despolarização celular induzida por glicose

Como a hiperglicemia induzida pelo diabetes é causada por ação ou liberação deficiente de insulina, decidiu-se testar se a insulina interfere na despolarização induzida pela alta concentração de glicose em neurônios nociceptivos. Com esse objetivo, as culturas dos gânglios da raiz dorsal foram tratadas com glicose (600 mg/dL) na presença de insulina (1μM) (figura 9). A administração de insulina causou uma redução significativa na despolarização neuronal (0.1351 ± 0.04079 ; n=14), induzida por 600 mg/dL de glicose (0.3405 ± 0.05428 ; n=34). A administração do veículo Hank's (100 mg/dL de glicose) não induziu alterações de fluorescência (0.0005373 ± 0.01768 ; n = 125).

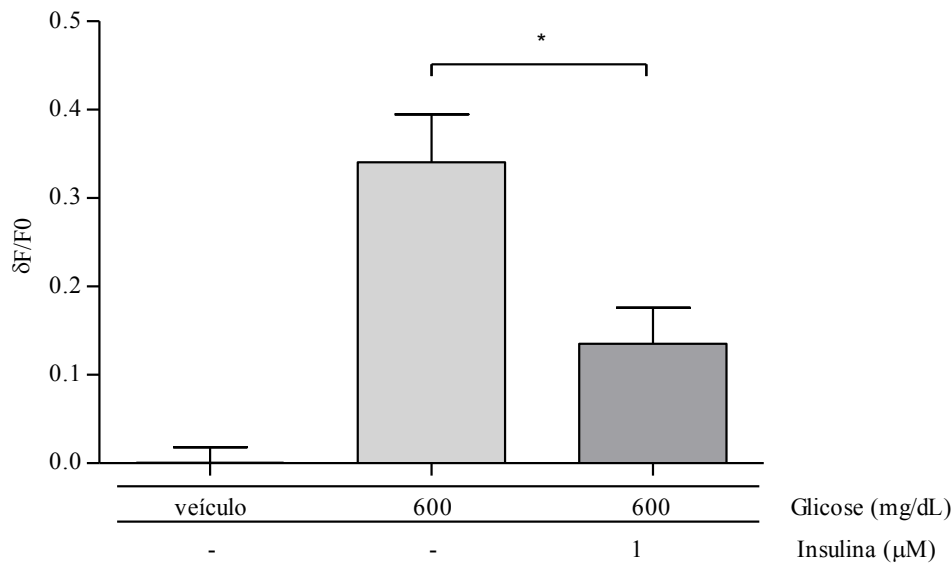


Figura 9: Insulina inibe a despolarização celular induzida por glicose. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração de glicose (600 mg/dL) ou glicose mais insulina (1 μM). Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μM) foram considerados para análise. Dados apresentados como média ± E.P.M de 14 a 125 neurônios. *p<0.05. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

Também foi avaliado o efeito direto da insulina (1 μM e 10 μM) sobre o potencial de repouso dos neurônios nociceptivos (Figura 10). Houve uma diferença significativa entre a administração do veículo Hank's (100 mg/dL de glicose) (0.0005373 ± 0.01768 ; n = 125) e a administração de insulina (10 μM) (0.07539 ± 0.01829 ; n=51), que provocou um aumento de fluorescência. Já na concentração mais baixa de insulina (1 μM) não houve uma diferença significativa em relação ao controle (0.05414 ± 0.02532 ; n=48).

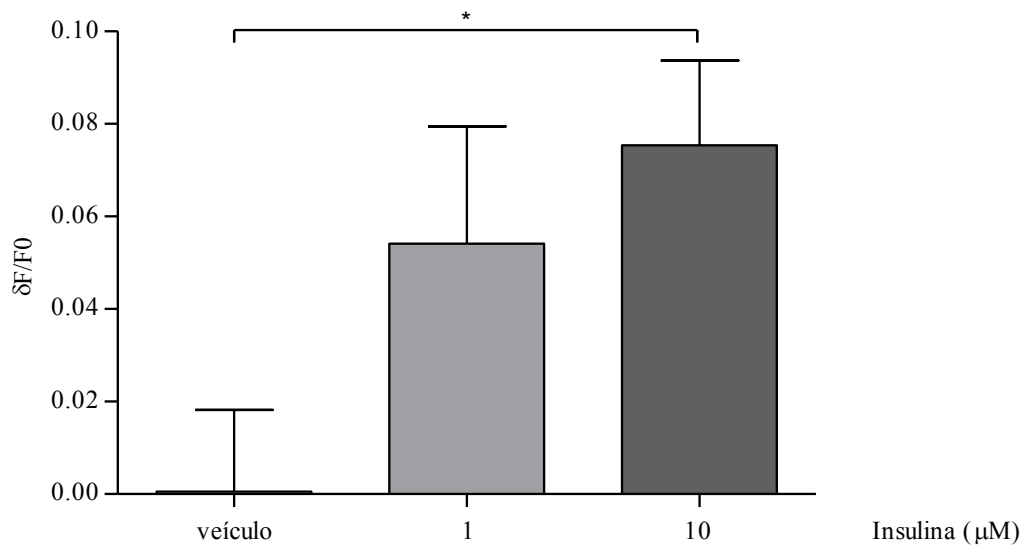


Figura 10: Efeito da insulina no potencial de repouso de neurônios nociceptivos periféricos. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC₄(3) após 10 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (100 mg/dL glicose) ou após administração insulina (1μM e 10μM). Apenas os neurônios que responderam à capsaicina (1 μM) foram considerados para análise. Dados apresentados como média ± E.P.M de 48 a 125 neurônios. *p<0.05. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

Esse resultado de despolarização a princípio não era esperado, uma vez que a insulina, como mostrado em resultado anterior (Figura 9), reduziu a despolarização induzida por glicose. Entretanto, a análise da resposta a insulina durante os 10 minutos nos quais foram feitas as imagens (Figura 11) mostrou que existe um período inicial onde ocorre hiperpolarização do neurônio, seguido então de uma despolarização. A insulina poderia induzir a abertura dos canais de K⁺_{ATP} e esse fato é acompanhado pela abertura de outros canais, como resposta, gerando a despolarização da célula.

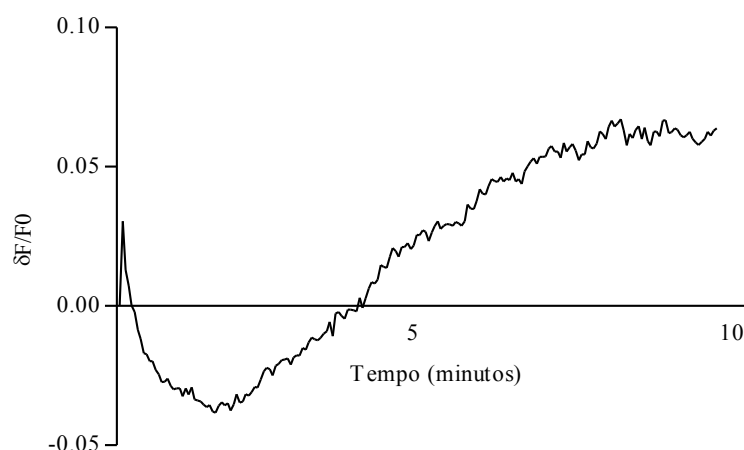


Figura 11: Efeito da insulina (10 μ M) sobre o potencial de repouso de um neurônio nociceptivo periférico. O efeito foi avaliado durante 10 minutos e imediatamente após a administração da droga.

5.4 Diminuição do limiar nociceptivo induzida por glicose

Para testar se a hiperglicemia poderia afetar os neurônios dos gânglios da raiz dorsal *in vivo*, os limiares de nocicepção mecânica da pata traseira foram avaliados em ratos tratados com injeções diretamente no gânglio da raiz dorsal (L5) direito. Os limiares de nocicepção mecânicos da pata traseira direita foram obtidos pelo teste eletrônico de Von Frey. A figura 12 mostra o efeito agudo das injeções intraganglionares (i.ig.) de glicose (300, 450 ou 600 mg/dl) ou veículo (solução salina 0,9%) na sensibilidade mecânica. Também foi testada a injeção da substância manitol (600 mg/dL) para investigar um possível efeito do aumento da osmolaridade nos gânglios da raiz dorsal.

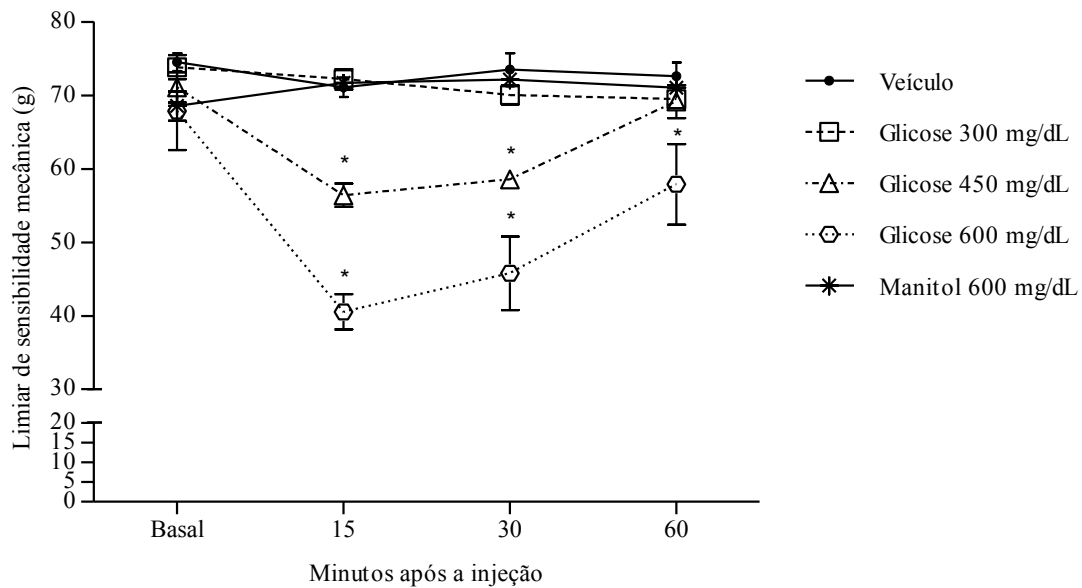


Figura 12: Efeito dependente da concentração de glicose no limiar de sensibilidade mecânica. É mostrado o limiar de sensibilidade mecânica, em gramas, de glicose (300, 450 ou 600 mg/dL), manitol (600 mg/dL) ou administração de veículo (solução salina) nos gânglios da raiz dorsal (L5 direito, 5 μ L). Dados apresentados como médias \pm E.P.M. 6 animais por grupo. * $p < 0.05$. (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

O limiar de sensibilidade mecânica foi diminuído nos animais tratados com glicose na concentração de 450 mg/dL 15 (56.41) e 30 (58.57) minutos após a injeção intraganglionar e na concentração de 600 mg/dL 15 (40.54), 30 (45.78) e 60 (57.89) minutos após a injeção, comparado com o grupo controle (Basal 74.52; 15 minutos 71.10; 30 minutos 73.49; 60 minutos 72.63).

A glicose na concentração de 300 mg/dL (Basal 73.84; 15 minutos 72.18; 30 minutos 70.04; 60 minutos 69.49) não alterou o limiar de sensibilidade mecânica. Esse efeito também foi observado com a injeção de manitol na concentração de 600 mg/dL (Basal 68.54; 15 minutos 71.69; 30 minutos 72.13; 60 minutos 71.02), mostrando que a alteração do limiar de sensibilidade mecânica não se deve a alteração na osmolaridade.

5.5 O abridor de canais K^+_{ATP} bloqueia o aumento da sensibilidade induzida por glicose

A participação dos canais de K^+_{ATP} na hiperalgesia mecânica induzida pela glicose *in vivo* foi testada através da administração do abridor seletivo desses canais, o diazóxido, em conjunto com glicose nos gânglios da raiz dorsal do animal (Figura 13) também por meio da injeção intraganglionar diretamente no gânglio da raiz dorsal (L5) direito.

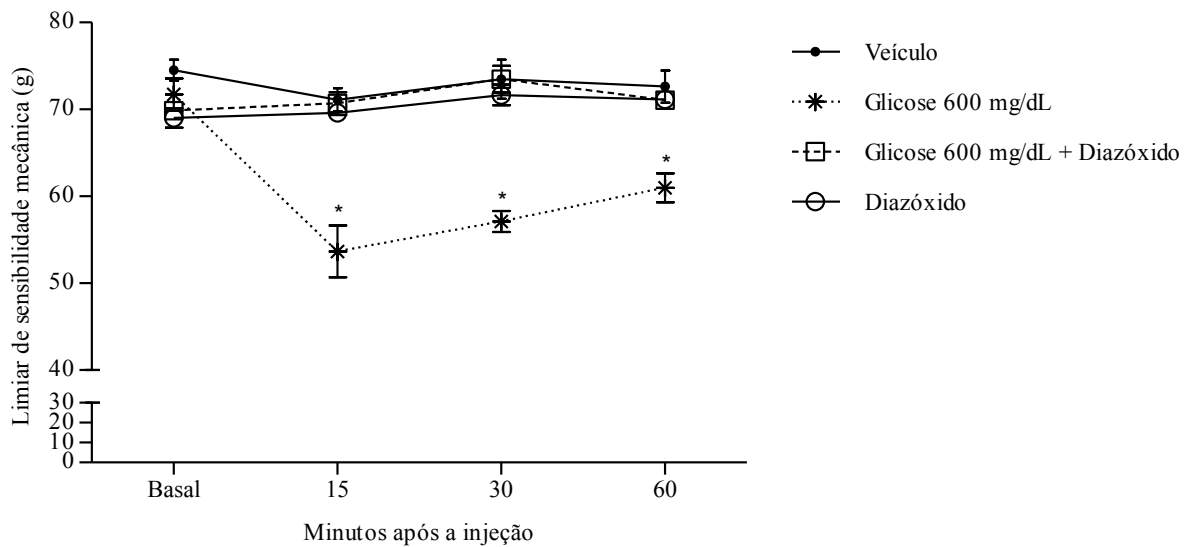


Figura 13: Efeito da glicose no limiar de sensibilidade mecânica na presença do abridor de canal K^+_{ATP} . É mostrado o limiar de sensibilidade mecânica, em gramas, da administração de glicose (600 mg/dL), glicose (600 mg/dL) mais diazóxido (10 μ M), diazóxido (10 μ M) ou veículo (DMSO 1% em solução salina) nos gânglios da raiz dorsal (L5 direito, 5 μ L). Dados apresentados como médias \pm E.P.M. 6 animais por grupo. * $p < 0.05$. (ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

Esses resultados mostram que o abridor de canais de potássio diazóxido não permite uma diminuição no limiar de sensibilidade mecânica induzida pela glicose (Basal 69.83; 15 minutos 70.68; 30 minutos 73.47; 60 minutos 71.05), mostrando resultado semelhante aos demais grupos: veículo (Basal 74.52; 15 minutos 71.10; 30 minutos 73.49; 60 minutos 72.63) e diazóxido (Basal 69.04; 15 minutos 69.59; 30 minutos 71.66; 60 minutos 71.15). Somente no grupo que recebeu glicose isoladamente houve queda no limiar (Basal 71.71; 15 minutos 53.65; 30 minutos 57.09; 60 minutos 60.98) aos 15, 30 e 60 minutos após injeção intraganglionar.

A figura 14 mostra os limiares de nocicepção mecânica da pata traseira esquerda dos ratos tratados com injeções diretamente no gânglio da raiz dorsal (L5) direito. Ela evidencia que os efeitos observados anteriormente (Figuras 12 e 13) com a administração das drogas acontecem apenas na pata traseira direita, como esperado devido a especificidade e localização da injeção (L5 direito), sem afetar a pata traseira esquerda. Não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos, em qualquer dos tempos, comprovando o efeito direto da injeção intraganglionar.

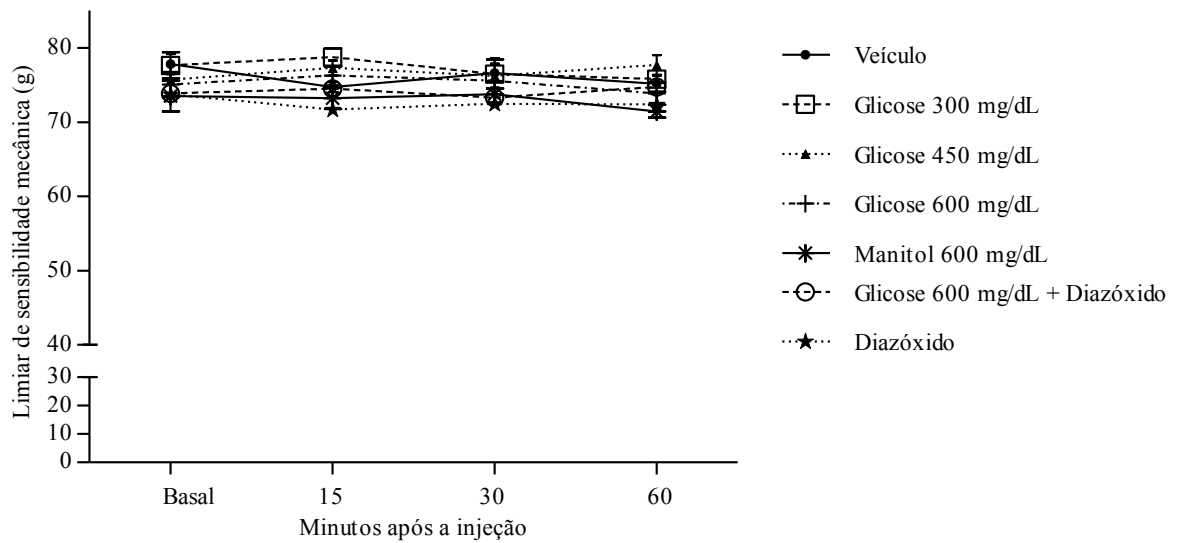


Figura 14: Efeito da injeção intraganglionar no gânglio L5 direito no limiar de sensibilidade mecânica da pata traseira esquerda do animal. É mostrado o limiar de sensibilidade mecânica, em gramas, da administração de glicose (300, 450 ou 600 mg/dL), manitol (600 mg/dL), glicose (600 mg/dL) mais diazóxido (10 μ M), diazóxido (10 μ M) ou veículo (solução salina) nos gânglios da raiz dorsal (L5 direito, 5 μ L). Dados apresentados como médias \pm E.P.M. 6 animais por grupo. * $p < 0.05$. (ANOVA).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o efeito direto da hiperglicemia em neurônios nociceptivos de ratos. Foram avaliados os efeitos sobre a sensibilidade mecânica e sobre o potencial de repouso da membrana de neurônios nociceptivos primários em cultura. Os achados desse estudo fornecem suporte para a ideia de que a hiperglicemia tem um efeito direto sobre os neurônios nociceptivos que contribuem para um estado de hiperalgesia, como também sugerido por outros autores (LEE et al., 1990; LEE; McCARTY, 1992; LEE; McCARTY, 1990). Além disso, os resultados aqui descritos indicam que os canais de potássio K^+_{ATP} estão envolvidos na despolarização da membrana em repouso induzida pela alta concentração de glicose e também na hiperalgesia induzida por alta concentração de glicose *in vivo*.

Usando a sonda fluorescente, DiBAC₄(3), para detectar alterações no potencial de repouso da membrana de neurônios sensoriais primários em cultura, verificou-se que o aumento da concentração de glicose no meio leva à despolarização da membrana. Como os neurônios foram selecionados de acordo com a sensibilidade à capsaicina, alterações no potencial de membrana foram detectadas em neurônios nociceptivos tipo C. Um efeito semelhante foi descrito anteriormente em neurônios de projeção do sistema gástrico obtidos a partir de gânglios nodosos (GRABAUSKAS et al., 2010), que apresentaram uma resposta excitatória significativamente alta associada à despolarização do potencial de membrana sob condições de hiperglicemia. Além disso, foi previamente demonstrado que a hiperglicemia pode atuar diretamente sobre os neurônios motores inibitórios que medeiam os circuitos vago-vagais inibitórios gástricos e nas células musculares lisas, onde a hiperglicemia também causa despolarização e aumento da excitabilidade (HE et al., 2018).

Nos experimentos *in vitro* realizados para testar o efeito da hiperglicemia nos neurônios nociceptivos, a glicose foi diluída em Hank's numa concentração 10X superior a desejada e adicionada na solução de banho das células. Portanto, essa concentração aumentada de glicose resultou em aumento da osmolaridade da solução. Matsuka e Spigelman (2004) relataram que soluções hiperosmolares (contendo glicose, sacarose, NaCl ou manitol) produzem um bloqueio seletivo da propagação do sinal nas fibras sensoriais mielinizadas tipo A. Além disso, foram descritos neurônios sensoriais presentes no gânglio da raiz dorsal que funcionam como osmorreguladores detectando alterações na osmolaridade do fluido extracelular. Estes neurônios apresentam receptores do tipo TRPV4, cujas correntes de cálcio provocam alteração no potencial de repouso da célula e participam na detecção de alterações fisiológicas na osmolaridade sanguínea (LECHNER et al., 2011). Para avaliar se a alteração

de osmolaridade era responsável pelas alterações do potencial de repouso da membrana neuronal, testou-se a administração de uma solução isosmótica de glicose a 600 mg/dL. Nesta concentração, a osmolaridade da solução é semelhante à da solução de Hank's usada durante os experimentos. A solução isosmótica com 600 mg/dL de glicose não alterou a despolarização induzida pela mesma concentração de glicose na solução hiperosmótica. Sendo assim, o efeito de despolarização induzido pela alta concentração de glicose não parece ter sido causado pela variação da pressão osmótica.

Como mencionado anteriormente, a despolarização neuronal induzida pela glicose foi previamente descrita em neurônios aferentes dos gânglios nodosos envolvidos no controle da motilidade gástrica (ZHOU et al., 2011). Neste estudo, verificou-se que os canais de K^+_{ATP} estavam envolvidos na despolarização neuronal e no relaxamento gástrico induzido por glicose.

O canal K^+_{ATP} é um complexo formado por dois tipos de subunidades proteicas: quatro subunidades Kir6.x formadoras de poros e cada uma delas associada a uma subunidade regulatória, o receptor de sulfonilureia (SURx). Quando a taxa de metabolismo da célula está alta e com muita produção de ATP, o ATP interage com as unidades Kir6 e o canal se fecha, já o ADP promove a abertura dos canais devido a interação com as subunidades SURx (NICHOLS, 2006; HIBINO et al., 2010). Estes canais são essenciais para a liberação de insulina induzida pela glicose nas células β pancreáticas. Assim como as células β pancreáticas, os neurônios sensoriais periféricos são permeáveis à glicose (GARDINER et al., 2007) e expressam canais de K^+_{ATP} (RISTOIU et al., 2002; RANG et al., 2016). Portanto, um mecanismo semelhante ao responsável pela liberação de insulina induzida pela glicose pelas células β pancreáticas poderia explicar a despolarização induzida pela hiperglicemia em neurônios nociceptivos. Para testar o envolvimento dos canais de K^+_{ATP} , investigou-se os efeitos da ativação e inativação farmacológica dos canais de K^+_{ATP} sobre o potencial de repouso da membrana dos neurônios sensoriais primários. O diazóxido e a glibenclamida foram utilizados como ativador e inativador do canal K^+_{ATP} , respectivamente. A administração de diazóxido bloqueou a despolarização induzida pela hiperglicemia em neurônios nociceptivos, sugerindo o envolvimento dos canais de K^+_{ATP} . Além disso, observou-se que a glibenclamida, um inibidor de canais de K^+_{ATP} , é capaz de despolarizar os neurônios nociceptivos. Assim sendo, os canais K^+_{ATP} abertos parecem participar da manutenção do potencial de repouso dos neurônios nociceptivos primários.

A importância da ativação dos canais K^+_{ATP} na modulação da excitabilidade dos neurônios sensoriais é corroborada por um trabalho realizado em ratos que demonstrou que a

ativação de K^+_{ATP} , utilizando diazóxido, inibiu a hiperexcitabilidade induzida pela bradicinina em neurônios do GRD (DU; WANG; ZHANG, 2011). Também de forma semelhante ao observado no presente trabalho, estudo com neurônios hipocâmpais descreve um aumento de excitabilidade neuronal induzido por alta concentração de glicose e que foi atenuado pela abertura de canais K^+_{ATP} (HUANG et al., 2007). Ademais, foi demonstrado anteriormente que, os canais de K^+_{ATP} , expressos em neurônios nociceptivos desempenham um papel importante *in vivo*, na modulação da hiperalgesia mecânica. As ações antinociceptivas periféricas dos opióides, do diclofenaco e da dipirona são dependentes da abertura dos canais de K^+_{ATP} (CUNHA et al., 2010; ALVES et al., 2004; ALVES; DUARTE, 2002; SANTOS et al., 2014). A ativação da via de sinalização PI3K/AKT pelos opióides estimula a produção de óxido nítrico e promove a abertura dos canais K^+_{ATP} . Esta via pode causar uma hiperpolarização de neurônios nociceptivos contrabalaneando sua excitabilidade aumentada em um processo inflamatório (CUNHA et al., 2010; CUNHA et al., 2012). É interessante notar que a ativação do receptor de insulina também leva à ativação de PI3K/AKT em neurônios sensoriais primários (KIM et al., 2011). Portanto, é possível que o efeito da insulina nos neurônios nociceptivos resulte na abertura dos canais K^+_{ATP} e hiperpolarização da membrana da célula, uma vez que, os resultados desse nosso trabalho mostraram que a administração de insulina bloqueou a despolarização dos neurônios sensoriais induzida pela glicose. O efeito da insulina sobre os canais K^+_{ATP} também pode explicar a diminuição do limiar nociceptivo mecânico e térmico observado em animais com reduzida produção de insulina (ROMANOVSKY et al., 2004, 2006), sendo assim uma hipótese interessante a ser estudada.

Os resultados obtidos com a administração *in vitro* de altas concentrações de glicose sugerem que a glicose pode ter um efeito agudo direto na sensibilidade nociceptiva. Um efeito direto da hiperglicemia já foi descrito em um estudo que testou o efeito da administração crônica de soluções de glicose nos gânglios da raiz dorsal usando bombas osmóticas (DOBRETISOV et al., 2001). Neste estudo, foi detectado um aumento da sensibilidade mecânica em animais que começou logo após o início do tratamento (DOBRETISOV et al., 2001). Para testar um efeito agudo da hiperglicemia e o envolvimento dos canais de K^+_{ATP} , usamos injeções diretas nos gânglios da raiz dorsal L5 direito de ratos (FERRARI et al., 2007). Os resultados mostram que a injeção de glicose nos gânglios da raiz dorsal aumenta a sensibilidade mecânica. O efeito foi observado de 15 a 30 minutos e provavelmente não foi sustentado por causa da metabolização e difusão da glicose, visto que foi realizada apenas uma injeção. Como observado *in vitro*, o efeito não foi devido ao aumento da osmolaridade,

pois o manitol na mesma concentração da maior concentração de glicose testada (600 mg/dL), não afetou o limiar de nocicepção mecânica. A solução de manitol é utilizada para alterar a osmolaridade porque o manitol é um tipo de açúcar inerte metabolicamente e que é estruturalmente similar a dextrose (BERTRAND et al., 2015), ela exerce um efeito osmótico, pois praticamente não é absorvida, já que é recuperada totalmente após passagem pelos rins e intestino (ADKIN et al., 1994).

Visto que os resultados obtidos *in vitro*, indicam um papel dos canais K^+_{ATP} no efeito da hiperglicemia sobre nociceptores, decidimos avaliar se estes canais estão envolvidos no aumento de sensibilidade mecânica induzida pela injeção de solução hiperglicêmica no gânglio da raiz dorsal. Verificamos que o efeito da hiperglicemia foi bloqueado pela co-administração de diazóxido, abridor de canal K^+_{ATP} , sugerindo que os canais K^+_{ATP} também estão envolvidos na hiperalgesia mecânica aguda induzida pela glicose. Assim como em um estudo de Du e colaboradores (2011) que também sugeriu a importância desses canais K^+_{ATP} na resposta nociceptiva, pois mostrou que o uso de ativadores diazóxido e pinacidil antagonizou a resposta nociceptiva a estímulos mecânicos e atenuou o comportamento nocifensivo térmico e mecânico induzido por bradicinina. Outro estudo realizado anteriormente igualmente mostrou a importância da ativação dos canais de potássio sensíveis ao ATP na resposta antinociceptiva, onde o diazóxido diminuiu a ação hiperalgésica da carragenina em dois testes de nocicepção mecânica, Randall Selitto e Von Frey eletrônico (ÁVILA et al., 2014).

Existe uma forte associação entre hiperglicemia e neuropatia, visto que a neuropatia diabética pode ser prevenida ou retardada quando os níveis de glicose são controlados (CALLAGHAN et al., 2012). O papel dos canais de K^+_{ATP} na secreção de insulina é bem caracterizado, sendo que o fechamento de canais K^+_{ATP} resulta em despolarização da membrana da célula β e estimulação da secreção de insulina. As sulfonilureias como glibenclamida são amplamente utilizadas para o tratamento de diabetes tipo 2 (SZETO et al., 2018; RUBAIY, 2016), pois a ligação na subunidade SUR1 promove o fechamento dos canais K^+_{ATP} , despolarização da membrana, influxo de cálcio para o interior da célula e aumento da secreção de insulina (HENQUIN, 2000). No entanto, como esse trabalho mostrou que os canais K^+_{ATP} podem estar envolvidos em um efeito direto da glicose em neurônios sensoriais primários, seria importante considerar tal efeito na prescrição de sulfonilureias.

De fato, há evidências de que pacientes diabéticos submetidos ao tratamento com sulfonilureia podem apresentar maior risco de desenvolvimento de neuropatia (POP-BUSUI et al., 2009) e, além disso, um estudo com animais demonstrou que o bloqueio de canais

K^+_{ATP} por sulfonilureias como a glibenclamida em neurônios possivelmente causa neurotoxicidade e a administração sistêmica dessa droga pode causar danos em vários tipos celulares (KOU et al., 2006). Um estudo que acompanhou pacientes diabéticos em tratamento por 5 anos e mostrou que a maioria dos agentes usados no tratamento de hiperglicemia pode atuar diretamente no desenvolvimento de complicações independente dos níveis de glicose, e, tratamentos que envolvem um aumento da disponibilização de insulina, como o uso de sulfonilureias, tem tendência a apresentar maior incidência de neuropatia diabética periférica do que tratamentos que envolvem a sensibilização à ação da insulina (POP-BUSUI et al., 2013). Deste modo, o presente estudo indica a necessidade de mais estudos clínicos que determinem a relação entre o tratamento com sulfonilureias e a neuropatia diabética periférica.

Em conjunto, os dados descritos no presente estudo sugerem que os canais de K^+_{ATP} estão envolvidos no efeito agudo da hiperglicemia nos neurônios nociceptivos. O estudo do envolvimento dos canais de K^+_{ATP} no desenvolvimento da neuropatia sensorial crônica diabética pode fornecer informações valiosas para a prevenção dessa condição. Além disso, como sulfonilureias são comumente usadas para tratar pacientes diabéticos tipo 2, um possível efeito adverso de tais drogas em neurônios sensoriais primários deve ser investigado.

7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo permitem concluir que:

- Glicose em altas concentrações altera o potencial de repouso de neurônios nociceptivos, causando despolarização da membrana dessas células.
- Administração de insulina inibe a despolarização causada pela glicose, enquanto que este hormônio *per se* parece induzir uma rápida hiperpolarização da membrana de neurônios nociceptivos.
- A despolarização induzida pela alta concentração de glicose parece depender do fechamento de canais K^+_{ATP} em neurônios nociceptivos, uma vez que a abertura destes impede a despolarização da membrana e o fechamento provoca efeito semelhante ao observado na administração de glicose.
- A administração intraganglionar de altas concentrações de glicose provoca uma diminuição do limiar de sensibilidade nociceptiva mecânica em ratos.
- Os canais de potássio sensíveis a ATP parecem estar envolvidos no aumento de sensibilidade mecânica induzido pela alta concentração de glicose, já que a ativação farmacológica desses canais impede a diminuição do limiar provocada por glicose.

REFERÊNCIAS

- ADKIN, D.A.; DAVIS, S.S.; SPARROW, R.A.; HUCKLE, P.D.; PHILLIPS, A.J.; WILDING, I.R. The effect of different concentrations of mannitol in solution on small intestinal transit: implications for drug absorption. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 393-396, 1994. <https://doi.org/10.1023/A:1016256619309>
- ALVES, D.P.; DUARTE, I.D. Involvement of ATP-sensitive K⁽⁺⁾ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. **European Journal of Pharmacology**, v.444(1-2), p.47-52, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)01412-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)01412-7)
- ALVES, D.P.; TATSUO, M.A.; LEITE, R.; DUARTE, I.D. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K⁺ channels activation. **Life Science**, v.74(20), p.2577-91, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.012>
- ALVES NETO, O.; COSTA, C.M.C.; SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M.J. e colaboradores. **Dor: princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed, Cap. 20, 2008.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.36(1), p.567-574, 2013. <https://doi.org/10.2337/dc13-S067>
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2012. **Diabetes Care**, v.35(1), p.S11-63, 2012. <https://doi.org/10.2337/dc12-s011>
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Standards of medical care in diabetes.Position statement. **Diabetes Care**, v.40(1), p.S1–135, 2017.
- ASHCROFT, F.M. AND RORSMAN, P . Diabetes mellitus and the β cell: The last ten years. **Cell**, v.148, p.1160–1171, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.010>
- ASHCROFT, F.M. AND RORSMAN, P. KATP channels and islet hormone secretion: New insights and controversies. **Nature Review Endocrinology**, v.9, p.660–669, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.166>
- ASHCROFT, F. M. K.(ATP) channels and insulin secretion: a key role in health and disease. **Biochemical Society Transactions**, v.34(2), p.243-246, 2006. <https://doi.org/10.1042/BST0340243>
- ÁVILA, M.A.P; GIUSTI-PAIVA, A.; NASCIMENTO, C.G.O. The peripheral antinociceptive effect induced by the heme oxygenase/carbon monoxide pathway is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 726, p. 41-48, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.012>
- AZEVEDO, M. A toxicidade dos açúcares. **Acta Médica Portuguesa**, v.7, p.5-6, 1986.
- BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.52(6), 2008. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000600005>

BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutrição**, v.22(1), p.113-24, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732009000100011>

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **Journal of Comparative Neurology**, v.277(2), p.302-312, 1988. <https://doi.org/10.1002/cne.902770210>

BEN-HAROUSH, A.; YOGEV, Y.; HOD, M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v.21, p.103-113, 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2003.00985.x>

BENNETT, D.L.H.; WOODS, C.G. Painful and painless channelopathies. **Lancet Neurology**, v.13, p.587-99, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70024-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70024-9)

BERTRAND, H.; KYRIAZIS, M.; REEVES, K.D.; LYFTOGT, J.; RABAGO, D. Topical Mannitol Reduces Capsaicin-Induced Pain: Results of a Pilot-Level, Double-Blind, Randomized Controlled Trial. **PM&R**, v.7, p. 1111-1117, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2015.05.002>

BIERHAUS, A.; HOFMAN, M.A.; ZIEGLER, R.; NAUROTH, P.P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovascular Research**, v.37(3), p.586-600, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(97\)00233-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(97)00233-2)

BROWNLEE, M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. **Annual Review of Medicine**, v. 46, p.223-234, 1995. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.46.1.223>

BRUSSEE, V.; CUNNINGHAM F.A.; ZOCHODNE D.W. Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy. **Diabetes**, v.53(7), p.1824-30, 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.7.1824>

BURGERING, B. M. e COFFER, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. **Nature**, v.376(6541), p.599-602, 1995. <https://doi.org/10.1038/376599a0>

CALLAGHAN, B.C.; LITTLE, A.A.; FELDMAN, E.L.; HUGHES, R.A. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. **The Cochrane Database Systematic Reviews**, v.6, p.CD007543, 2012. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD007543.pub2>

CREGG, R.; MOMIN, A.; RUGIERO, F.; WOOD, J.N.; ZHAO, J. Pain channelopathies. **The Journal of Physiology**, v. 588(11), p. 1897-1904, 2010. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187807>

CUMMINS, T.R.; DIB-HAJJ, S.D.; WAXMAN, S.G. Electrophysiological properties of mutant Nav1.7 sodium channels in a painful inherited neuropathy. **Journal of Neuroscience**, v.24(38), p.8232-6, 2004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2695-04.2004>

CUNHA, T. M.; ROMAN-CAMPOS D.; LOTUFO, C.M.; DUARTE, H.L.; SOUZA, G.R.; VERRI, W.A.Jr.; FUNEZ, M.I.; DIAS, Q.M.; SCHIVO, I.R.; DOMINGUES, A.C.; SACHS,

D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M.M.; HOTHERSALL, J.S.; CRUZ, J.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107(9), p.4442-7, 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914733107>

CUNHA, T. M.; SOUZA, G. R.; DOMINGUES, A.C.; CARREIRA, E.U.; LOTUFO, C.M.; FUNEZ, M.I.; VERRI, W.A.Jr.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO signaling pathway. **Molecular Pain**, v.8, p.1-8, 2012. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-8-10>

DE OLIVEIRA, G.L.; GUERRA JUNIOR, A.A.; GODMAN, B.; ACURCIO F.A. Cost-effectiveness of vildagliptin for people with type 2 diabetes mellitus in Brazil; findings and implications. **Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research**, v.17(2), p.109–19, 2017. <https://doi.org/10.1080/14737167.2017.1292852>

DOBRETSOV, M.; HASTINGS, S.L.; STIMERS, J.R.; ZHANG, J.M. Mechanical hyperalgesia in rats with chronic perfusion of lumbar dorsal root ganglion with hyperglycemic solution. **Journal of Neuroscience Methods**, v.110(1-2), p.9-15, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(01\)00410-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(01)00410-1)

DOBRETSOV, M.; ROMANOVSKY, D.; STIMERS, J.R. Early diabetic neuropathy: triggers and mechanisms. **World Journal of Gastroenterology**, v.13(2), p.175-91, 2007. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i2.175>

DU, X.; GUMPER, N. Potassium Channels in Peripheral Pain Pathways: Expression, Function and Therapeutic Potential. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 621-640, 2013. <https://doi.org/10.2174/1570159X113119990042>

DU, X.; WANG, C.; ZHANG, H. Activation of ATP-sensitive potassium channels antagonize nociceptive behavior and hyperexcitability of DRG neurons from rats. **Molecular Pain**, v. 7, p. 35, 2011. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-35>

EID, S.R.; CORTRIGHT, D.N. Transient receptor potential channels on sensory nerves. **Handbook of experimental pharmacology**, v.194, p.261-81, 2009. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79090-7_8

ESTACION, M.; CHOI, J.S.; EASTMAN, E.M.; LIN, Z.; LI, Y.; TYRRELL, L.J.; YANG, Y.; DIB-HAJJ, S.D. & WAXMAN, S.G. Can robots patch-clamp as well as humans? Characterization of a novel sodium channel mutation. **The Journal of Physiology**, v.588, p.1915–1927, 2010. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.186114>

FELDMAN, E.L.; BENNETT, D.L.H.; NAVE, K.A.; JENSEN, T.S. New horizons in diabetic neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. **Neuron**, v.93(6), p.1296-1313, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.005>

FERRARI, L.F.; CUNHA, F.Q.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H. A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v.159(2), p.236–243, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.07.025>

FERREIRA, L.T.; SAVIOLLI, I.H.; VALENTI, V.E.; ABREU, L.C. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36(3), p.182-8, 2011. <https://doi.org/10.7322/abcs.v36i3.59>

GARDINER, N.J.; WANG, Z.; LUKE, C.; GOTT, A.; PRICE, S.A.; FERNHOUGH, P. Expression of hexokinase isoforms in the dorsal root ganglion of the adult rat and effect of experimental diabetes. **Brain Research**, v.1175, p.143-54, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.015>

GRABAUSKAS, G.; SONG, I.; ZHOU, S.Y.; OWYANG, C. Electrophysiological identification of glucose-sensing neurons in rat nodose ganglia. **The Journal of Physiology**, v.588(4), p.617–631, 2010. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.182147>

GUARIGUATA, L.; WHITING, D.R.; HAMBLETON, I.; BEAGLEY, J.; LINNENKAMP, U.; SHAW, J.E. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.103(2), p.137-49, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>

HE, X.D.; GUO, Y.M.; GOYAL, R.K. Effect of Hyperglycemia on Purinergic and Nitroergic Inhibitory Neuromuscular Transmission in the Antrum of the Stomach: Implications for Fast Gastric Emptying. **Frontiers of Medicine**, v.5, p.1-9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00001>

HENQUIN, J.C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49(11), p. 1751-1760, 2000. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1751>

HIBINO, H.; INANOBE, A.; FURUTANI, K.; MURAKAMI, S.; FINDLAY, I. & KURACHI, Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. **Physiological Reviews**, v.90, p.291-366, 2010. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009>

HONG, S.; MORROW T. J.; PAULSON, P.E.; ISOM, L.L.; WILEY, J.W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279 (28), p.29341-50. 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404167200>

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(1), p.618–627, 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408500200>

HUANG, C.W.; HUANG, C.C.; CHENG, J.T.; TSAI, J.J.; WU, S.N. Glucose and hippocampal neuronal excitability: role of ATP-sensitive potassium channels. **The Journal of Neuroscience**, v. 85, p. 1468-1477, 2007. <https://doi.org/10.1002/jnr.21284>

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 6th ed. Bruxelas, Bélgica, 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 8th Edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

JAN, L.Y.; JAN, Y.N. Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. **Annual Review of Physiology**, v.54, p.537-55, 1992. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.002541>

JENSEN, T.S.; FINNERUP, N.B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. **The Lancet**, v.13(9), p. 924-935, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70102-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70102-4)

KAHN, S.E.; HULL, R.L. AND UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v.444(7121), p. 840-6, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature05482>

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M.; SIEGELBAUM, S.A.; HUDSPETH, A.J. **Princípios de neurociências**. 5ª edição. AMGH editora LTDA, 2014.

KIM, B.; MCLEAN, L. L.; PHILIP S.S; FELDMAN, E.L.. Hyperinsulinemia induces insulin resistance in dorsal root ganglion neurons. **Endocrinology**, v.152(10), p.3638-47, 2011. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0029>

KOU, J.; KLORIG, D.C.; BLOOMQUIST, J.R. Potentiating effect of the ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide on complex I inhibitor neurotoxicity in vitro and in vivo. **NeuroToxicology**, v.27(5), p.826-834, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2006.04.004>

KOEPPEN, B. M. BERNE e LEVY. **Fisiologia**. Elsevier, 2009.

KUZUMOTO, Y.; KUSUNOKI, S.; KATO, N.; KIHARA, M.; LOW, P.A. Effect of the aldose reductase inhibitor fidarestat on experimental diabetic neuropathy in the rat. **Diabetologia**, v.49(12), p.3085-93, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0400-7>

LECHNER, S.G.; MARKWORTH S.; POOLE, K.; SMITH, E.S.J.; LAPATSINA, L.; FRAHM, S.; MAY, M.; PISCHKE, S.; SUZUKI, M.; IBAÑEZ-TALLON, I.; LUFT, F.C.; JORDAN, J.; LEWIN, G.R. The Molecular and Cellular Identity of Peripheral Osmoreceptors. **Neuron**, v. 69, p. 332–344, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.028>

LEE, J.H.; COX, D.J.; MOOK, D.G.; McCARTY, R.C. Effect of hyperglycemia on pain threshold in alloxan-diabetic rats. **Pain**, v.40(1), p.105-107, 1990. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)91057-P](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)91057-P)

LEE, J.H.; McCARTY, R.C. Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats. **Physiology & Behavior**, v.47(2), p.225-230, 1990. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90135-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90135-Q)

LEE, J.H.; McCARTY, R.C. Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. **Pain**, v.50(2), p.231-236, 1992. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90167-A](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90167-A)

LEITE, L.S.; SALGADO, P.R.R.; FONSECA, D.V. Bases moleculares da patogênese e tratamento da neuropatia diabética. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v.2(3), p.701-711, 2017.

LINHART, O.; OBREJA, O.; KRESS.M. The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. **Neuroscience**, v. 118, p. 69-74, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00960-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00960-0)

LINLEY, J.E.; ROSE, K.; OOI, L. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **European Journal of Physiology**, v. 459, p.657-669, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0784-6>

LIU, M. & WOOD J.N. The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of neuropathic pain. **Pain Medicine**, v. 12(3), p. S93-9, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2011.01158.x>

LUZI, L.; POZZA, G. Glibenclamide: an old drug with a novel mechanism of action? **Acta Diabetologica**, v. 34, p. 239-244, 1997. <https://doi.org/10.1007/s005920050081>

MÁRQUEZ, J.O. Neuropatia Periférica Diabética Dolorosa: uma nova abordagem terapeutica. **Revista de Neurociências**, v. 14(3), p. 166-168, 2006.

MATSUKA, Y.; SPIGELMAN, I. Hyperosmolar Solutions Selectively Block Action Potentials in Rat Myelinated Sensory Fibers: Implications for Diabetic Neuropathy. **Journal of Neurophysiology**, v. 91, p. 48–56, 2004. <https://doi.org/10.1152/jn.00689.2003>

MCKILLOP, A.M.; ABDEL-WAHAB, Y.H.; MOONEY, M.H.; O’HARTE, F.P.; FLATT, P.R. Secretion of glycated insulin from pancreatic beta-cells in diabetes represents a novel aspect of beta-cell dysfunction and glucose toxicity. **Diabetes & Metabolism**, v. 28, p. 3S61-69, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00292-6](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00292-6)

MEALEY, B.L.; OCAMPO, G.L. Diabetes mellitus and periodontal disease. **Periodontology** 2000, v. 44(1), p. 127–53, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00193.x>

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57(1), p.1- 164, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00048-3)

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diabetes mellitus. Cadernos de atenção básica**. 1ª edição, n.16, 2006.

MONNIER, V.M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419(1), p. 1-15, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.014>

MUOIO, D.M. AND NEWGARD, C.B. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9(3), p. 193-205, 2008. <https://doi.org/10.1038/nrm2327>

NAIDU, R. K.; PHAM, T. M. Pain management. In: SIKKA, P. K.; BEAMAN, S. T.; STREET, J. A. **Basic Clinical Anesthesia**. New York: Springer, p. 265-296, 2015.

NICHOLS, C.G. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. **Nature**, v. 440, p. 470–476, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04711>

OLIVEIRA, J.O.Jr.; PORTELLA, C.S.A.Jr.; COHEN, C.P. Mediadores inflamatórios na dor neuropática. **Revista Dor**, v. 17(1), p. S35-42, 2016.

OLIVEIRA, L.M. DORES. In: Lente, R. **Neurociência da Mente e do Comportamento**. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan. Cap8, p. 183-201. 2008.

OLIVEIRA, M.I.A.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; RÉA, R.R.; ALVES, A.S.C.; PICHETH, G.; REGO, F.G.M. RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**, v. 49(2), p. 97-108, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442013000200004>

ORIÁ, R.B.; BRITO, G.A.C. **Sistema digestório: integração básico-clínica**. 1ª edição, cap. 20, p. 523-574, 2016.

PERENA, M.J.; PERENA, M.F.; RODRIGO-ROYO, M.D.; ROMERA, E. Neuroanatomy of pain. **Revista de la Sociedad Española del Dolor**, v. 7(Supl. II), p. 5-10, 2000.

PICKUP, J.C. & WILLIAMS, G.M.D. **Textbook of Diabetes**. Blackwell Scientific, 1991.

PLATANO, D.; FATTIRETTI, P.; BALIETI, M.; GIORGETTI, B.; CASOLI, T.; DI STEFANO, G.; BERTONI-FREDDARI, C.; AICARDI, G. Synaptic remodeling in hippocampal CA1 region of aged rats correlates with better memory performance in passive avoidance test. **Rejuvenation Research**, v. 11(2), p. 341-8, 2008. <https://doi.org/10.1089/rej.2008.0725>

PONTES ANDERSEN, C.C.; FLYVBJERG, A.; BUSCHARD, K.; HOLMSTRUP, P. Relationship Between Periodontitis and Diabetes: Lessons From Rodent Studies. **Journal of Periodontology**, v. 78(7), p. 1264–75, 2007. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060491>

POP-BUSUI, R.; BOULTON, A.J.M.; FELDMAN, E.L.; BRIL, V.; FREEMAN, R.; MALIK, R.A.; SOSENKO, J.M.; ZIEGLER, D. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by The American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 40(1), p. 136-154, 2017. <https://doi.org/10.2337/dc16-2042>

POP-BUSUI, R.; LU, J.; LOPES, N.; JONES, T.L.; BARI 2D INVESTIGATORS. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and relation to glycemic control therapies at baseline in the BARI 2D cohort. **Journal of Peripheral Nervous System**, v. 14(1), p. 1-13, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2009.00200.x>

POP-BUSUI, R.; LU, J.; BROOKS, M.M.; ALBERT, S.; ALTHOUSE, A.D.; ESCOBEDO, J.; GREEN, J.; PALUMBO, P.; PERKINS, B.A.; WHITEHOUSE, F.; JONES, T.L.Z. AND FOR THE BARI 2D STUDY GROUP. Impact of Glycemic Control Strategies on the Progression of Diabetic Peripheral Neuropathy in the Bypass Angioplasty Revascularization

Investigation 2 Diabetes (BARI 2D) Cohort. **Diabetes Care**, v. 36(10), p. 3208-3215, 2013. <https://doi.org/10.2337/dc13-0012>

PRIEST, B.T.; MURPHY, B.A.; LINDIA, J.A.; DIAZ, C.; ABBADIE, C.; RITTER, A.M.; LIBERATOR, P.; IYER, L.M.; KASH, S.F.; KOHLER, M.G.; KACZOROWSK, G.J.; MacINTYRE, D.E.; MARTIN, W.J. Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel NaV1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS**, v. 102, p.9382–9387, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501549102>

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W.C.; LAMANTIA, A.S.; McNAMARA, J.O.; WHITE, L.E. **Neurociências**, 4ª edição, cap.10, p. 231-250, 2010.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: Farmacologia**. Tradução da 8ª edição, cap. 3 e 4, 2016.

RAOUF, R.; QUICK, K.; WOOD, J.N. Pain as a channelopathy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3745–3752, 2010. <https://doi.org/10.1172/JCI43158>

RISTOIU, V.; PLUTEANU, F.; FLONTA, M.L.; REID, G. Few cultured rat primary sensory neurons express a tolbutamide-sensitive K⁺ current. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.6(2), p. 271-274, 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2002.tb00194.x>

RODRIGUES, A. R. & DUARTE, I. D.. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 129(1), p. 110-4, 2000. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703038>

ROMANOVSKY, D., HASTINGS, S.L., STIMERS, J.R., DOBRETSOV, M. Relevance of hyperglycemia to early mechanical hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetes. **Journal of Peripheral Nervous System**, v. 9(2), p. 62-69, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1085-9489.2004.009204.x>

ROMANOVSKY, D., CRUZ, N.F., DIENEL, G.A., DOBRETSOV, M. Mechanical hyperalgesia correlates with insulin deficiency in normoglycemic streptozotocin-treated rats. **Neurobiology of Disease**, v. 24(2), p. 384-94, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.07.009>

ROZA, C.; LAIRD, J.M.; SOUSLOVA, V.; WOOD, J.N.; CERVERO, F. The tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. **The Journal of Physiology**, v. 550, p. 921-926, 2003. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046110>

RUBAIY, H.N. The therapeutic agents that target ATP-sensitive potassium channels. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 66, p. 23–34, 2016. <https://doi.org/10.1515/acph-2016-0006>

RUSSELL, J.W.; SULLIVAN, K.A.; WINDERBANK, A.J.; HERRMANN, D.N.; FELDMAN, E.L. . Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. **Neurobiology of Disease**, v. 6(5), p. 347-63, 1999. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0254>

SANTOS, G.G.; DIAS, E.V.; TEIXEIRA, J.M.; ATHIE, M.C.; BONET, I.J.; TAMBELLI, C.H.; PARADA, C.A. The analgesic effect of dipyron in peripheral tissue involves two different mechanisms: neuronal K(ATP) channel opening and CB(1) receptor activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, p. 124-31, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.019>

SHERRINGTON, C.S. Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus. **The Journal of Physiology**, v. 30, p. 39-46, 1903. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1903.sp000980>

SMITH, A.J.; TANEJA, T. K.; MANKOURI, J.; SILVAPRASADARAO, A. Molecular cell biology of KATP channels: implications for neonatal diabetes. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 9(21), p. 1-17, 2007. <https://doi.org/10.1017/S1462399407000403>

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018/** Organização de José Egídio Paula de Oliveira, Renan Magalhães Montenegro Júnior , Sérgio Vencio. São Paulo: Editora Clannad, 2017. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>>. Acesso em 29 de maio de 2018.

SUN, W.; MIAO, B.; WANG, X.C.; DUAN, J.H.; WANG, W.T.; KUANG, F.; XIE, R.G.; XING, J.L.; XU, H.; SONG, X.J.; LUO, C.; HU, S.J. Reduced conduction failure of the main axon of polymodal nociceptive C-fibres contributes to painful diabetic neuropathy in rats. **Brain**, v. 135(Pt 2), p. 359-75, 2012. <https://doi.org/10.1093/brain/awr345>

SZETO, V.; CHEN, N.H.; SUN, H.S.; FENG, Z.P. The role of Katp channels in cerebral ischemic stroke and diabetes. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 39, p. 683-694, 2018. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.10>

TEDDY, Study Group. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1150, p. 1–13, 2008. <https://doi.org/10.1196/annals.1447.062>

VINCENT, A.M.; MCLEAN, L.L.; BACKUS, C.; FELDMAN, E.L. Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. **Faseb Journal**, v. 19(6), p. 638-40, 2005a. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2513fje>

VINCENT, A.M.; STEVENS, M.J.; BACKUS, C.; MCLEAN, L.L.; FELDMAN, E.L. Cell culture modeling to test therapies against hyperglycemia-mediated oxidative stress and injury. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 7(11-12), p. 1494-506, 2005b. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1494>

VIVANCOS, G.G.; VERRI, W.A. JR.; CUNHA, T.M.; SCHIVO, I.R.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37(3), p. 391–399, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000300017>

ZHOU, S. Y.; LU, Y.; SONG, I.; OWYANG, C.C Inhibition of gastric motility by hyperglycemia is mediated by nodose ganglia KATP channels. **American Journal of**

Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology, v. 300(3), p. G394-400, 2011.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00493.2010>

ZIMMERMANN M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. **Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum**, v.554, p.221-233, 1986.

ZULIANI, V.; RIVARA, M.; FANTINI, M.; COSTANTINO, G. Sodium channel blockers for neuropathic pain. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 20(6), p. 755-79, 2010.
<https://doi.org/10.1517/13543771003774118>

ANEXO I: APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS/UFU



Uberlândia, 29 de março de 2017

DE: Msc. Murilo Vieira da Silva

Coordenador – CBEA/UFU

PARA: Prof. Dr. Lúcio Vilela Cameiro Girão

Coordenador – CEUA

ASSUNTO: Anuência para utilização do CBEA-UFU


Por meio deste, o Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia confere anuência, mediante análise da demanda geral de usuários do CBEA, ao projeto de pesquisa intitulado: "**ESTUDO DO EFEITO DA HIPERGLICEMIA E DA INSULINA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE NEURÔNIOS NOCICEPTIVOS PRIMÁRIOS: AVALIAÇÃO DO PAPEL DE CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS A ATP**" sob coordenação do (a) **Prof. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo**, a ser executado no período de 01/06/2017 à 30/03/2019. Tal anuência se dá em relação à:

- **Espaço Físico para desenvolvimento dos experimentos: Sim () Não (X);**
 - OBS: Ressalta-se que tais experimentos somente serão realizados nas dependências físicas do CBEA após aprovação pelo CEUA e a devida entrega do protocolo de aprovação à coordenação do CBEA;
- **Animais: Sim (X) Não () ;**

Linhagem/Colônia	Ratos Wistar
Idade	5 semanas
Peso aproximado	200 gramas
Sexo	Macho (X) - Quantidade (42); Fêmea (X) - Quantidade (63); Total: 105

Estou à disposição de V.Sa. para futuros esclarecimentos.

Atenciosamente,


Murilo Vieira da Silva
 Assessor para coordenar as
 atividades operacionais do CBEA/
 Portaria R Nº539 de 14/05/2015

E-mail: cbeaufu@gmail.com - Tel: (034) 3225-8540 / 3225-8541 / 3225-8542

Av. Amazonas, s/n - Bloco 4U - Campus Umarama, Uberlândia, MG - CEP: 38.405-320