

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

Paulla Vieira Rodrigues

**Comparação entre estreptozotocina e aloxana como indutores de diabetes experimental
para estudos dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética**

Uberlândia
Outubro – 2018

Paula Vieira Rodrigues

Comparação entre estreptozotocina e aloxana como indutores de diabetes experimental para estudos dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética

Projeto de pesquisa submetido ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas como requisito parcial a obtenção do título de mestre.

Paula Vieira Rodrigues

Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Uberlândia
Outubro – 2018

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

R696c
2018 Rodrigues, Paulla Vieira, 1994
 Comparação entre estreptozotocina e aloxana como indutores de diabetes experimental para estudos dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética [recurso eletrônico] / Paulla Vieira Rodrigues. - 2018.

 Orientadora: Celina Monteiro da Cruz Lotufo.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1259>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.

 1. Citologia. 2. Diabetes. 3. Aloxano. 4. Estreptozotocina. I. Lotufo, Celina Monteiro da Cruz, 1975, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902

Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br

**ATA**

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número: 007/2018 do PPGBC

Data: **04 de Outubro de 2018**

Discente: **Paulla Vieira Rodrigues**

Matrícula nº 11622BCE002

Título do Trabalho: “**Comparação entre streptozotocina e aloxana como indutores de diabetes experimental para estudos dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética**”

Área de concentração: Biologia Celular

Linha de Pesquisa: Mecanismos de Reparo e Plasticidade Tecidual

Projeto de Pesquisa vinculado:

DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às quatorze horas do dia cinco de outubro do ano de 2018 no Laboratório de Práticas Virtuais, Sala 2A112 – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: **Professores Doutores: Joice Maria da Cunha – UFPR; Ana Paula Coelho Balbi – UFU e Celina Monteiro da Cruz Lotufo orientadora** da candidata. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo apresentou a Comissão Examinadora e a candidata **Paulla Vieira Rodrigues**, agradeceu a presença do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Paulla Vieira Rodrigues** aprovada. Sugerindo, (se couber) o novo título para o trabalho: _____

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. 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.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida, por me capacitar e permitir a realização de tantos sonhos!

Aos meus pais, **Pedro e Josefa**, exemplo de dignidade e dedicação, obrigada por toda assistência, especialmente à minha mãe, por sempre acreditar e me incentivar na busca pelo conhecimento. Sei que este sonho também é seu.

Às minhas irmãs, **Larissa e Gabriella**, pela amizade e companheirismo. Obrigada pela força e pela torcida.

Ao meu namorado, **Marcos Felipe**, pela paciência e compreensão, pela sua incansável boa vontade em me ajudar, sempre me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Obrigada por permanecer ao meu lado em todos momentos.

À minha querida orientadora, **Celina Lotufo**, pelo apoio, incentivo, paciência e disponibilidade. Obrigada por acreditar em mim e por ser minha mãe científica desde o TCC. A você, todo o meu respeito e mais profunda admiração!

Aos meus amigos de laboratório, **Maria Vitória, Tais, Débora, Júlia e Bruno** pelos bons momentos que passamos juntos. Obrigada pela troca de experiências e aprendizados, vocês com certeza tornaram mais leve essa jornada. Obrigada por dividir comigo minhas angústias e alegrias! Vocês foram fundamentais para que isso se tornasse uma realidade.

A **todos professores** do instituto, em especial a Professora **Ana Paula Coelho Balbi**. Existem pessoas que nos inspiram e você é uma delas!

A **todos funcionários** do departamento que possibilitaram a realização desse projeto, dando suporte para que eu pudesse realizar minhas atividades.

A professora **Joice Cunha**, pela disponibilidade e por ter aceitado o convite para compor minha banca examinadora.

A **CAPES**, pelo financiamento que permitiu o desenvolvimento desse projeto.

A **UFU**, incluindo todos os colaboradores, pela credibilidade, financiamento e contribuições feitas a esse projeto.

Muito obrigada a todos que de alguma forma fizeram parte da realização deste trabalho!

*" É preciso força para sonhar e perceber
que a estrada vai além do que se vê."*

(Los Hermanos)

RESUMO

O diabetes melito é uma doença de alta prevalência no mundo todo. Os modelos animais de diabetes experimental desempenham um papel fundamental na elucidação da patogênese do diabetes em humanos e de suas complicações, incluindo a neuropatia diabética. As drogas mais utilizadas para a indução do diabetes experimental são estreptozotocina e aloxana, com maior prevalência da primeira nos estudos em roedores. Entretanto, existem evidências de que a estreptozotocina pode alterar a sensibilidade de animais tratados com essa droga independente de sua condição glicêmica. O objetivo desse trabalho foi comparar os efeitos da estreptozotocina e aloxana como indutores de diabetes experimental para estudos dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética em ratos. Foram utilizados ratos Wistar para avaliar os efeitos sistêmicos das duas drogas avaliando-se as sensibilidades mecânicas e térmicas dos animais durante 5 semanas em animais tratados com duas doses de aloxana (30 e 15 mg/kg) e estreptozotocina (35 e 17,5 mg/kg). Ambas as drogas induziram hiperglicemia de forma similar em parte dos animais, enquanto que a outra parte permaneceu normoglicêmica. Não foram observadas variações na sensibilidade térmica em nenhum dos tempos e tratamentos testados. O tratamento com estreptozotocina mostrou alterações mais evidentes no limiar de sensibilidade mecânica, inclusive naqueles animais que permaneceram normoglicêmicos. O tratamento com aloxana induziu alteração na sensibilidade mecânica apenas na quinta semana de tratamento. Administração intraplantar das duas drogas causou hiperalgesia e inflamação, evidenciada por edema de pata. A administração direta no gânglio da raiz dorsal (L5) promoveu hiperalgesia no tratamento com estreptozotocina, mas não com aloxana. Experimento *in vitro*, utilizando culturas primárias de gânglio da raiz dorsal, sugere um efeito direto apenas da estreptozotocina sobre os níveis intracelulares de cálcio em neurônios nociceptivos. Os resultados sugerem que ambas as drogas têm potencial semelhante na indução de diabetes, mas a estreptozotocina parece ter um efeito direto nos neurônios nociceptivos e este efeito pode dificultar estudos utilizando esta droga como indutor de diabetes em modelo de neuropatia diabética. Conclui-se que a aloxana parece ser uma melhor alternativa no estudo dessa complicação.

Palavras-chave: aloxana, diabetes experimental, estreptozotocina, gânglio da raiz dorsal, neuropatia diabética.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a disease with high worldwide prevalence. Animal models of experimental diabetes play a key role in elucidating the pathogenesis of diabetes in humans and its complications, including diabetic neuropathy. The most used drugs for the induction of experimental diabetes are streptozotocin and alloxan, with a higher prevalence of the first in studies in rodents. However, there is evidence that streptozotocin may alter the sensitivity of animals treated with this drug regardless of its glycemic condition. The aim of this study was to compare the effects of streptozotocin and alloxan as inducers of experimental diabetes for studies of the mechanisms involved in diabetic neuropathy in rats. Wistar rats were used to evaluate the systemic effects of the two drugs by evaluating the mechanical and thermal sensitivities of the animals for 5 weeks in animals treated with two doses of aloxane (30 or 15 mg/kg) and streptozotocin (35 or 17.5 mg/kg). Both drugs induced similar hyperglycemia in part of the animals, while the other part remained normoglycemic. No variations in thermal sensitivity were observed at any of the times and treatments tested. Treatment with streptozotocin induced evident alterations at the mechanical sensitivity threshold, including in those animals that remained normoglycemic. Aloxane treatment induced changes in mechanical sensitivity only in the fifth week of treatment. Intraplant administration of the two drugs caused hyperalgesia and inflammation, evidenced by paw edema. Direct administration at the dorsal root ganglion (L5) promoted hyperalgesia in animals treated with streptozotocin, but not with alloxan. In vitro experiments using dorsal root ganglia primary cultures suggested a direct effect only for streptozotocin on intracellular levels of calcium in nociceptive neurons. The results suggest that both drugs have similar potential in inducing diabetes, but streptozotocin appears to have a direct effect on nociceptive neurons and this effect may hinder studies using this drug as a diabetes inducer as model for diabetic neuropathy studies. We conclude that alloxan seems to be a better alternative in the study of this complication.

Key words: alloxan, experimental diabetes, streptozotocin, dorsal root ganglion, diabetic neuropathy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores glicêmicos, em mg/dL, de animais diabéticos e saudáveis	39
Tabela 2: Valores glicêmicos, em mg/dL, de animais tratados com doses menores de aloxana ou estreptozotocina.....	40
Tabela 3: Valores do limiar da sensibilidade mecânica (em gramas) de animais tratados com aloxana ou estreptozotocina.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da aloxana.	21
Figura 2: Mecanismo de ação da aloxana.	22
Figura 3: Estrutura molecular da estreptozotocina.....	23
Figura 4: Mecanismo de ação diabetogênico da estreptozotocina na célula beta pancreática.	24
Figura 5: Esquema geral da distribuição dos animais em grupos experimentais após tratamento com aloxana ou estreptozotocina para indução do diabetes.	29
Figura 6: Teste de Von Frey Eletrônico.	31
Figura 7: Teste de imersão da cauda.	31
Figura 8: Técnica de gavagem.	32
Figura 9: Injeção intraplantar..	33
Figura 10: Avaliação do edema de pata.	33
Figura 11: Injeção intraganglionar..	35
Figura 12: Avaliação do estado glicêmico dos animais após administração de aloxana ou estreptozotocina.....	39
Figura 13: Avaliação do estado glicêmico dos animais após administração de doses menores de aloxana ou estreptozotocina.....	40
Figura 14: Avaliação da massa corporal dos animais após administração sistêmica de drogas diabetogênicas (aloxana ou estreptozotocina).	41
Figura 15: Efeito da administração das drogas diabetogênicas aloxana ou estreptozotocina na sensibilidade mecânica.	42
Figura 16: Efeito da administração das drogas diabetogênicas aloxana ou estreptozotocina em doses menores na sensibilidade mecânica de animais normoglicêmicos.....	43
Figura 17: Efeito das drogas diabetogênicas aloxana ou estreptozotocina no limiar de sensibilidade térmica de animais.	44
Figura 18: Glicemia após Teste oral de tolerância a glicose em animais normoglicêmicos...46	
Figura 19: Efeito da injeção intraplantar de aloxana ou estreptozotocina na sensibilidade mecânica de animais.....	47
Figura 20: Efeito da administração intraplantar de aloxana ou estreptozotocina na variação de volume das patas de animais.	48
Figura 21: Efeito da injeção intraganglionar de aloxana ou estreptozotocina no limiar de sensibilidade mecânica dos animais.	49

Figura 22: Efeitos da aloxana e estreptozocina em resposta da capsaicina em cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal.	50
Figura 23: Efeito da aloxana e streptozotocina no influxo de cálcio em neurônios nociceptivos em cultura	51
Figura 24: Influxo de cálcio induzido por capsaicina em cultura de neurônios nociceptivos em cultura tratados com aloxana ou estreptozotocina.	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Associação Americana de Diabetes
ALX	Aloxana
ALX-HG	Aloxana- hiperglicêmico
ALX-NG	Aloxana- normoglicêmico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DiBAC ₄	Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol
DM	Diabetes melito
DM 1	Diabetes melito tipo 1
DM 2	Diabetes melito tipo 2
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecc
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
GLUT	Transportador de glicose
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
GSH	Glutathione
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina glicada
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico
i.pl.	Intraplantar
i.v.	Intravenosa
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IDF	Federação Internacional de Diabetes
MNU	N-metil-N-nitrosureia
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
ND	Neuropatia diabética
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Oxido nítrico
PBS	Tampão fosfato-salino

SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SP	Substância P
STZ	Estreptozotocina
STZ-HG	Estreptozotocina- hiperglicêmico
STZ-NG	Estreptozotocina- normoglicêmico
ToTG	Teste oral de tolerância a glicose
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPM8	Receptor de potencial transitório, da subfamília melastatina, membro oito
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transitório 1

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Fundamentação teórica	13
2.1. Sistema sensorial nociceptivo	13
2.1.1. Dor e nocicepção	13
2.1.2. Nociceptores	13
2.1.3. Vias ascendentes da dor	14
2.1.4. Dor neuropática.....	15
2.2. Diabetes melito	16
2.2.1. Definição e prevalência	16
2.2.2. Metabolismo da glicose nas células.....	16
2.2.3. Classificação	17
2.2.4. Diagnóstico	18
2.2.5. Complicações crônicas do diabetes melito	18
2.2.5.1. Neuropatia diabética	19
2.3. Diabetes experimental.....	20
2.3.1. Aloxana	21
2.3.2. Estreptozotocina	23
2.4. Estudos da neuropatia diabética utilizando aloxana e estreptozotocina como modelos de indução de diabetes	25
3.2. Objetivos.....	27
3.2.1. Objetivo Geral.....	27
3.2.2. Objetivos específicos	27
4. Materiais e Métodos.....	28
4.1. Animais	28
4.2. Drogas	28

4.3. Indução de Diabetes mellitus	28
4.4. Avaliação do peso corporal.....	29
4.5. Testes <i>in vivo</i>	30
4.5.2. Teste de pressão crescente: Von Frey eletrônico	30
4.5.1. Teste de imersão da cauda	31
4.5.5. Teste oral de tolerância à Glicose (ToTG).....	31
4.5.3. Avaliação dos efeitos hipernociceptivos e edematogênicos após a administração intraplantar de aloxana e estreptozotocina.....	32
4.5.4. Avaliação da sensibilidade mecânica após a administração intraganglionar de aloxana ou estreptozotocina	34
4.6. Testes <i>in vitro</i>	35
4.6.1. Cultura primária de células dos gânglios da raiz dorsal	35
4.6.2. Avaliação do influxo de cálcio (Ca ²⁺) nos neurônios sensoriais primários	36
4.7. Análise estatística	37
5. Resultados	38
5.1. Avaliação do estado glicêmico e peso corporal dos animais após tratamento com drogas diabetogênicas.....	38
5.2. Efeito do tratamento com aloxana ou estreptozotocina sobre a sensibilidade mecânica dos animais	42
5.3. Efeito dos tratamentos com as drogas diabetogênicas aloxana e estreptozotocina sobre a sensibilidade térmica.....	44
5.4. Avaliação indireta da função das células beta pancreáticas pelo teste oral de tolerância a glicose (ToTG).....	45
5.5. Efeito da injeção intraplantar de aloxana e estreptozotocina sobre a sensibilidade mecânica em pata de ratos	47
5.6. Efeito da injeção de intraplantar de aloxana e estreptozotocina sobre o volume da pata de ratos.....	48
5.7. Efeito da injeção intraganglionar de aloxana e estreptozotocina na sensibilidade mecânica dos animais	49

5.8. Efeito da aloxana e estreptozotocina sobre dinâmica de cálcio nos neurônios sensoriais primários em cultura	50
6. Discussão	53
7. Conclusão.....	60
Referências bibliográficas.....	61
Anexo 1- Certificado: Comissão de Ética na Utilização de Animais UFU	72

1. Introdução

Diabetes melito é uma doença crônica com alta prevalência no mundo todo. Esse distúrbio metabólico é causado pela deficiência na secreção de insulina pelo pâncreas e/ou quando a ação desse hormônio está prejudicada, gerando um aumento na concentração de glicose no sangue, fenômeno conhecido como hiperglicemia. Pacientes diabéticos estão sujeitos ao desenvolvimento de várias complicações, entre elas, a mais comum, neuropatia diabética, que pode afetar até 50% dos pacientes e é caracterizada por alterações nos nervos do sistema nervoso sensorial e/ou autonômico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD), 2017).

Modelos experimentais de diabetes são uma alternativa para as investigações acerca da doença. Atualmente, a estreptozotocina e a aloxana, são as substâncias mais utilizadas como métodos químicos para indução de diabetes em modelo animal. Ambos modelos também são utilizados para estudos das complicações provenientes do diabetes, incluindo a neuropatia diabética, que em roedores e humanos é caracterizada pela hiperalgesia térmica e mecânica precoce (COURTEIX et al., 1996; SUGIMOTO et al., 2000).

Pesquisas realizadas utilizando estreptozotocina como indutor de diabetes experimental sugerem que esta droga pode não ser adequada para a investigação dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética. Estes estudos mostram que a estreptozotocina afeta o grau de sensibilidade térmica e mecânica em ratos hiperglicêmicos e normoglicêmicos, sugerindo que a droga pode apresentar um efeito direto, independente do estado glicêmico do animal (ROMANOVSKY, 2004; BISHNOI et al., 2011; CUNHA et al., 2009).

Apesar dos possíveis problemas com o uso de estreptozotocina, não há muitos estudos na literatura que reportem o uso da aloxana nos mecanismos da neuropatia diabética. Resultados de um recente trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, sugere que essa droga parece ser uma melhor alternativa para os estudos envolvendo a neuropatia diabética, uma vez que eles mostraram que o aumento de sensibilidade mecânica apresentado por ratos em modelo de diabetes induzida por aloxana é dependente da hiperglicemia e, portanto, parecem refletir o desenvolvimento de neuropatia diabética.

Tendo em vista a alta incidência de neuropatia em paciências diabéticos, o estabelecimento de um modelo animal de dor neuropática diabética é de grande valia para permitir um estudo aprofundado de sua patogênese, tratamento e prevenção. O objetivo geral deste trabalho é determinar qual agente diabetogênico, estreptozotocina ou aloxana, é mais adequado para o estudo dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética. Para tanto, foram comparados os efeitos da administração de estreptozotocina com os da administração de

aloxana sobre as sensibilidades mecânica e térmica de ratos e sobre a dinâmica intracelular de cálcio em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal.

2. Fundamentação teórica

2.1. Sistema sensorial nociceptivo

2.1.1. Dor e nocicepção

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define o termo dor, como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos de tal dano”. A experiência sensorial se refere ao componente fisiológico da dor, que é a nocicepção. A nocicepção é um processo que consiste na transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo, sem levar em consideração o componente emocional (LINLEY et al., 2010).

Uma vez que a dor não está relacionada apenas com a transdução do estímulo nocivo, podemos dizer que trata-se também de uma experiência subjetiva, pois cada indivíduo pode experimentá-la de forma diferente, levando em consideração suas experiências cognitivas e emocionais (JULIUS e BASBAUM, 2001). Em animais, devido às dificuldades em mensurar a percepção da dor, é preferível a utilização dos termos nocicepção, para a sensação induzida pela ativação das vias nociceptivas e hipernocicepção para a diminuição no limiar de ativação destes neurônios, associado aos fenômenos de hiperalgesia e alodinia (MILLAN, 1999).

2.1.2. Nociceptores

Os nociceptores são neurônios sensoriais que possuem terminações nervosas livres em diferentes tecidos como a pele, músculos, articulações, vasos, ossos e vísceras. São responsáveis pela detecção e transmissão dos estímulos dolorosos até a medula espinhal (LOESER e TREEDE, 2008).

Os nociceptores podem ser classificados em dois tipos de acordo com o diâmetro, mielinização e velocidade de condução das fibras, sendo eles neurônios de fibras A-delta ($A\delta$) e neurônios de fibras C. As fibras $A\delta$, tem maior diâmetro e são finamente mielinizadas e, por isso, possuem uma condução mais rápida do impulso, de aproximadamente 5 a 30 m/s. Estes neurônios são responsáveis pela dor aguda imediata e bem localizada. As fibras C, possuem um menor diâmetro e não são mielinizadas. A velocidade de condução quase sempre é menor do que 2 m/s, ou seja, apresentam velocidade de condução lenta, e possuem os limiares de ativação mais altos. São responsáveis por transmitir a dor lenta e mal localizada e geralmente estão envolvidas na hiperalgesia inflamatória (OLIVEIRA, 2008).

Quanto à funcionalidade, as fibras A δ respondem à estimulação mecânica, e também podem ser sensibilizadas pelo calor, desse modo, elas são divididas em A δ tipo I e tipo II. As fibras do tipo I respondem ao calor intenso (maior que 50 °C) e as do tipo II a estímulo térmico moderado (aproximadamente 45 °C) (OLIVEIRA, 2008; BASBAUM et. al., 2009). As fibras do tipo C respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, por isso, são conhecidas como nociceptores polimodais (OLIVEIRA, 2008).

Nas membranas dos nociceptores são encontrados receptores e canais que participam no processo de transdução das diferentes modalidades de estímulos nocivos (OLIVEIRA, 2008). Um exemplo é a família dos canais catiônicos do receptor de potencial transitório (TRP) que possuem mais de 30 membros responsáveis pela detecção de estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos (RAMSEY et al., 2006). Entre os receptores TRP, os receptores vanilóide TRPV1 (receptor de potencial transitório, subfamília vanilóide, membro 1) têm sido bastante estudados, sendo encontrados principalmente em fibras C e ativados pela capsaicina (princípio ativo das pimentas ardentes) e por temperaturas moderadas (aproximadamente 45° C). Quando ativado, esse receptor abre um canal permeável a sódio e cálcio, gerando potenciais de ação nas fibras nociceptivas (PURVES et al., 2010).

Existem ainda outros subtipos de canais TRP sensíveis a temperatura. Por exemplo, o canal TRPM8 (receptor de potencial transitório, da subfamília melastatina, membro oito), ativado por estímulo térmico a frio (< 26°C) e o canal TRPA1 (receptor de potencial transitório com domínios de anquirina), ativado por temperaturas abaixo de 17°C (DAVIS & POPE, 2002).

Os corpos celulares dos nociceptores estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD) ou no gânglio trigeminal. Os gânglios da raiz dorsal se localizam próximos à coluna vertebral e estão distribuídos lateralmente ao longo da medula espinhal, mas não fazem parte do sistema nervoso central. Esses neurônios são pseudounipolares, ou seja, possuem um único axônio que se bifurca em forma de T. Uma parte do axônio se dirige para a periferia, constituindo as fibras sensoriais, e a outra parte do prolongamento se dirige ao corno dorsal da medula espinhal, onde realiza sinapses com os neurônios de segunda ordem (PURVES et al., 2010).

2.1.3. Vias ascendentes da dor

Os nociceptores, através de seus prolongamentos, chegam de forma organizada em uma região da medula espinhal, conhecida como corno dorsal da medula espinhal (PURVES et al, 2010). Essa região atua como uma estação para a transmissão dolorosa, onde os neurônios aferentes primários realizam sinapses excitatórias com neurônios de transmissão ou de segunda

ordem (OLIVEIRA, 2008). O corno dorsal da medula espinhal é estruturado em seis lâminas anatomicamente e fisiologicamente distintas. Os nociceptores A δ fazem sinapses com neurônios de segunda ordem nas lâminas I e V enquanto que as fibras C projetam-se para as lâminas I e II (BASBAUM et. al., 2009).

O principal neurotransmissor liberado na medula nas sinapses entre os neurônios nociceptivos primários e os neurônios do corno dorsal da medula espinhal é o glutamato. Porém, existem outros neurotransmissores envolvidos nesse processo, como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), característicos de fibras C denominadas peptidérgicas (MILLAN, 1999).

Após entrada na medula espinhal, as informações sensoriais, são direcionadas até o tronco encefálico e ao tálamo no quadrante anterolateral, através de uma via conhecida como sistema anterolateral (PURVES et al., 2010; MILLAN, 1999). O tálamo tem como função nesse sistema a recepção, integração e transferência das informações sensoriais. As informações de dor são enviadas ao córtex via projeções talâmicas provenientes de núcleos talâmicos laterais e mediais. Os núcleos talâmicos laterais estão relacionados ao aspecto sensorial- discriminativo da dor e os núcleos mediais ao componente afetivo emocional, uma vez que se projetam para várias estruturas corticais, estruturas do sistema límbico, córtex insular e córtex do cíngulo anterior (OLIVEIRA, 2008).

Dessa forma, a dor é resultado da interação entre o processo sensorial nociceptivo, que são interpretados no córtex somatossensorial e o contexto individual (aspectos cognitivos, emocionais, motivacionais), que são interpretados em outras áreas como amígdala, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, colículo superior, formação reticular e núcleos talâmicos da linha média (PURVES et al., 2010; WENG et al., 2000).

2.1.4. Dor neuropática

Em linhas gerais, a dor pode ser classificada em nociceptiva ou patológica. A dor nociceptiva se refere à dor causada por uma estimulação intensa nos nociceptores (GUYTON; HALL, 2011). Já a dor patológica geralmente está associada a inflamação do tecido periférico (dor inflamatória) ou a lesões do sistema nervoso (dor neuropática) e pode ser dividida em dois eventos: hiperalgesia e dor espontânea (OLIVEIRA, 2008).

A dor neuropática é definida pela IASP como “dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso”, sendo caracterizada por alterações na percepção sensorial a diferentes estímulos, manifestando-se como dor espontânea, hiperalgesia e/ou alodínia (PISERA, 2005; SCHAIBLE, 2006). A dor espontânea refere-se a dor na ausência de

qualquer estímulo, enquanto a hiperalgesia trata-se de uma resposta aumentada a um estímulo que normalmente já é doloroso e alodínia refere-se à percepção dolorosa induzida por um estímulo que, em condições normais não causariam dor (FEIN, 2011). Aproximadamente 30% dos indivíduos que possuem neuropatia diabética, desenvolvem a dor neuropática (TESFAYE e SELVARAJAH, 2012).

2.2. Diabetes melito

2.2.1. Definição e prevalência

O Diabetes melito (DM) é uma doença metabólica crônica causada pela deficiência na secreção e/ou ação da insulina, implicando mecanismos nocivos típicos como a destruição das células beta pancreáticas, defeitos na síntese de insulina, distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O DM é uma patologia decorrente da interação entre fatores ambientais e da predisposição genética do indivíduo (SALGADO, 2007).

De acordo com a Federação Internacional do Diabetes - IDF (2017) atualmente estima-se que a população mundial com diabetes seja de aproximadamente de 425 milhões de indivíduos e que em 2040 esse número alcance 629 milhões de pessoas. No Brasil, no ano de 2017, foram contabilizados mais de 12,5 milhões de casos em pessoas com a faixa etária entre 20 e 79 anos. Estima-se que esse número possa ultrapassar 20 milhões em 2045.

A alta incidência e prevalência dessa doença são consequências de alguns fatores como: o crescimento e envelhecimento populacional, mudança no estilo de vida das pessoas, caracterizado pela inatividade física (sedentarismo) e hábitos alimentares que predisõem ao acúmulo de gordura corporal (obesidade) (IDF, 2013).

2.2.2. Metabolismo da glicose nas células

A fisiopatologia do DM está relacionada com a liberação da insulina pelo pâncreas e/ou com a diminuição da ação desse hormônio em órgãos-alvo. A insulina é um hormônio produzido e secretado pelas células beta pancreáticas das ilhotas de Langerhans. É responsável pela regulação do metabolismo da glicose e seus receptores estão presentes em diversos tecidos (SAMUEL; SHULMAN, 2012; BRAZ, 2015).

A glicose é o principal estímulo para a liberação de insulina, ela atravessa a membrana das células através de transportadores de glicose. Os transportadores de glicose de membrana

específicos são denominados GLUTs (classificados de 1 a 14). Os GLUTs são proteínas expressas em tecidos e células específicas e são importantes na captação de glicose (MUECKLER E THORENS, 2013). Os transportadores GLUT-1 e GLUT-3 são considerados responsáveis pelo transporte de glicose ao cérebro, sendo o GLUT-1 responsável pelo transporte de glicose por meio da barreira hematoencefálica para o cérebro e para os astrócitos (LEYBAERT et al., 2007) e GLUT-3 responsável pelo transporte de glicose em neurônios (SIMPSON et al., 2007). Estudos mostram que ambos estão expressos de forma abundante em astrócitos e neurônios, respectivamente (MAHER et al., 1994).

A glicose adentra as células beta pancreática através do transportador de glicose GLUT-2. Em seu interior, a glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato (G-6-P) por uma enzima chamada glicoquinase (BRUNTON et al., 2012). O principal destino da G-6-P é a glicólise, que gera o aumento de ATP/ADP levando ao fechamento de canais de potássio sensíveis ao ATP, resultando na despolarização da membrana plasmática da célula beta pancreática. A depolarização promove a abertura de canais de cálcio sensíveis a voltagem, levando ao influxo de íons de cálcio e consequentemente a exocitose da insulina, localizada dentro de vesículas celulares (BRUNTON et al., 2012; FU et al., 2013; RUTTER et al., 2015).

2.2.3. Classificação

O Diabetes pode ser classificado em dois principais tipos: DM tipo 1 (DM1) e DM tipo 2 (DM2), sendo estes os mais prevalentes. Ainda existem outros tipos de DM, como DM gestacional, Diabetes monogênico, resultado de uma mutação genética e o Diabetes secundário, que surge como complicação de outras doenças, como distúrbios hormonais (por exemplo, doença de Cushing ou acromegalia) ou doenças do pâncreas.

O DM1 representa aproximadamente 10% de todos os casos de diabetes, é caracterizado pela deficiência na produção de insulina, devido a um processo autoimune mediado por células T que atacam as células beta pancreáticas (ADA, 2012; ROTHER, 2007). O tratamento consiste em controle alimentar e reposição de insulina, que é deficiente devido ao comprometimento das células beta (ADA, 2017). Os principais sintomas incluem sede excessiva (polidipsia), micção frequente (poliúria), falta de energia, cansaço extremo, fome constante, perda repentina de peso, alterações na visão e feridas que não cicatrizam (OMS, 2013). Geralmente, o DM1 desenvolve-se em crianças e jovens e se subdivide em dois outros tipos: DM1A, causada pela deficiência de insulina devido a destruição autoimune das células beta pancreáticas confirmada por exames laboratoriais e DM1B, causada pela deficiência de insulina onde não são detectados autoanticorpos, sendo esta, considerada de natureza idiopática (SBD, 2017).

O DM 2 é o tipo mais comum de diabetes, correspondendo a 90% dos casos (CEFALU, 2006) e resulta de uma deficiência na produção de insulina, combinada a resistência do receptor desse hormônio nas células- alvo, como as de tecido muscular, adiposo e hepático, onde a atuação deste hormônio fica comprometida. Dessa forma, a captação de glicose é reduzida e a gliconeogênese continua desregulada, ocasionando o aumento da glicemia. Nesse tipo de diabetes, a resistência dos tecidos periféricos a ação da insulina está altamente relacionada 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). Existe também a contribuição de outros fatores como o sedentarismo, má nutrição, etnicidade, histórico familiar e idade avançada (OMS, 2013).

Os portadores de DM2 não dependem da injeção de insulina para sobreviver, sendo a melhor forma de tratamento a adaptação a uma dieta saudável e o aumento de atividade física. Também existem medicamentos orais que contribuem para manter os níveis adequados de glicose no sangue, porém, se os níveis de glicose no sangue não forem controlados, pode ser necessário o tratamento com injeção de insulina. Ao longo do tempo, esse tipo de diabetes era considerado característico de pessoas com idade mais avançada, porém, nos últimos anos esse tipo da doença também vem acometendo jovens e crianças, uma vez que essa patologia está ligada aos maus hábitos alimentares e sedentarismo (SBD, 2017).

2.2.4. Diagnóstico

O DM é diagnosticado devido ao aparecimento de sintomas clássicos, como a perda de peso, sede excessiva e aumento do volume urinário, combinados com alterações na glicemia. Atualmente, é considerado diabético o indivíduo que apresenta níveis de glicose em jejum de 8h maior ou igual a 126 mg/ dL, ou quando os níveis de glicose sanguínea permanecerem maior ou iguais a 200 mg/dL duas horas após um teste oral por ingestão de 75g de glicose. Além disso, o DM também pode ser diagnosticado através da dosagem da hemoglobina glicada A1C, sendo considerado diabético se o valor for igual ou maior que 6,5% (ADA, 2015).

2.2.5. Complicações crônicas do diabetes melito

O DM é considerado um problema de saúde pública mundial uma vez que tem colaborado para o aumento da taxa de mortalidade, devido ao elevado risco de desenvolvimento de complicações (PATRÍCIO et al., 2015). Estas complicações são provenientes principalmente da hiperglicemia crônica que acarreta alterações fisiológicas e metabólicas (FERREIRA et al., 2011), mas também podem decorrer de outros processos patogênicos relacionados à gênese do

diabetes, que causam mudanças estruturais, falhas funcionais e/ou falência de vários órgãos como olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos (IDF, 2015).

2.2.5.1. Neuropatia diabética

A neuropatia diabética (ND) é uma das complicações crônicas mais comuns entre indivíduos diabéticos, atingindo em torno de 30% a 50% dos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; FELDMAN et al., 2017). Segundo as diretrizes do Ministério da Saúde (2006), a ND “abrange um conjunto de síndromes clínicas que afetam o sistema nervoso periférico sensorial e/ou 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”.

A patogênese da ND é uma condição multifatorial, ou seja, vários são os fatores que podem ocasionar o desenvolvimento dessa patogênese, incluindo a insuficiência microvascular, o estresse oxidativo, o estresse nitrosativo, o neurotropismo deficiente, a destruição dos nervos mediada por processos autoimunes e principalmente hiperglicemia persistente (SAID, 2007; VINCENT et al., 2004; SCHREIBER et al., 2015).

A elevada taxa de glicemia sanguínea do DM, é capaz de causar um aumento da concentração de glicose, sorbitol e frutose no nervo periférico, que por sua vez, afeta o equilíbrio osmótico nos nervos, reduz a produção de acetilcolina, e é capaz de levar a decomposição das células de Schwann e da bainha de mielina, além de proporcionar o acúmulo de ROS por causa da baixa disponibilidade de NADPH (que age em sistemas enzimáticos antioxidantes) (KUZUMOTO et al., 2006). Todos esses fatores são capazes de causar modificações na velocidade de condução (PICKUP & WILLIAMS, 1991).

O mecanismo do sorbitol sendo convertido em frutose e a oxidação desse elemento também produzem um composto reativo que pode gerar a formação de AGEs (produtos de glicação avançada) por meio de reações não enzimáticas, levando a uma série de falhas na função da célula, incluindo danos nos processos de transcrição e sinalização celular (BARBOSA et al., 2009). Além disso, os AGEs podem se ligar a receptores específicos, e iniciar uma série de eventos que causam lesões ao sistema nervoso, resultando no desenvolvimento da ND (CAMERON et al., 2001).

Como já mencionado, a ND tem como principais sintomas o aumento ou diminuição da sensibilidade (POP-BUSUI et al., 2017). Os mecanismos envolvidos nesses processos não são totalmente compreendidos, mas estudos indicam que alterações na expressão ou função e canais iônicos podem produzir as variações de sensibilidades vistas nas desordens neuropáticas (LIU

e WOOD, 2011; ZULIANI et al., 2010). Outros estudos sugerem que a ausência de sensações pode ocorrer devido à desmielinização e degeneração axonal (DOBRETISOV et al., 2007).

Atualmente, o tratamento da neuropática diabética é feita com antidepressivos, antiepiléticos tricíclicos e analgésicos opióides (ANDERSSON et al., 2015). Porém, mesmo utilizando esses medicamentos, estudos mostram que apenas um terço dos pacientes obtém alívio da dor superior a 50% (JAVED et al., 2015). A falta de eficácia dos medicamentos pode ser devido a complexa fisiopatologia do DM e, por isso, é importante elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo para que sejam possíveis novas intervenções clínicas.

De acordo com pesquisas realizadas nos últimos 30 anos, a única maneira de alterar o desenvolvimento da neuropatia diabética é o controle glicêmico, este, se for feito de uma forma rígida, está associado com uma redução de 40 a 60% no desenvolvimento e/ou progressão da neuropatia (BRIAN et al., 2012; TESFAYE et al., 2013). Porém, há controversas visto que existem trabalhos que indicam que a hiperglicemia não é a única responsável pelo desenvolvimento da neuropatia, uma vez que a mesma nem sempre é prevenida por um controle rigoroso dos níveis séricos de glicose (CALCUTT et al., 1996; BERTELSMANN et al., 1987; LEE & McCARTY, 1990; CUNHA et al, 2009).

2.3. Diabetes experimental

A utilização de modelos animais é uma ferramenta de grande importância para a compreensão da fisiopatologia de doenças. Para estudo do diabetes apresentam-se como uma ferramenta fundamental para a melhor compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento da doença, assim como de suas complicações, incluindo a neuropatia diabética.

De acordo com a literatura, o diabetes experimental pode ser induzido em animais por vários mecanismos dentre eles: remoção do pâncreas total ou parcial (pancreatectomia), lesão no sistema nervoso central, dietas ricas em açúcares, má nutrição *in útero* ou altas doses de hormônios contra- regulatórios como os glicocorticoides (DELFINO et al., 2002). Entretanto, o método mais utilizado é a indução de diabetes por meio de substâncias químicas citotóxicas, como a estreptozotocina e a aloxana (RADENKOVIĆ et al., 2016).

Ainda, segundo Radenkovic (2016), tanto a estreptozotocina, quanto a aloxana podem ser usadas para indução do DM 1 e DM 2. Geralmente são mais usadas para induzir o DM1 por não serem capazes de induzir diretamente uma resistência à insulina. Os mecanismos de ação

dessas drogas são semelhantes nas células beta pancreáticas, todavia seu potencial diabetogênico é conseguido através da ativação de vias citotóxicas diferentes.

2.3.1. Aloxana

A aloxana (5,6-dioxiuracil; 2,4,5,6-tetraoxipirimidina) é uma substância química muito utilizada na indução experimental do DM 1 (SALEH et al., 2017; BORGOHAIN et al., 2017; NAHID et al., 2017), proveniente da pirimidina e sintetizada pela oxidação do ácido úrico.

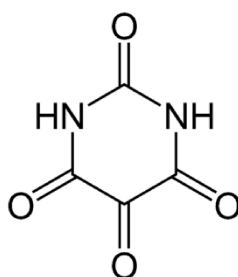


Figura 1: Estrutura molecular da aloxana. Fonte: LENZEN, 2008.

A aloxana tem propriedade hidrofílica que impede que ela atravesse facilmente a bicamada lipídica da membrana plasmática, todavia devido a sua semelhança estrutural com a glicose (Figura 1) o seu acesso nas células betas pancreáticas se dá através de transportadores GLUT-2, permitindo que sua absorção seja seletiva e que ocorra o acúmulo da droga nesse local (LENZEN, 2008). Visto que a glicose e a aloxana são capazes de adentrar na célula beta do mesmo modo, é evidente que a glicose pode influenciar na competitivamente pela absorção de aloxana por células beta, sendo assim, a glicose é capaz de proteger as células beta da toxicidade induzida pela droga (SZKUDELSKI, 2001), por isso, a importância de pelo menos 12 horas de jejum antes da administração da droga (RADENKOVIĆ et al., 2013).

Após a entrada nas células beta, a aloxana causa seu efeito diabetogênico por meio de dois mecanismos independentes: a inibição da glicoquinase e a geração de ciclo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Resumidamente, a produção de insulina, induzida pela glicose, é inibida pela aloxana de forma seletiva, provocando uma condição de DM 1 (NEGRI, 2005). A formação de ROS induz morte por necrose das células beta pancreáticas (Figura 2).

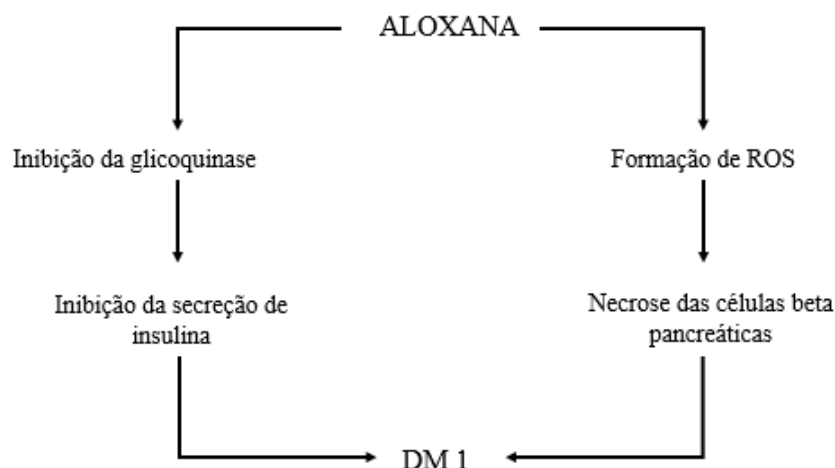


Figura 2: Mecanismo de ação da aloxana. Fonte: Modificado de Al-Awar et al., 2016.

A aloxana possui em sua composição um grupo 5-carbonilo central, esse grupo possui uma grande afinidade por compostos celulares contendo sulfidril (SH) - grupo funcional tiol. A glicoquinase é uma isoenzima da família das hexoquinases, presente nas células beta, cuja função é catalisar a fosforilação de glicose, reconhecendo a glicose e controlando assim a secreção de insulina (IYNEDJIAN, 2009). A glicoquinase possui em sua composição grupos sulfidril, que por sua vez, são muito vulneráveis a ação da aloxana (LENZEN, 1998; SZKUDELSKI, 2001). Desse modo, ao entrar em contato com a glicoquinase, a aloxana reage com dois grupos -SH no lado de ligação do açúcar da enzima, resultando na formação da ligação dissulfeto e, conseqüentemente, na inativação da enzima, reduzindo a oxidação da glicose e a geração de ATP, suprimindo, dessa forma, o sinal de ATP que desencadeia a secreção de insulina. Desempenhando assim, um papel importante no processo de indução do DM 1.

Na presença de diferentes agentes redutores, como os tióis ligados a proteínas, cisteína, ascorbato e principalmente glutathiona (GSH), a aloxana produz espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir de um ciclo redox, que acontece nas células beta. A partir da formação desses radicais livres, ocorre aumento maciço simultâneo na concentração de cálcio citosólico que provoca uma rápida destruição de células beta (COHEN, 1974; OBERLEY, 1988).

Nessa reação cíclica, a aloxana é reduzida a ácido dialúrico, e o ácido dialúrico é re-oxidado novamente para aloxana, gerando radicais superóxido (MUNDAY, 1988). Quando a aloxana é reduzida em ácido dialúrico, por meio de radicais de aloxana como produtos intermediários, é necessário um tiol adequado como agente redutor, geralmente esse tiol é a glutathiona (GSH).

O ácido dialúrico se autooxida na presença de O_2 , formando radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ainda nesse processo, na presença de um catalisador metálico específico (normalmente o ferro), ocorre formação de radicais hidroxila (OH), através da reação de Fenton. Durante todo o ciclo, a autooxidação do ácido dialúrico propicia a formação de radicais de aloxana, que novamente serão transformados em aloxana (LENZEN, 2008).

As espécies reativas podem causar lesões ao DNA e também danificar o funcionamento do seu mecanismo de reparo, podendo levar à morte da célula (SOSA et al., 2013). Esses radicais induzem fragmentações simples e duplas nas cadeias de DNA, danos que estimulam a ativação da enzima poli-ADP-ribose, a qual participa do processo de reparo do DNA. O processo de ativação dessa enzima resulta em uma significativa depleção do conteúdo intracelular de NAD^+ , que é consumido no processo de síntese de poli-ADP-ribose, afetando severamente as funções celulares, como a produção de ATP, síntese de proteínas, levando a célula à morte (SZKUDELSKI, 2001).

2.3.2. Estreptozotocina

A estreptozotocina é um agente antimicrobiano produzido pela cepa *Streptomyces achromogenes*. Quanto à estrutura química, essa droga possui um grupo N-metil-N-nitrosureia (MNU) associado ao carbono 2 de uma hexose, sendo seletiva e tóxica para as células beta pancreáticas (LENZEN, 2008; ELEAZU et al., 2013; SARGIS, 2014; ISLAM et al., 2017) (Figura 3).

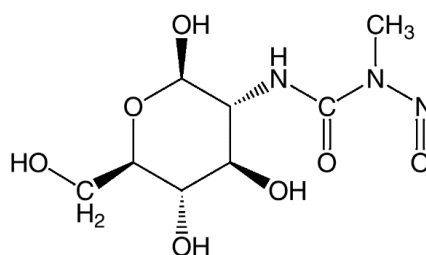


Figura 3: Estrutura molecular da estreptozotocina. Fonte: LENZEN, 2008.

A estreptozotocina possui propriedades químicas semelhantes à aloxana, visto que ambos compostos são hidrofílicos e podem ser classificados como análogos de glicose tóxicos para células beta (SZKUDELSKI et al., 2001). Assim como a aloxana, a sua entrada nas células beta também ocorre por meio do transportador GLUT-2.

A ação diabetogênica da estreptozotocina acontece devido aos seguintes mecanismos: alquilação do DNA (desempenha um papel central), liberação de óxido nítrico a partir do grupo nitrosureia de sua porção MNU e, geração de ROS, levando necrose das células beta pancreáticas. Além disso, a glicosilação e alquilação de proteínas são fatores que complementam a ação tóxica da droga (LENZEN, 2008; ISLAM et al., 2017) (Figura 4).

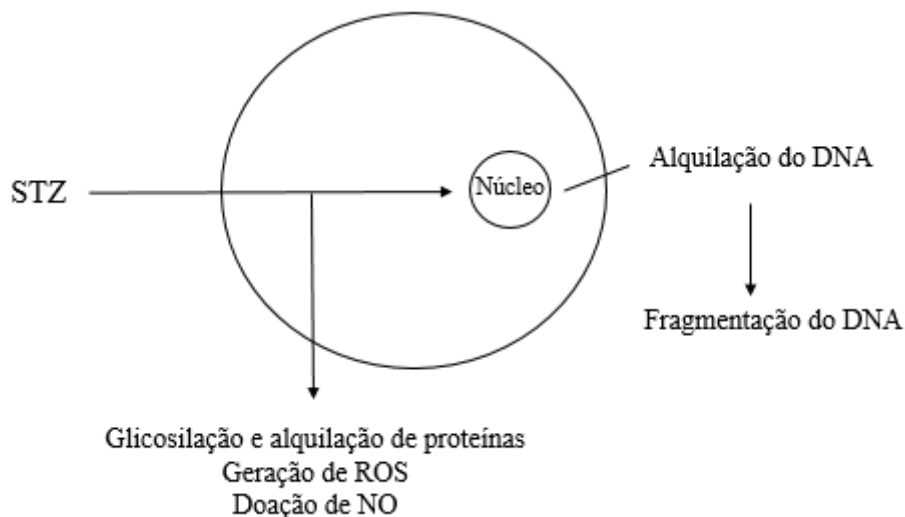


Figura 4: Mecanismo de ação diabetogênico da estreptozotocina na célula beta pancreática. Fonte: modificado de Al-Awar, 2016.

A atividade alquilante da estreptozotocina é o mecanismo mais importante para a necrose das células beta pancreáticas, uma vez que os efeitos tóxicos dessa droga podem prejudicar os processos vitais que ocorrem no DNA (BORDIN et al., 2013; PUYO et al., 2014; KR et al., 2014). A alquilação da MNU da guanina, especialmente na posição 06 é a principal causa da morte das células beta pancreáticas (ELSNER et al., 2000).

Inicialmente, um grupo metila da estreptozotocina é transferido para a molécula de DNA da célula beta, desencadeando uma série de eventos, que por fim acarretará na fragmentação e destruição do DNA. Numa tentativa de reparação a lesão do DNA, a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP-1) é superestimulada, reduzindo a quantidade de NAD^+ e ATP. Dessa forma, a depleção das reservas de energia celular e a redução de ATP resulta na necrose das células beta pancreáticas e na inibição da síntese e secreção de insulina (LENZEN, 2008).

Além disso, foi visto que a estreptozotocina é capaz de transferir grupo metil também a proteínas, sendo esse provavelmente um mecanismo que contribui para a destruição das células beta (SZKUDELSKI et al., 2001). Outros fatores prejudiciais adicionais é a glicosilação dessas proteínas, sendo estes eventos que amplificam o efeito citotóxico da estreptozotocina e a liberação do óxido nítrico (NO) dentro das células beta pancreáticas a partir da metabolização

da estreptozotocina. Esse evento também contribui danificando as bases que compõe o DNA (SZKUDELSKI et al., 2001).

A formação de ROS, principalmente de radicais superóxido e hidroxila, é resultado da ação da estreptozotocina em mitocôndrias e consequência do aumento da atividade da xantina oxidase, uma enzima cuja função é catalisar a oxidação de hipoxantina para xantina. Foi visto, que a estreptozotocina inibe o ciclo de Krebs (TURK et al., 1993), diminuindo drasticamente o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias. Esse processo limita a produção de ATP pelas mitocôndrias, causando a depleção desse nucleotídeo nas células beta, acelerando o processo de destruição dessas células e o desenvolvimento do DM 1 (NUKATSUKA et al., 1990, SOFUE et al., 1991).

2.4. Estudos da neuropatia diabética utilizando aloxana e estreptozotocina como modelos de indução de diabetes

O modelo de diabetes induzido pela administração sistêmica de estreptozotocina tem sido amplamente utilizado em estudos dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da ND, uma vez que os animais tratados podem desenvolver hiperalgesia térmica, mecânica (BISHNOI et al., 2011; CHRISTOPH et al., 2010; CUNHA et al., 2009; PABREJA et al., 2011; TALIYAN; SHARMA, 2012; IKEDA et al., 2009) e química (HASANEIN, 2011; PABREJA et al., 2011).

Em estudos que avaliam a sensibilidade associada ao diabetes, o ideal é que o desenvolvimento da hiperalgesia seja causado exclusivamente pela hiperglicemia advinda do desenvolvimento da diabetes induzida pela droga. Entretanto, alguns estudos indicam que sensibilidade associada ao diabetes induzida por estreptozotocina em ratos não está sempre associada com hiperglicemia. Romanovsky (2004) verificou que o uso de estreptozotocina (50 mg/kg) por via intraperitoneal, induziu hiperglicemia somente em 40% dos ratos, enquanto, 100% dos animais tratados desenvolveram hiperalgesia mecânica (ROMANOVSKY, 2004). Corroborando com esses dados, Bishnoi et al. (2011) verificou hiperalgesia mecânica (nas semanas 4 e 5) e térmica (na primeira a quinta semana) na pata dos animais após o tratamento com estreptozotocina (BISHNOI et al., 2011). Essas alterações aconteceram de forma independente do estado glicêmico do animal e foram relacionadas ao aumento da expressão do TRPV1 e dos níveis de mediadores inflamatórios no cordão espinhal.

Além destes, Cunha e colaboradores (2009) avaliaram 3 diferentes doses de estreptozotocina (10, 20 e 40 mg/kg) e verificou que apenas a maior dose foi capaz de induzir

um aumento significativo nos níveis glicêmicos dos animais, entretanto, todos os animais tratados com estreptozotocina (hiperglicêmicos ou não) desenvolveram hiperalgesia mecânica. A hiperalgesia foi diminuída ao ser tratada com morfina de forma sistêmica, mas com o tratamento de insulina não, sugerindo que esta condição não é exclusivamente dependente da hiperglicemia. Nesse mesmo estudo, a hipernocicepção mecânica foi iniciada no dia 19, atingiu um pico em dia 23 e foi mantida até ao dia 36 quando o estudo foi finalizado (CUNHA et al., 2009). Estes estudos sugerem que o modelo de diabetes induzido por estreptozotocina pode não ser ideal para o estudo dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética.

Apesar dos possíveis problemas com o uso de estreptozotocina no estudo da neuropatia diabética e mesmo sabendo que a aloxana também possui a capacidade de espelhar o desenvolvimento de sintomas do diabetes de forma semelhante a humanos (CAVALLI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007) na literatura há poucos estudos utilizando a aloxana como modelo para estudo de tal complicação.

A primeira vez que a neuropatia periférica em ratos diabéticos utilizando aloxana foi relatada por Preston (1967) e Lovelace (1968). Depois disso, vários cientistas relataram a neuropatia diabética principalmente em modelos diabéticos induzidos por aloxana (ISLAM, 1960). Porém a maioria desses achados estudam outros aspectos da neuropatia diabética, como a morfologia do nervo (ALBERTI, 2007; MACHADO, 2000).

ZHANG e colaboradores (2015), verificaram que a administração de aloxana (75 mg/kg) através da via intraperitoneal foi capaz de alterar os níveis glicêmicos dos animais após 48h da administração da droga e mostraram que o diabetes induzido por aloxana reduz o limiar de dor. Através do teste de Hargreaves e do Teste de Von Frey filamentosos, foi confirmado o desenvolvimento da hiperalgesia térmica e alodinia mecânica, respectivamente, em relação ao grupo controle (ZHANG et al, 2015). De forma semelhante, Raafat e colaboradores (2016), utilizaram 180 mg/kg de aloxana intraperitoneal em camundongos e confirmaram perda da sensibilidade sensorial em 90% dos animais através do teste de Von Frey filamentosos e teste de latência de cauda após 6 semanas da indução do diabetes.

Visto isso e, sabendo da grande incidência de neuropatia em paciências diabéticas, é importante estabelecer um modelo animal de dor neuropática diabética para permitir um estudo aprofundado de sua fisiopatologia.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo Geral

Comparar os efeitos da estreptozotocina e aloxana como indutores de diabetes experimental para estudos dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética em ratos.

3.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar se as alterações da sensibilidade mecânica nas patas dos animais é dependente do estado glicêmico em animais tratados com estreptozotocina ou aloxana;
- Avaliar se as alterações da sensibilidade térmica dos animais é dependente do estado glicêmico em animais tratados com estreptozotocina ou aloxana;
- Avaliar indiretamente a função das células beta pancreáticas nos animais normoglicêmicos tratados com aloxana e estreptozotocina;
- Avaliar se aloxana e estreptozotocina possuem efeito direto sobre a sensibilidade mecânica após administração local das drogas via injeção intraplantar;
- Avaliar se a injeção intraplantar de aloxana e estreptozocina altera o volume da pata dos animais, indicando um efeito inflamatório;
- Avaliar se aloxana e estreptozotocina afetam diretamente os neurônios nociceptivos através da avaliação da sensibilidade mecânica após administração das drogas diretamente no gânglio da raiz dorsal (nível L5);
- Avaliar se a aloxana e estreptozotocina afetam diretamente os neurônios nociceptivos através da avaliação da dinâmica de $[Ca^{2+}]_i$ em cultura primárias de gânglios da raiz dorsal de ratos.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas (80-100 g) para obtenção de culturas primárias, e machos (250-350 g) para testes comportamentais. Os animais foram obtidos do biotério da Universidade Federal de Uberlândia e mantidos, até o momento da realização dos experimentos, no depósito de animais da Área de Ciências Fisiológicas (ARFIS), na mesma instituição. Os animais foram mantidos em sala com temperatura e ciclo de luminosidade controlada e acesso à água e ração à vontade. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (ZIMMERMANN, 1983) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo nº 087/17 – Anexo 1).

4.2. Drogas

- Aloxana (*Alloxan monohydrate*, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA);
- Estreptozotocina (*Streptozotocin*, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA);
- Glicose (Êxodo);
- Capsaicina (Sigma);
- Fluo 3/AM (Invitrogen Molecular Probes®);

Para os experimentos *in vivo* as drogas foram diluídas diretamente em solução salina 0,9%, o veículo, exceto, no Teste oral de tolerância a glicose. Para os experimentos *in vitro*, a capsaicina foi diluída inicialmente em DMSO, em uma concentração de 10 mM e o Fluo3-AM diluído em DMSO em uma concentração de 0,5 mM. No momento do experimento todas as drogas foram diluídas para a concentração final em solução Hank's/Hepes.

4.3. Indução de Diabetes mellitus

Os animais foram submetidos a 12 horas de jejum alimentar e hídrico e, após esse período, foram distribuídos aleatoriamente para compor os seguintes grupos experimentais:

- a) controle: receberam administração única de solução salina 0,9%;
- b) aloxana 30: tratados com aloxana (30 mg/kg);
- c) aloxana 15: tratados com aloxana (15 mg/kg);
- d) estreptozotocina 35: tratados com estreptozotocina (35 mg/kg);

e) estreptozotocina 17,5: tratados com estreptozotocina (17,5 mg/kg).

As substâncias foram administradas por via intravenosa, através da veia peniana. Para realizar as injeções os animais foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano (Cristália). Após 48h da administração das drogas, a glicemia dos animais foi avaliada no aparelho medidor de glicose FreeStyle Lite, utilizando uma gota de sangue colhido de um corte na extremidade da cauda do animal. Foram considerados diabéticos aqueles animais com a glicemia acima de 160 mg/dL.

Os animais tratados com aloxana (30 mg/kg) foram subdivididos em dois grupos com base na glicemia:

- a) Aloxana- hiperglicêmico (ALX- HG): nível de glicose no sangue > 160 mg/dL;
- b) Aloxana – normoglicêmico (ALX- NG): nível de glicose no sangue < 160 mg/dL.

Os animais tratados com estreptozotocina também foram subdivididos em dois grupos utilizando o mesmo critério descrito acima.

- a) Estreptozotocina – hiperglicêmico (STZ- HG);
- b) Estreptozotocina- normoglicêmico (STZ- NG).

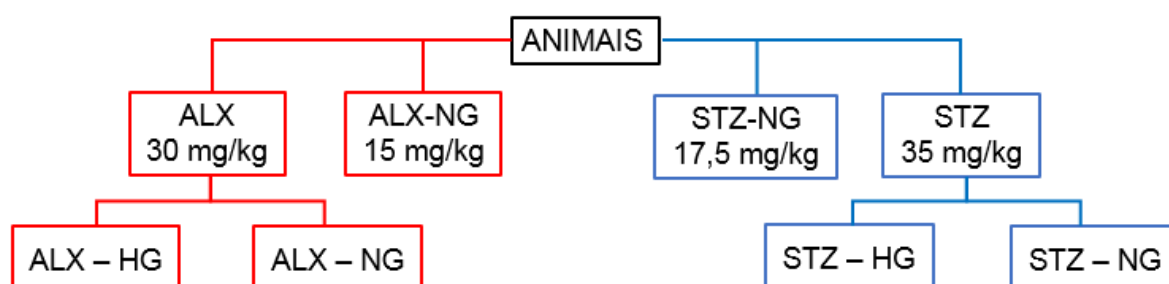


Figura 5: Esquema geral da distribuição dos animais em grupos experimentais após tratamento com aloxana ou estreptozotocina para indução do diabetes.

O período experimental foi de cinco semanas. Antes, uma semana e cada duas semanas depois (0, 1, 3 e 5 semanas), foram realizadas as medições de glicose e testes *in vivo*. A glicemia foi avaliada no período da manhã, logo em seguida os animais eram pesados e submetidos ao teste de sensibilidade mecânica. No período da tarde era avaliada sensibilidade térmica.

4.4. Avaliação do peso corporal

Para avaliar se houve diferença na massa corporal entre os grupos estudados no decorrer do período experimental, todos os animais foram pesados antes e uma semana e a cada duas

semanas até completar cinco semanas do tratamento. A pesagem dos animais foi feita em balança analítica de bancada (Ramuz).

4.5. Testes *in vivo*

4.5.2. Teste de pressão crescente: Von Frey eletrônico

A avaliação da sensibilidade mecânica na pata de ratos foi realizada pelo método de pressão crescente (Von Frey eletrônico, Insight, Ribeirão Preto, Brasil) previamente descrita (VIVANCOS et al., 2004). Este método utiliza um aparelho composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas (Figura 6A). Ao transdutor é adaptada uma ponteira Universal Tips 10mL (T-300, Axygen) que estimula diretamente a pata do animal. O teste consiste de o experimentador aplicar a ponteira em angulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o qual provoca uma resposta de flexão característica com retirada da pata. O estímulo é interrompido após a observação da resposta, na qual o animal retira a pata e fazem sacudidas com a mesma.

Durante os experimentos os animais são mantidos em caixas acrílicas medindo 12 x 100 por 17cm de altura, com assoalho formado por uma rede de malhas medindo cerca de 5mm² constituída de arame não maleável de 1mm de diâmetro (Figura 6B). Essas caixas foram mantidas a cerca de 25 cm da superfície de uma bancada, de modo que a estimulação da pata traseira dos animais fosse realizada. Antes do início dos experimentos os animais permaneceram nessas caixas por quinze minutos para a adaptação.

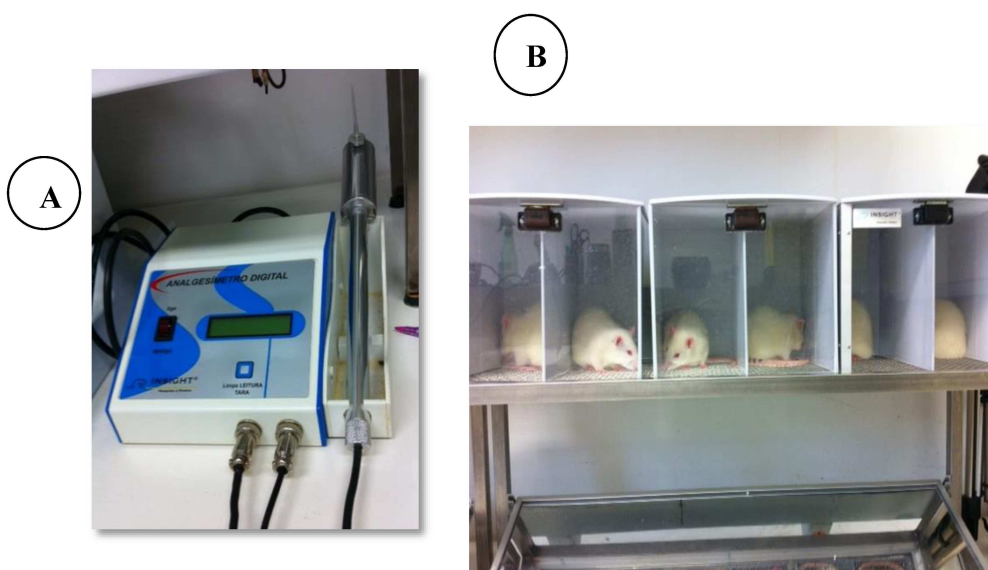


Figura 6: Teste de Von Frey Eletrônico. A: Parte do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata, a imagem apresenta o transdutor de pressão, que mede a força em gramas, associado a um detector digital de força. B: Caixas acrílicas onde os ratos são colocados para que seja feita a estimulação mecânica. Fonte: autoria própria.

4.5.1. Teste de imersão da cauda

O teste de imersão da cauda consiste em um método onde a cauda do animal é imersa em água quente para avaliar a sensibilidade térmica (NECKER e HELLON, 1978; AUTHIER et al, 2003).

Neste procedimento é observado a resposta de retirada da cauda do animal quando imersa em um recipiente com água, cuja temperatura é de $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para a realização desse teste utilizamos um aparelho de Banho Maria para laboratório e, para certificarmos a temperatura da água utilizamos um termômetro (Figura 7). O tempo de permanência foi cronometrado assim que a cauda do animal foi colocada dentro da água até o animal levantar a extremidade da cauda para fora da água. A fim de prevenir dano tecidual, o experimento foi interrompido caso o tempo de permanência ultrapassasse 20 segundos (tempo de corte).



Figura 7: Teste de imersão da cauda. Animal posicionado para a realização do teste de sensibilidade térmica em um equipamento banho-maria. Fonte: autoria própria.

4.5.5. Teste oral de tolerância à Glicose (ToTG)

O Teste oral de Tolerância à Glicose (ToTG) ou Curva Glicêmica é uma técnica empregada na clínica para diagnóstico do diabetes em humanos. Consiste na medição consecutiva da glicose sanguínea de indivíduos inicialmente em jejum e após a ingestão de uma sobrecarga de 75 g de glicose, administrada via oral, com coletas a cada 30 minutos. Indivíduos

com glicemia de jejum menor ou igual 110 mg/dL e glicemia após duas horas da sobrecarga maior ou igual 200 mg/dL são considerados diabéticos (ADA, 2012).

Para a realização do ToTG em ratos, foram avaliados o grupo controle e os grupos normoglicêmicos (aloxana e estreptozotocina). O teste foi realizado no último dia de experimento (após semana 5). Uma solução de glicose a 20%, na dose de 2 g/kg de peso corporal, foi administrada aos animais por via oral, através do processo de gavagem (Figura 8). A coleta de sangue foi feita por meio de corte na extremidade da cauda do animal nos tempos: 0 (basal), 30, 60 e 120 minutos.



Figura 8: Técnica de gavagem. Administração de glicose por via oral para realização do teste oral de tolerância a glicose. Fonte: <https://www.flickr.com/photos/31134150@N07/2917664577>

4.5.3. Avaliação dos efeitos hipernociceptivos e edematogênicos após a administração intraplantar de aloxana e estreptozotocina

Aloxana e estreptozotocina foram injetadas no tecido subcutâneo da pata traseira direita dos ratos por meio de uma agulha hipodérmica 26G, conectada a uma seringa e inserida no centro da porção plantar da pata, entre as cinco calosidades distais (Figura 9). Foram testadas as doses 100 e 200 µg/pata. Foram utilizados 24 animais, dos quais, doze foram tratados com aloxana, sendo que destes, seis animais receberam uma injeção de 50 µL de solução contendo 100 µg de aloxana e outros seis animais receberam 200 µg da mesma droga. Os restantes dos animais foram tratados com estreptozotocina, onde seis deles receberam injeção intraplantar de estreptozotocina (100 µg/pata, em 50 µL) e o restante 200 µg/pata, em 50 µL. A sensibilidade mecânica das patas direita (tratadas) foram avaliadas antes e após 1, 3, 6 e 24 horas da administração da droga. O teste de sensibilidade foi realizado através do aparelho Von Frey eletrônico, conforme já descrito.



Figura 9: Injeção intraplantar. Administração das drogas por meio da injeção no tecido subcutâneo do centro da porção plantar da pata. Fonte: autoria própria.

Nos mesmos ratos que receberam a injeção intraplantar, foi avaliado o volume da pata antes e imediatamente após as medições de sensibilidade mecânica durante 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção. Os edemas de pata foram mensurados utilizando um pletismômetro (UGO, Basile. Modelo-37140). O pletismômetro é um equipamento que consiste de um recipiente preenchido com uma solução eletrolítica na qual a pata do rato é mergulhada, um transdutor, que registra pequenas diferenças no nível de água causado por deslocamento de volume, através um display que indica o volume exato (em mL) da pata (Figura 10). A variação no volume da pata foi obtida pela diferença do volume final e inicial da pata.

Além disso, os níveis de glicose no sangue foram medidos antes e 8 h após a administração das drogas. Esses experimentos buscaram investigar as propriedades hipernociceptivas e edematogênicas da injeção intraplantar de aloxana e estreptozotocina.



Figura 10: Avaliação do edema de pata. Animal com a pata posicionada no equipamento pletismômetro para que seja feita a medição do volume da pata após a administração das drogas. Fonte: <http://www.cebiolog.com.br/pletismocircmetro.html>

4.5.4. Avaliação da sensibilidade mecânica após a administração intraganglionar de aloxana ou estreptozotocina

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.

Os animais foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano e mantidos sob anestesia enquanto o procedimento de injeção era realizado. Foram utilizados 06 animais para cada grupo experimental.

Foi administrado um volume de 5 μ L 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 11A). 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 fique 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 11B). 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.

O limiar nociceptivo mecânico dos animais foi medido pelo método de Von Frey eletrônico antes e depois dos tratamentos (injeção intraganglionar) por 15, 30 e 60 minutos, nas patas traseiras direitas.

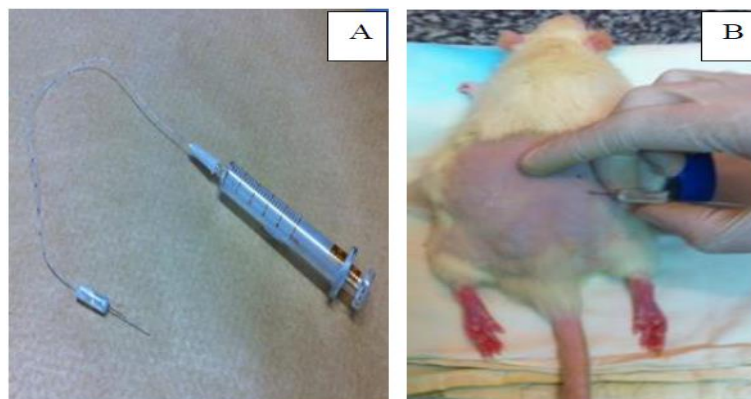


Figura 11: Injeção intraganglionar. A) Material utilizado para fazer a injeção direta (seringa de vidro, cateter e agulha gengival. B) Animal anestesiado recebendo a injeção da droga via intraganglionar. Fonte: autoria própria.

4.6. Testes *in vitro*

4.6.1. Cultura primária de células dos gânglios da raiz dorsal

Para a realização dos testes *in vitro* foram utilizadas ratas Wistar fêmeas. As culturas foram realizadas conforme protocolo descrito por Linhart et al., 2003. As ratas foram anestesiadas por inalação de Isoflurano e eutanasiadas por decaptação, os gânglios da raiz dorsal da região lombar e torácica foram removidos (16 a 20 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank's (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 em meio Hank's/Hepes contendo 0,28 U/mL de collagenase (Sigma) por 75 minutos e depois por 12 minutos em solução contendo 0,25 mg/mL de tripsina. Os gânglios foram lavados em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) (Sigma) suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina. As células foram dissociadas mecanicamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e foram cultivadas em placas cobertas com Matrigel e mantidas em atmosfera de 5% CO₂ e temperatura de 37°C com o mesmo meio de cultura DMEM e utilizadas após 24 horas. As culturas foram realizadas em placas contendo uma lamínula de vidro aderida ao fundo para permitir a visualização por microscopia confocal.

4.6.2. Avaliação do influxo de cálcio (Ca^{2+}) nos neurônios sensoriais primários

Para determinação do Ca^{2+} intracelular, após 24 horas de incubação as placas de cultura primárias de gânglios sensoriais foram lavadas em meio Hank's/ Hepes e incubadas com 5 μM de Fluo-3/AM (indicador de Ca^{2+}) (Invitrogen Molecular Probes®) por 40 minutos, em temperatura ambiente e no escuro. Em seguida as placas contendo as culturas foram lavadas em solução Hank's/Hepes por três vezes e mantidas neste tampão durante a aquisição das imagens no microscópio confocal.

O Fluo-3 é uma molécula que exibe um aumento na fluorescência somente após a ligação do Ca^{2+} . Visto que os sais de Fluo-3 não são capazes de penetrar a membrana celular, é necessário o uso do éster acetoximetílico (AM), o qual é clivado por esterases não específicas no meio intracelular aprisionando o Fluo-3.

A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de séries temporais de imagens obtidas através de 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 3 minutos em intervalos de 3 segundos, imediatamente após o início administração das drogas a serem testadas. As drogas foram administradas durante a aquisição das imagens em uma concentração 10X superior a final desejada. A lamínula contendo as culturas é mantida com 90 μl da solução tampão e as drogas foram adicionadas em 10 μl , de forma a diluir para a concentração final desejada. Aloxana e estreptozotocina foram administradas durante a aquisição de imagens em concentrações finais de 1 μM . Ao final da aquisição de imagens para obtenção do efeito das drogas diabéticas, ainda na presença destas drogas, foi administrada capsaicina (concentração final de 100 nM) e uma nova série de imagens foi registrada durante 2 minutos.

Para a análise das imagens foi utilizado o software de domínio público ImageJ (Desenvolvido por Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Os dados são mostrados como $(\Delta F/F_0)$, ou seja, a variação de intensidade de fluorescência ($\Delta F = F - F_0$) dividida pela fluorescência basal (F_0) de forma a normalizar as variações de concentração do indicador fluorescente nas células. Para análise estatística foram considerados os valores máximos de variação de fluorescência para cada um dos neurônios avaliados.

4.7. Análise estatística

Nos testes *in vivo*, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de pelo menos 6 animais por grupo. Nos testes *in vitro*, foi avaliada a variação de fluorescência para cada neurônio e foram comparadas as médias de $\Delta F/F_0$ dos neurônios de ao menos 3 placas por tratamento. A análise dos resultados foi feita pelo programa GraphPad Prisma 5, pelo teste de variância ANOVA de uma ou de duas vias. A ANOVA de uma via foi utilizada para determinar diferenças entre os tempos testados em um mesmo grupo experimental, enquanto que a ANOVA de duas vias foi utilizada para comparação entre os grupos nos experimentos em que foram feitas medidas repetidas (tempo). Quando o nível de significância indicou diferença estatística entre as médias testadas foi utilizado o Teste Bonferroni para comparar os tratamentos. O teste t foi utilizado quando apenas duas médias foram comparadas. O nível de significância foi de $P < 0.05$.

5. Resultados

5.1. Avaliação do estado glicêmico e peso corporal dos animais após tratamento com drogas diabetogênicas

Para comparação dos efeitos de aloxana e estreptozotocina na indução de diabetes, foram injetadas em animais por via intravenosa, 30 mg/kg de aloxana e 35 mg/kg de estreptozotocina. Os animais controle receberam injeção de solução salina. Ratos com níveis de glicose acima de 160 mg/dL foram considerados diabéticos.

Após 48 horas de tratamento, 50% dos animais tratados com aloxana estavam hiperglicêmicos (13/26) enquanto que 45% deles (11/26) permaneceram normoglicêmicos durante todo estudo. Apenas dois animais diabéticos, do grupo de animais hiperglicêmicos tratados com aloxana, não sobreviveram até o final do período experimental. Estes animais apresentavam uma glicemia superior em relação aos demais animais do grupo. No tratamento com estreptozotocina, 69% dos animais (20/29) ficaram hiperglicêmicos e 31% (09/29) permaneceram normoglicêmicos durante todo estudo. Não houve morte nesse grupo.

O acompanhamento da glicemia mostrou que após a administração das drogas, os níveis glicêmicos dos animais diabéticos, tanto do grupo aloxana, como do grupo estreptozotocina, permaneceram altos durante todo o período de estudo (Figura 12 e Tabela 1). Em contrapartida, os animais dos grupos controle e normoglicêmicos não sofreram alterações nos níveis glicêmicos, exceto na primeira semana de estudo, onde os animais normoglicêmicos de ambos os grupos, desenvolveram uma breve hiperglicemia, que não ultrapassou 175 mg/dL e que se normalizou ao longo das outras semanas de acompanhamento (Figura 12 e Tabela 1).

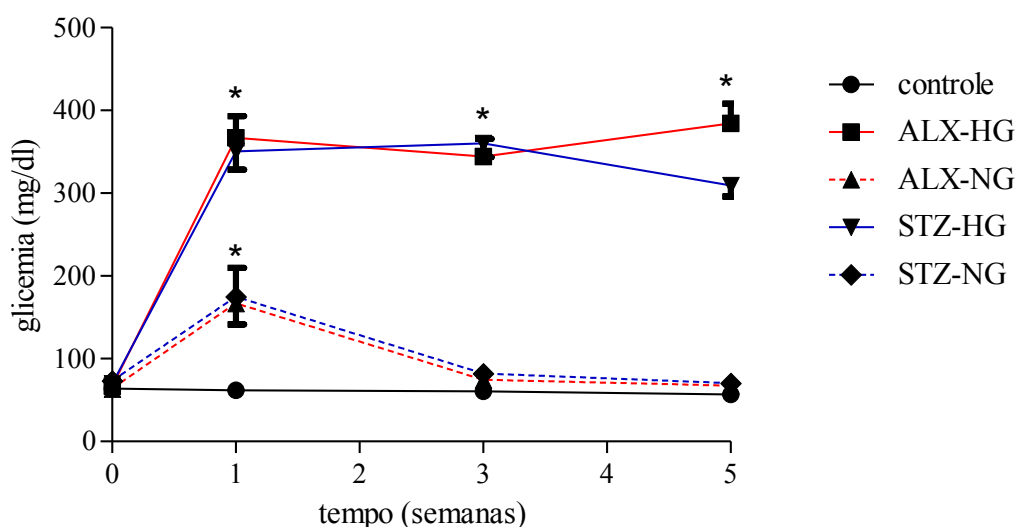


Figura 12: Avaliação do estado glicêmico dos animais após administração de aloxana ou estreptozotocina. As aferições da glicemia foram realizadas antes, na primeira semana e depois a cada duas semanas durante cinco semanas (semana 0, 1, 3 e 5). O gráfico mostra os dados dos grupos controle, aloxana (30 mg/kg) divididos em normoglicêmicos (ALX-NG; n= 11) e hiperglicêmicos (ALX-HG= 13) e estreptozotocina (35 mg/kg) divididos em normoglicêmicos (STZ-NG= 9) e hiperglicêmicos (STZ-HG=20). Dados mostrados como média e EPM de 9-20 animais por grupo experimental. *p<0,001 significativamente diferente do grupo controle (ANOVA duas vias, Bonferroni).

	Basal	Semana 1	Semana 3	Semana 5
<i>Controle</i>	63,7 ± 11,5	61,7 ± 9,3	60,5 ± 6,7	56,7 ± 8,0
<i>ALX- HG</i>	66,6 ± 10,46	367,0 ± 94,4 *	344,5 ± 75,7 *	384,2 ± 85,9 *
<i>ALX- NG</i>	63,6 ± 16,5	166,8 ± 84,1 *	74,2 ± 20,5	67,3 ± 16,1
<i>STZ- HG</i>	69,8 ± 11,29	350,7 ± 91,5 *	360,0 ± 68,4 *	309,3 ± 54,6 *
<i>STZ- NG</i>	73,0 ± 8,6	174,8 ± 104,2 *	82,0 ± 14,3	70,2 ± 11,6

Tabela 1: Valores glicêmicos, em mg/dL, de animais diabéticos e saudáveis. Está sendo mostrada a média ± EPM de 9-20 animais por grupo experimental. *p<0,001 significativamente diferente do grupo controle (ANOVA duas vias, Bonferroni).

Para avaliar se os efeitos do tratamento com aloxana e estreptozotocina são dependentes da glicemia, foram realizados experimentos tratando os animais com metade da dose utilizada para indução do diabetes experimental. Portanto, os animais foram tratados com 15 mg/kg de aloxana ou com 17,5 mg/kg de estreptozotocina. Estes animais permaneceram normoglicêmicos durante todo período experimental (Figura 13/ Tabela 2). Não houve diferença significativa entre os grupos.

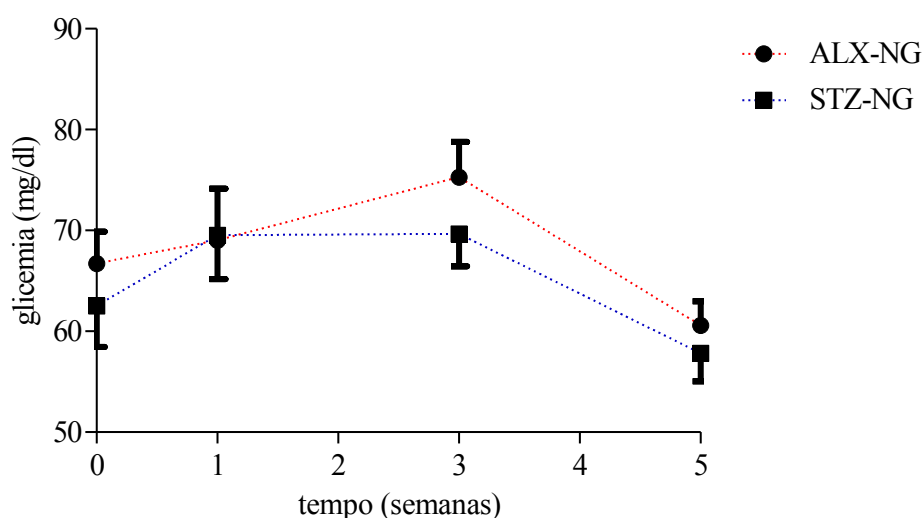


Figura 13: Avaliação do estado glicêmico dos animais após administração de doses menores de aloxana ou estreptozotocina. Foram administradas doses de 15 mg/kg de aloxana (n=6) e 17,5 mg/kg de estreptozotocina (n=6). As aferições da glicemia foram realizadas antes, na primeira semana e depois a cada duas semanas durante cinco semanas (semanas 0, 1, 3 e 5). Dados mostrados como média e EPM de 6 animais por grupo experimental (ANOVA duas vias, Bonferroni).

	Basal	Semana 1	Semana 3	Semana 5
<i>ALX-NG</i>	66,7 ± 8,4	69,0 ± 13,6	75,2 ± 9,2	60,5 ± 6,3
<i>STZ-NG</i>	62,5 ± 9,9	69,5 ± 10,5	69,6 ± 7,9	57,8 ± 6,8

Tabela 2: Valores glicêmicos, em mg/dL, de animais tratados com doses menores de aloxana ou estreptozotocina. Está sendo mostrada a média ± EPM de 6 animais por grupo experimental.

Ao longo das semanas foi realizado um acompanhamento do peso corporal dos animais. Os animais dos grupos hiperglicêmicos, tratados com aloxana ou estreptozotocina, perderam peso gradativamente durante todo período de observação, enquanto os animais normoglicêmicos e grupo controle aumentaram a massa corpórea (Figura 14A). Ocorreu uma perda significativa de massa, em relação ao grupo controle, nas semanas 3 e 5 de estudo, tanto para os animais hiperglicêmicos tratados com aloxana quanto com estreptozotocina. Os animais tratados com doses menores de aloxana ou estreptozotocina apresentaram aumento gradual de massa durante todo período experimental (Figura 14B) e não houve diferença significativa entre os grupos.

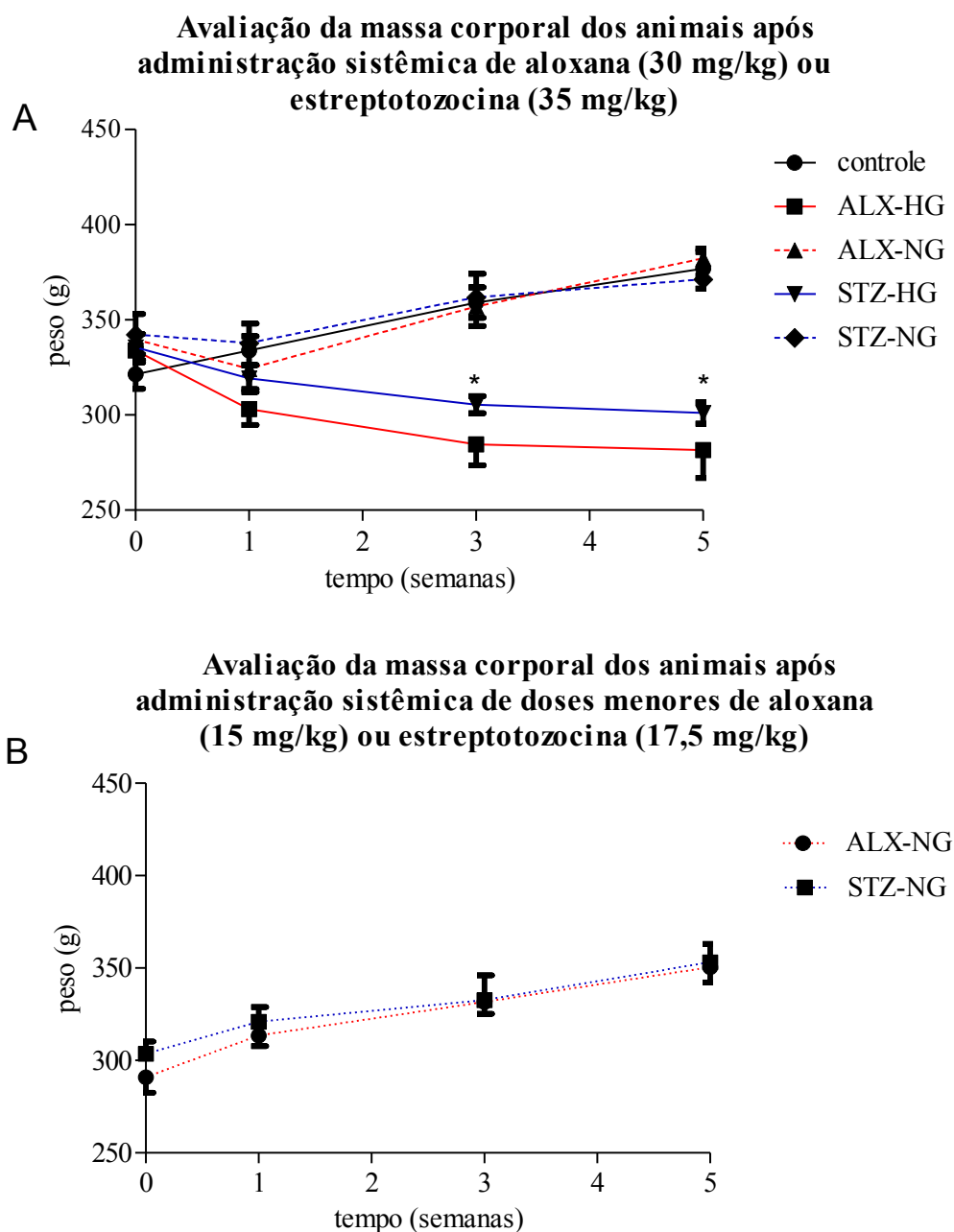


Figura 14: Avaliação da massa corporal dos animais após administração sistêmica de drogas diabetogênicas (aloxana ou estreptozotocina). Os animais foram pesados antes, na primeira semana e depois a cada duas semanas durante cinco semanas (semanas 0, 1, 3 e 5). A) Massa corporal em gramas dos animais dos grupos controle, aloxana (30 mg/kg) divididos em normoglicêmicos (ALX-NG= 11) e hiperglicêmicos (ALX-HG= 13) e estreptozotocina (35 mg/kg= 20) divididos em normoglicêmicos (STZ-NG= 9) e hiperglicêmicos (STZ-HG). B) Massa corporal em gramas dos animais tratados com doses menores das drogas. O gráfico mostra os dados dos grupos ALX-NG (15 mg/kg; n= 6) e STZ-NG (17,5 mg/kg; n=6). Dados mostrados como média e EPM de 6-20 animais por grupo experimental. * $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo ALX-HG (30 mg/kg) e STZ-HG (35 mg/kg) em relação ao grupo controle (ANOVA duas vias, Bonferroni).

5.2. Efeito do tratamento com aloxana ou estreptozotocina sobre a sensibilidade mecânica dos animais

Para avaliar a sensibilidade mecânica todos os animais foram submetidos ao teste Von Frey eletrônico nas patas traseiras direitas antes dos tratamentos e 1, 3 e 5 semanas depois (Figura 15). Os dados obtidos foram analisados de duas formas. A comparação entre os grupos controle, estreptozotocina hiperglicêmico (STZ-HG), estreptozotocina normoglicêmico (STZ-NG), aloxana hiperglicêmico (ALX-HG) e aloxana normoglicêmico (ALX-NG) foi realizada utilizando-se ANOVA de duas vias, com teste pós de Bonferroni. Também foram avaliadas as alterações de sensibilidade em relação à sensibilidade basal dentro de cada um dos grupos através de ANOVA de uma via, com teste pós de Bonferroni. Devido à dificuldade de expressar todas as diferenças estatísticas entre os grupos no gráfico (Figura 15), decidimos por incluir a análise da ANOVA de uma via apenas na tabela (Tabela 3).

Foi observada uma diminuição do limiar de sensibilidade mecânica nos dois grupos de animais tratados com estreptozotocina na primeira semana após o tratamento, quando comparado ao grupo controle. Esta diferença foi observada tanto nos animais hiperglicêmicos (STZ-HG) quanto nos animais normoglicêmicos (STZ-NG) (Figura 15).

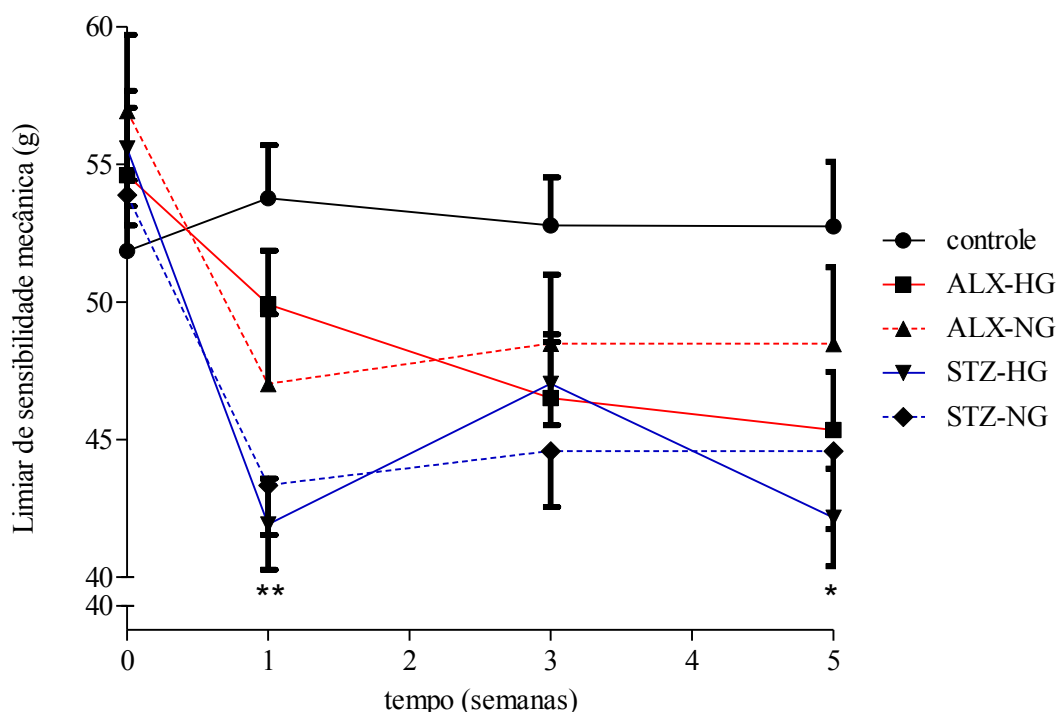


Figura 15: Efeito da administração das drogas diabetogênicas aloxana ou estreptozotocina na sensibilidade mecânica. É mostrado o limiar de sensibilidade mecânica, em gramas, dos grupos controle, aloxana (30 mg/kg) divididos em normoglicêmicos (ALX-NG; n=11) e hiperglicêmicos (ALX-HG; n=13) e estreptozotocina (35 mg/kg) divididos em normoglicêmicos (STZ-NG, n=9) e hiperglicêmicos (STZ-HG; n=20). Dados mostrados como

média e EPM de 9-20 animais por grupo experimental. * $p < 0,001$ significativamente diferente em relação ao grupo controle. ** $p < 0,001$ significativamente diferente dos grupos STZ-NG e STZ-HG em relação ao grupo controle (ANOVA duas vias, Bonferroni).

Tratamento	Semana			
	0	1	3	5
Controle	51,85 \pm 2,5	53,7 \pm 1,9	52,8 \pm 1,7	52,7 \pm 2,3
ALX-HG	54,6 \pm 2,4	49,9 \pm 1,9	46,5 \pm 2,3	45,3 \pm 2,1 #
ALX-NG	56,9 \pm 2,7	47,0 \pm 2,5 #	48,5 \pm 2,5	48,4 \pm 2,8
STZ-HG	55,5 \pm 2,1	41,9 \pm 1,6**#	47,0 \pm 1,5 #	42,1 \pm 1,7 **#
STZ-NG	55,3 \pm 1,7	43,3 \pm 1,8**	44,5 \pm 2,0	44,5 \pm 2,8 #

Tabela 3: Valores do limiar da sensibilidade mecânica (em gramas) de animais tratados com aloxana ou estreptozotocina. Está sendo mostrada a média \pm EPM de 9-20 animais por grupo experimental. * $p < 0,001$ significativamente diferente em relação ao grupo controle (ANOVA duas vias, Bonferroni). # $p < 0,05$ significativamente diferente em relação a medida basal (ANOVA uma via, Bonferroni).

Também foi avaliada a sensibilidade mecânica dos animais tratados com doses menores de aloxana (ALX-NG: 17,5 mg/kg; n=6) ou estreptozotocina (STZ-NG: 15mg/kg; n=6) (Figura 16). No grupo estreptozotocina normoglicêmico o limiar de sensibilidade mecânica foi significativamente reduzido na primeira e terceira semanas de estudo quando comparado ao limiar basal (ANOVA 1 via, # $p < 0,05$). Já no grupo aloxana normoglicêmico não houve diferença ao longo das cinco semanas de estudo. Entre os grupos, foi observada uma diferença significativa no limiar de sensibilidade mecânica na semana 3.

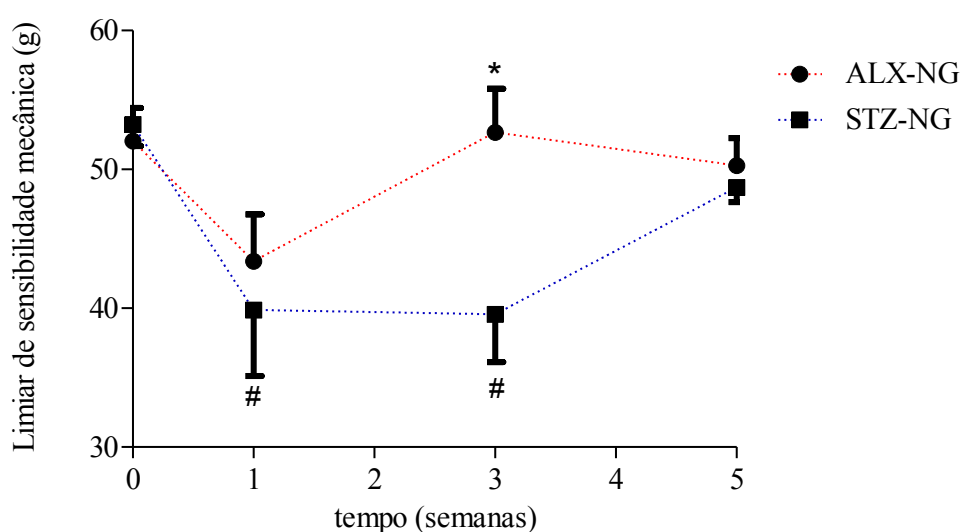


Figura 16: Efeito da administração das drogas diabetogênicas aloxana ou estreptozotocina em doses menores na sensibilidade mecânica de animais normoglicêmicos. É mostrado o limiar de sensibilidade mecânica, em gramas, dos grupos ALX-NG (15 mg/kg) e STZ-NG (17,5 mg/kg).

Dados mostrados como média e EPM de 06 animais por grupo experimental. * $p < 0,05$ (ANOVA duas vias, Bonferroni). # $p < 0,05$ significativamente diferente em relação a medida basal (ANOVA uma via, Bonferroni).

5.3. Efeito dos tratamentos com as drogas diabetogênicas aloxana e estreptozotocina sobre a sensibilidade térmica

Com o objetivo de avaliar alterações na sensibilidade térmica dos animais tratados com aloxana ou estreptozotocina, foi realizado o teste da imersão de cauda antes e 1, 3 e 5 semanas depois do tratamento. Não foram observadas alterações nos limiares de sensibilidade térmica ao calor em todos os grupos testados ao longo do experimento (Figura 17).

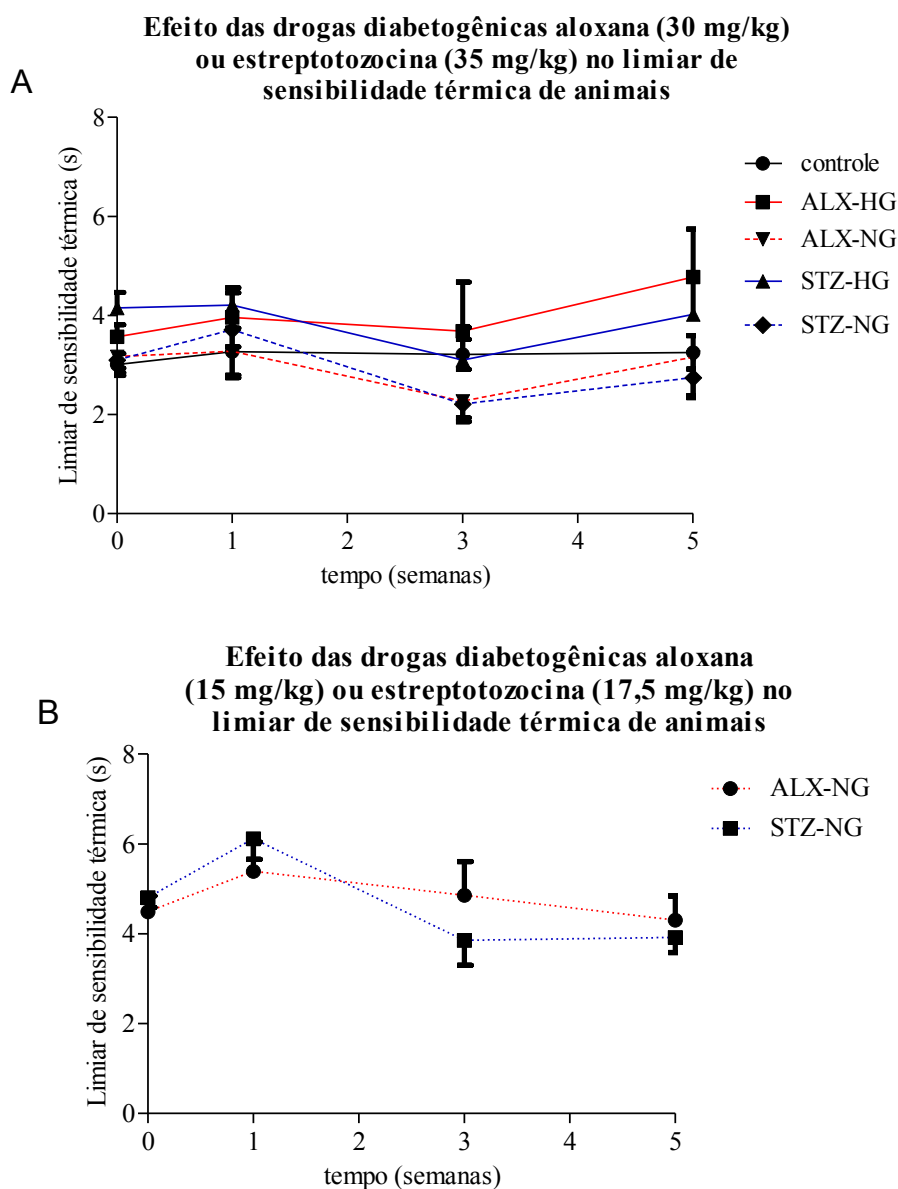


Figura 17: Efeito das drogas diabetogênicas aloxana ou estreptozotocina no limiar de sensibilidade térmica de animais. A) Limiar de sensibilidade térmica dos animais dos grupos

dos grupos controle, aloxana (30 mg/kg) divididos em normoglicêmicos (ALX-NG; n=11) e hiperglicêmicos (ALX-HG; n=13) e estreptozotocina (35 mg/kg) divididos em normoglicêmicos (STZ-NG; n=9) e hiperglicêmicos (STZ-HG; n=20). B) Limiar de sensibilidade térmica dos animais tratados com doses menores das drogas. O gráfico mostra os dados dos grupos ALX-NG (15 mg/kg; n= 6) e STZ-NG (17,5 mg/kg; n=6). Dados mostrados como média e EPM de 6-20 animais por grupo experimental (ANOVA duas vias, Bonferroni).

5.4. Avaliação indireta da função das células beta pancreáticas pelo teste oral de tolerância a glicose (ToTG)

Para avaliar a função das células beta pancreáticas nos animais do grupo controle e dos grupos normoglicêmicos (mas que receberam tratamento com drogas diabetogênicas), foi realizado o teste oral de tolerância a glicose no último dia de experimento. Em todos os grupos submetidos ao teste, a administração de glicose aumentou os níveis de glicemia (Figura 18A e Figura 18B).

Em animais tratados com doses de aloxana ou estreptozotocina (Figura 18A), foi observado no tempo 30 minutos, que os níveis glicêmicos aumentaram cerca de 26,5 mg/dL no grupo controle, 35,6 mg/dL no grupo tratado com aloxana e 40,7 mg/dL no grupo tratado com estreptozotocina. A resposta dos animais tratados com estreptozotocina ou aloxana foi maior do que do grupo controle no tempo de 60 minutos, enquanto que somente o grupo estreptozotocina apresentou diferença em relação ao grupo controle no tempo de 30 minutos. Não houve diferença entre os valores de glicemia dos grupos de animais tratados com estreptozotocina ou com aloxana. Após 120 minutos da ingestão houve a normalização dos níveis glicêmicos em todos os grupos.

Já nos grupos tratados com doses menores de aloxana e estreptozotocina (Figura 18B), foi observado um pico no aumento dos níveis glicêmicos no tempo 60 minutos, onde foi observado que os níveis glicêmicos do grupo aloxana aumentou cerca de 24 mg/dL e no grupo estreptozotocina 32,7 mg/dL. O teste não foi realizado em animais hiperglicêmicos, visto que os níveis da glicemia nesses animais já estavam bastante elevados e tal resultado não traria informação relevante para o estudo.

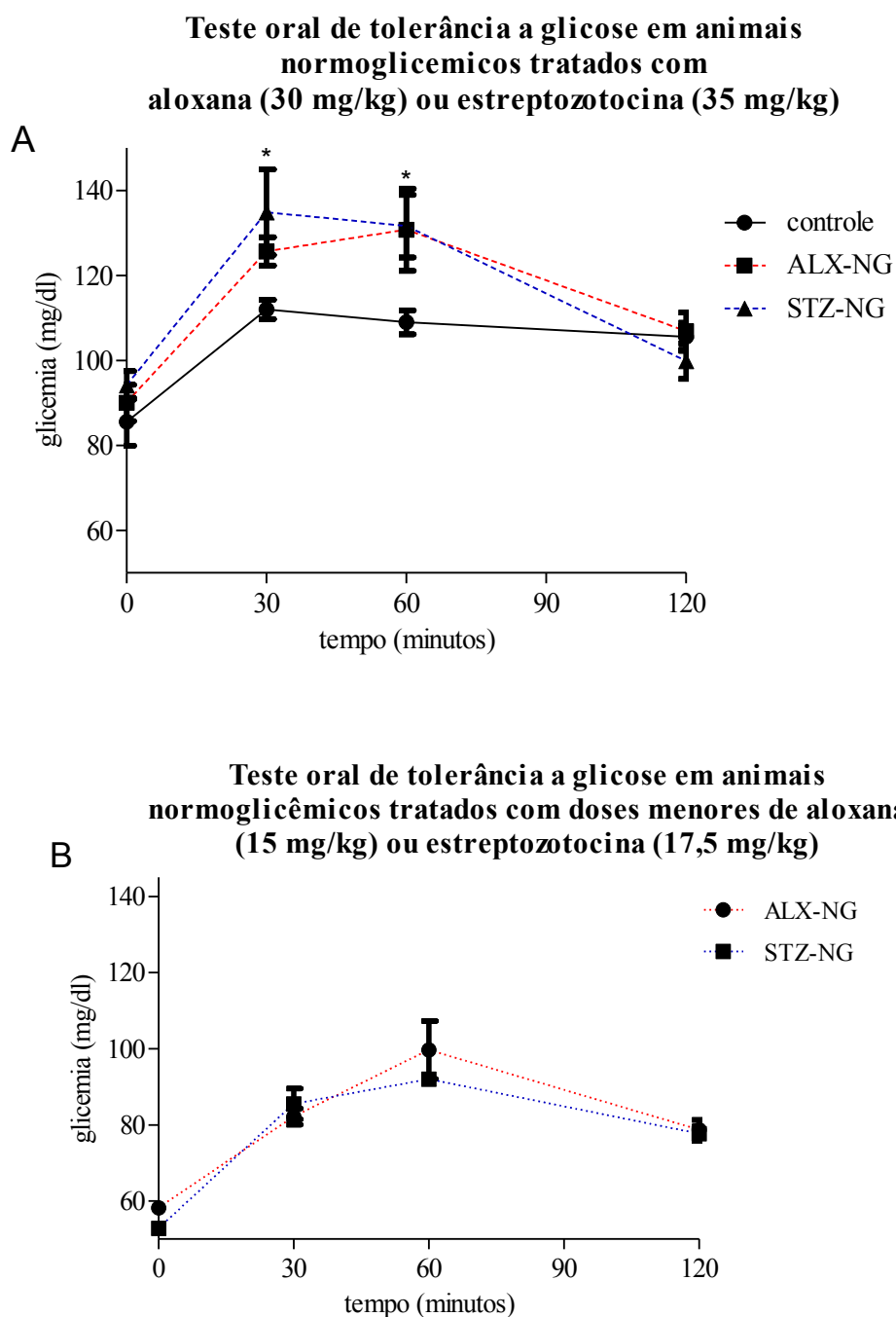


Figura 18: Glicemia após Teste oral de tolerância a glicose em animais normoglicêmicos. É mostrado o valor da glicemia, em mg/dL, antes e 30, 60 e 120 minutos após a administração de solução de glicose à 20% (via oral). A) Valor da glicemia dos grupos controle (n=7), aloxana normoglicêmicos (ALX-NG; n=9) e estreptozotocina normoglicêmicos (STZ-NG; n=8). B) Valor da glicemia dos animais tratados com doses menores das drogas: ALX-NG (15 mg/kg; n= 6) e STZ-NG (17,5 mg/kg; n=6). Dados mostrados como média e EPM de 6-9 animais por grupo experimental. * $p < 0,05$ significativamente diferente dos grupos STZ-NG e ALX-NG em relação ao grupo controle.

5.5. Efeito da injeção intraplantar de aloxana e estreptozotocina sobre a sensibilidade mecânica em pata de ratos

Foi realizado o teste de sensibilidade mecânica Von Frey eletrônico antes da administração intraplantar das drogas aloxana ou estreptozotocina e 1, 3, 6 e 24 horas depois (Figura 19). No grupo que recebeu a injeção de 100 µg de aloxana, o limiar de sensibilidade mecânica foi significativamente reduzido na terceira e sexta hora de estudo quando comparado ao limiar basal. Já nos animais tratados com 200 µg de aloxana essa redução significativa foi observada na primeira e terceira hora. No grupo dos animais tratados com 200 µg estreptozotocina as diferenças foram observadas na primeira, terceira e sexta hora em relação a medida basal (ANOVA 1 via, # $p < 0,05$). Houve uma indução significativa de hiperalgesia mecânica no grupo tratados com 200 µg de estreptozotocina. (Figura 19).

Nenhum dos ratos tratados com injeção intraplantar apresentou alterações na concentração de glicemia após oito horas da administração das drogas (Basal: ALX=107,7 ± 5,49; STZ= 109,6 ± 3,84; após 8h: ALX= 111,7 ± 3,67; STZ= 103,1 ± 3,28).

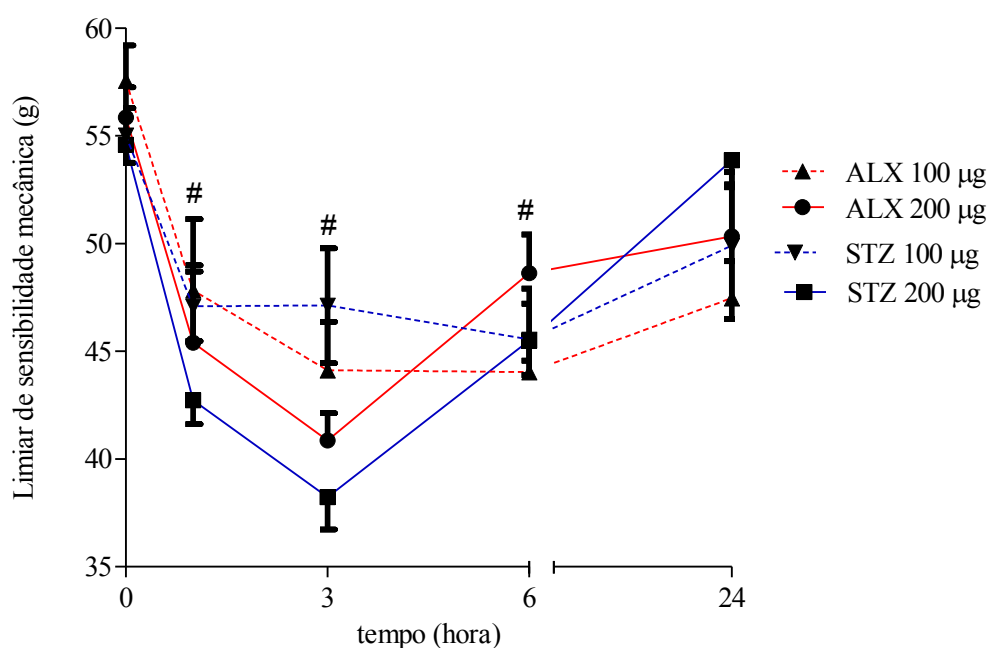


Figura 19: Efeito da injeção intraplantar de aloxana ou estreptozotocina na sensibilidade mecânica de animais. É mostrado o limiar de sensibilidade mecânica, em gramas, após injeção intraplantar de aloxana ou estreptozotocina nas doses 100 e 200 µg/pata, em 50 µL na pata direita dos animais. Dados apresentados como médias ± S.E.M. 6 animais por grupo experimental. # $p < 0,05$ significativamente diferente em relação a medida basal (ANOVA uma via, Bonferroni).

5.6. Efeito da injeção de intraplantar de aloxana e estreptozotocina sobre o volume da pata de ratos

Após a injeção intraplantar das drogas aloxana ou estreptozotocina, foi realizado um teste para avaliar as alterações dos volumes nas patas dos animais utilizando o pletismômetro. A injeção intraplantar de 200 µg de aloxana ou estreptozotocina foi capaz de aumentar de forma significativa o volume da pata dos animais na primeira hora de estudo, atingindo um pico nesse horário e declinou a partir de então. O aumento do volume da pata foi significativamente maior do que o observado em ratos tratados com 100 µg de aloxana e estreptozotocina 1 h após a injeção das drogas. Após 3h da injeção, notou-se uma diferença significativa entre o volume das patas dos grupos tratados com estreptozotocina 200 µg em relação ao tratamento de 100 µg da mesma droga. No entanto, a injeção intraplantar de 100 µg de aloxana e estreptozotocina não provocou alterações significativas no volume da pata dos animais durante o período experimental (Figura 20).

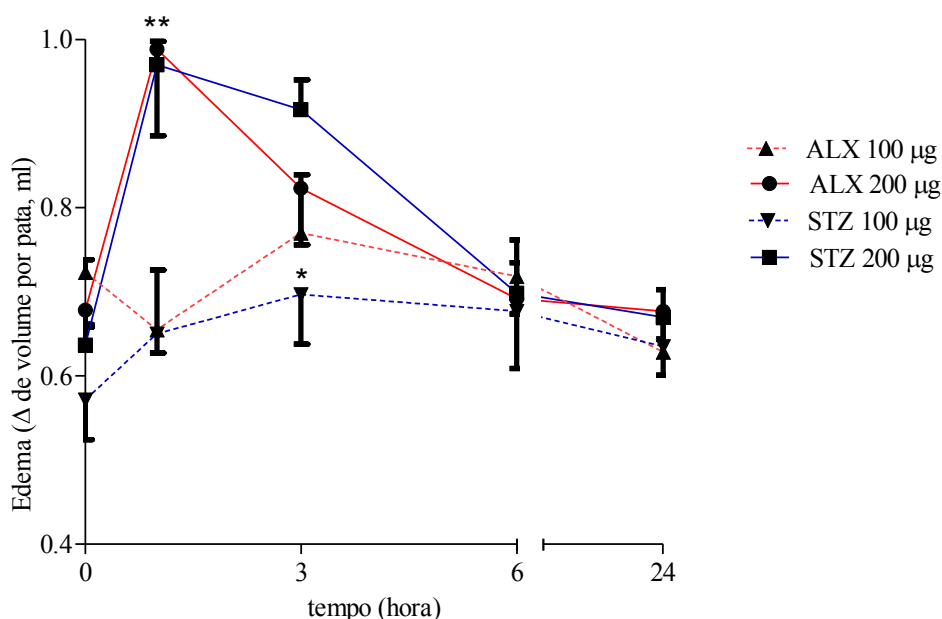


Figura 20: Efeito da administração intraplantar de aloxana ou estreptozotocina na variação de volume das patas de animais. É mostrado a variação de volume por pata antes e 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção intraplantar de aloxana ou estreptozotocina nas doses 100 e 200 µg/pata, em 50 µL na pata direita dos animais. Dados apresentados como médias \pm S.E.M. 6 animais por grupo experimental. * $p < 0,01$ significativamente diferente do grupo STZ-200 µg em relação ao grupo STZ 100 µg. ** $p < 0,001$ significativamente diferente dos grupos ALX 200 µg e STZ 200 µg em relação aos grupos ALX 100 µg e STZ 100 (ANOVA duas vias, Bonferroni).

5.7. Efeito da injeção intraganglionar de aloxana e estreptozotocina na sensibilidade mecânica dos animais

Foi avaliada a sensibilidade mecânica dos animais após injeção intraganglionar de aloxana ou estreptozotocina (10 μ g diluídas em 5 μ l de salina) diretamente no gânglio da raiz dorsal (L5) direito. No grupo que recebeu a injeção de aloxana, o limiar de sensibilidade mecânica foi significativamente reduzido no tempo de quinze minutos de avaliação quando comparado ao limiar basal. Já nos animais tratados com estreptozotocina essa redução significativa foi observada em todos os tempos de estudo ao ser comparado com a medida basal. (ANOVA 1 via, # $p < 0,05$) (Figura 21).

Entre os grupos, foi observada diferença significativa no limiar de sensibilidade nos tempos 15, 30 e 60 minutos após a injeção, sendo que no grupo tratado com estreptozotocina, os animais apresentaram uma maior sensibilidade mecânica (Figura 21).

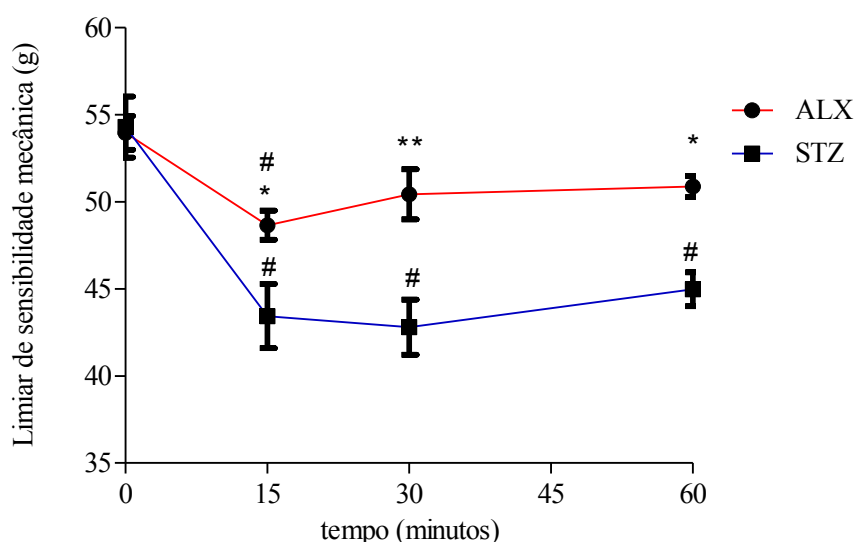


Figura 21: Efeito da injeção intraganglionar de aloxana ou estreptozotocina no limiar de sensibilidade mecânica dos animais. É mostrado o limiar de sensibilidade mecânica em patas dos animais antes e 15, 30 e 60 após injeção intraganglionar de aloxana ou estreptozotocina (10 μ g diluídas em 5 μ l de salina) no gânglio da raiz dorsal (L5) direito. Dados apresentados como médias \pm S.E.M. 6 animais por grupo experimental. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ significativamente diferente entre os grupos de estudo (ANOVA duas vias, Bonferroni). # $p < 0,05$ significativamente diferente em relação a medida basal (ANOVA uma via, Bonferroni).

5.8. Efeito da aloxana e estreptozotocina sobre dinâmica de cálcio nos neurônios sensoriais primários em cultura

Alterações nos níveis intracelulares de cálcio nos neurônios em culturas primárias de GRD foram avaliadas por meio de microscopia confocal utilizando o indicador de cálcio intracelular Fluo-3/AM. As drogas de estudo (aloxana e estreptozotocina) foram administradas diretamente nos neurônios em cultura na concentração de 1 μ M, após as primeiras (1-2) imagens (figura 22: 1,2,3A) e uma sequência de imagens foi obtida durante 03 minutos (figura 22: 1,2,3B). Após administração das drogas, ainda na presença das substâncias diabetogênicas, foi realizada administração de capsaicina, a qual ativa receptores TRPV1, característicos de fibras C nociceptivas (Figura 22: 1,2,3C).

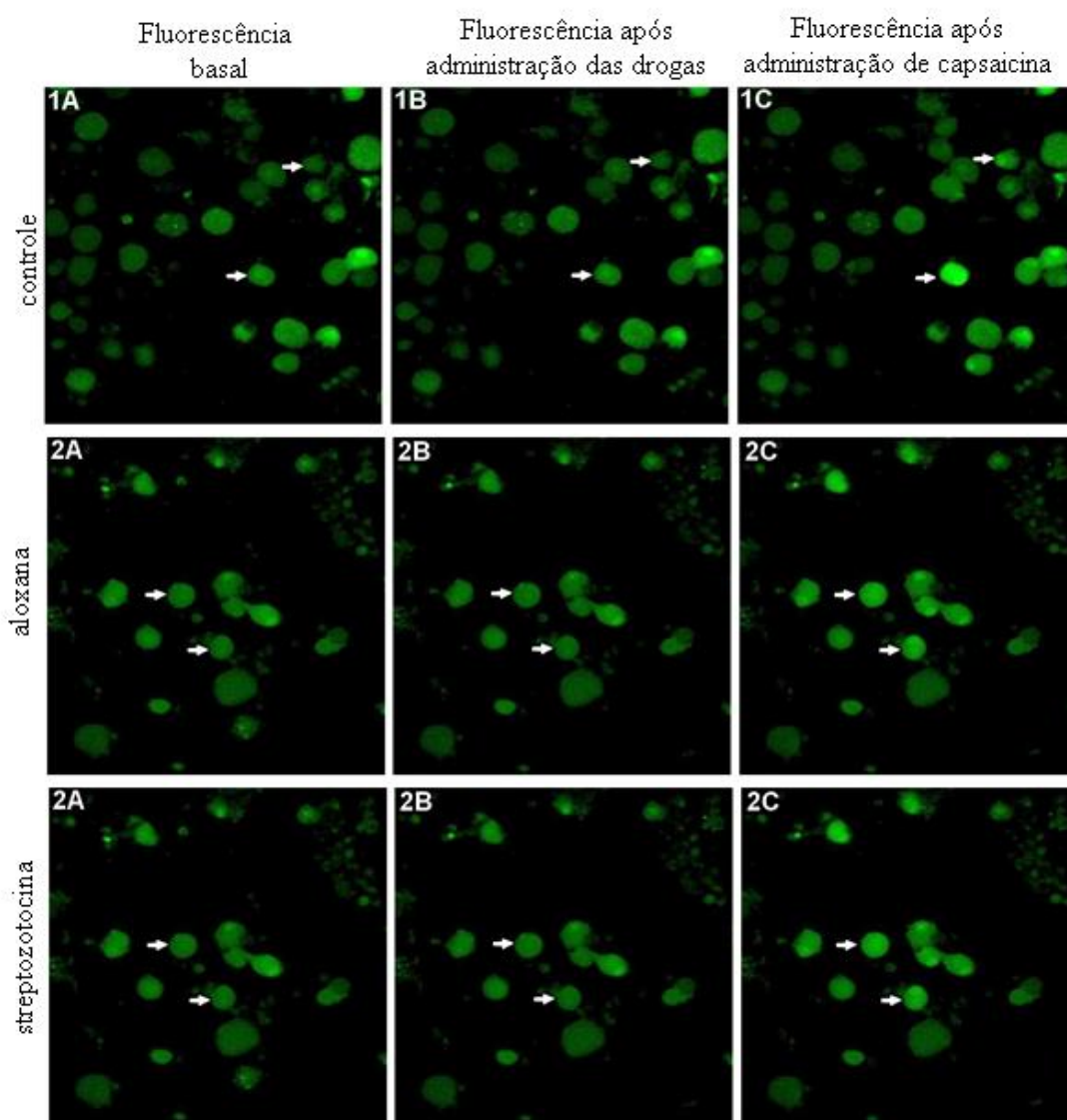


Figura 22: Efeitos da aloxana e estreptozotocina em resposta da capsaicina em cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal. Imagens representativas obtidas por microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando o indicador fluorescente Fluo-3-

AM). A) Fluorescência basal. B) Fluorescência após 03 minutos da administração de Hank's, aloxana ou estreptozocina. C) Fluorescência após 2 minutos da administração de capsaicina. As setas indicam neurônios representativos do aumento de fluorescência. Aumento 400x.

Foram avaliadas as alterações de $[Ca^{2+}]_i$ nos neurônios tratados com veículo, aloxana e estreptozotocina (Figura 23). A administração de Hank's não altera os níveis de Ca^{2+} em nenhuma das células como já era esperado, assim como a administração de aloxana. Por outro lado, o efeito da administração de estreptozotocina causou uma diminuição significativa dos níveis de Ca^{2+} nos neurônios.

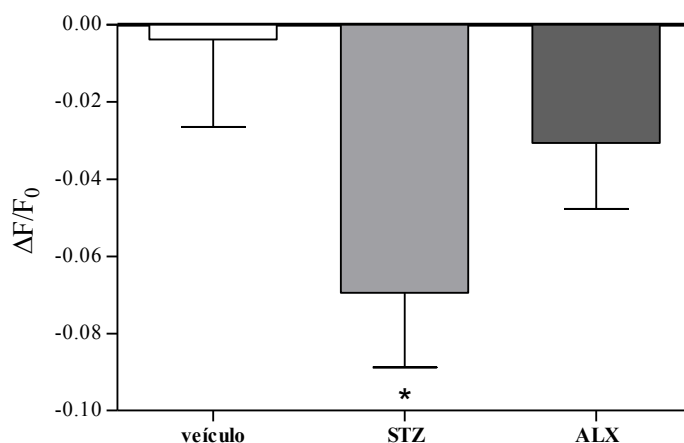


Figura 23: Efeito da aloxana e streptozotocina no influxo de cálcio em neurônios nociceptivos em cultura. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por Fluo-3/AM após 02 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (veículo) ou após administração de aloxana ou estreptozotocina. Dados apresentados como média ± S.E.M de 20 a 25 neurônios. * $p < 0,05$ significativamente diferente com o grupo controle (Dados avaliados por teste t).

Após 3 minutos da aquisição de imagens depois da administração de aloxana ou estreptozotocina, cada placa recebeu capsaicina 100 nM e foi feita aquisição de imagens por 2 minutos. Analisando a variação de fluorescência nas células (Figura 24), observamos que enquanto as células que receberam o veículo e também aloxana apresentaram uma grande variação na fluorescência, indicando um aumento de cálcio intracelular, as células tratadas com estreptozotocina não mostraram grande aumento de cálcio, resposta que foi significativamente diferente do grupo controle.

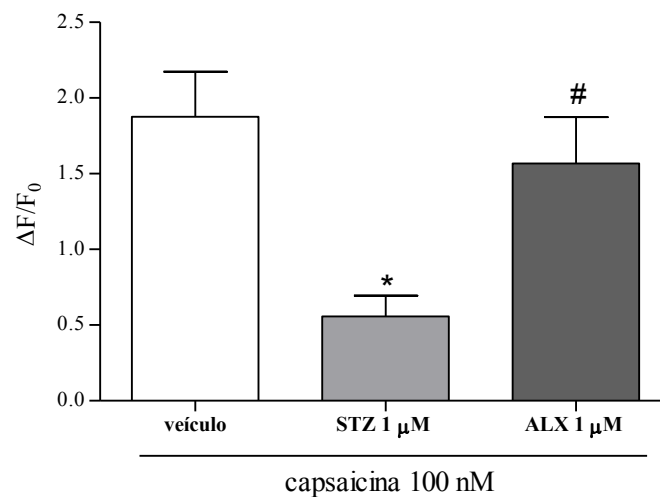


Figura 24: Influxo de cálcio induzido por capsaicina em cultura de neurônios nociceptivos em cultura tratados com aloxana ou estreptozotocina. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por Fluo-3 após 3 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal após a administração de capsaicina (100 nM) em placas contendo solução de Hank's (veículo) ou aloxana ou estreptozotocina. Dados apresentados como média \pm S.E.M de 20 a 25 neurônios. # $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo STZ 1 μ M em relação ao grupo ALX 1 μ M. * $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo STZ 1 μ M em relação ao grupo controle. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

6. Discussão

Diante do aumento da prevalência do diabetes melito, acredita-se que modelos animais de diabetes experimental desempenhem um papel essencial na elucidação da patogênese do diabetes em humanos e de suas complicações (AL-AWAR, 2016). As drogas mais utilizadas para a indução do diabetes experimental são estreptozotocina e aloxana, sendo que a utilização de estreptozotocina prevalece no caso de estudos em roedores. Por outro lado, conforme descrito anteriormente, o uso de estreptozotocina para o estudo de mecanismos envolvidos no desenvolvimento de neuropatia diabética tem sido questionado pelo fato de que esta droga parece alterar o limiar nociceptivo de forma independente da hiperglicemia (ROMANOVSKY, 2004; BISHNOI et al., 2011; CUNHA et al., 2009). O uso de aloxana pode ser uma alternativa melhor para modelos animais de estudo da neuropatia diabética, no entanto, só encontramos um estudo que usa esta droga para indução de diabetes e avaliação de neuropatia (ZHANG et al., 2015). Este estudo objetivou comparar o efeito de aloxana e estreptozotocina como agentes indutores do diabetes para estudos de mecanismos envolvidos na neuropatia diabética. Foram realizados experimentos *in vivo*, avaliando-se efeitos sistêmicos e locais das duas drogas e *in vitro* avaliando-se o efeito das duas drogas sobre os níveis intracelulares de cálcio em neurônios nociceptivos em cultura. Os resultados sugerem que ambas as drogas têm efeito equivalente na indução de diabetes, mas streptozotocina parece ter um efeito direto nos neurônios nociceptivos e que este efeito pode dificultar estudos utilizando esta droga.

Para a realização desse trabalho, devido às semelhanças clínicas, laboratoriais e histológicas com o diabetes em humanos, optou-se por utilizar ratos Wistar. Outro fator considerado, é que os ratos possuem um ciclo de vida curto, permitindo o estudo de processos degenerativos e crônicos em um menor espaço de tempo, ou seja, dessa forma é possível analisar os efeitos crônicos do diabetes, mediante à evolução natural de animais saudáveis da mesma espécie e idade, possibilitando assim, a avaliação dos efeitos deletérios da hiperglicemia crônica do diabetes. Além disso, foi visto que os ratos são os animais mais utilizados em modelos experimentais de diabetes induzido por injeção de aloxana ou estreptozotocina (DAS et al., 2012; OLIVEIRA, 2015; SAMARGHANDIAN et al. 2016; CUNHA et al., 2017; DHANANJAYAN et al., 2017; HOSSEINI et al., 2017; RAHIMI-MADISEH et al., 2017; KOLSI et al., 2017; RAMADAN et al., 2017; CHERBAL et al., 2017; AL MAMUN et al., 2017).

No presente estudo, para a indução do diabetes experimental, os animais foram submetidos a uma injeção única de aloxana ou estreptozotocina por via intravenosa. Os animais que desenvolveram hiperglicemia, apresentaram sinais típicos do diabetes: polidipsia (aumento da ingestão hídrica), poliúria (aumento da frequência urinária), perda de peso (devido à perda

de massa magra), astenia (fraqueza, devido à incapacidade de utilizar glicose como fonte de energia). Embora não tenham sido quantificados, todos esses fatores foram verificados, indicando que os tratamentos com as drogas foram capazes de induzir as alterações metabólicas típicas da doença. Já os animais que foram tratados com as mesmas doses dos agentes indutores, mas que permaneceram normoglicêmicos, aparentemente mantiveram-se saudáveis. O ganho de peso destes animais ao longo das semanas avaliadas não foi diferente do controle. Deste modo, os resultados apresentados são compatíveis com os com os achados da literatura (LERCO et al., 2003; CAVALLI et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007, DELFINO et al. 2002), indicando que aloxana e estreptozotocina são capazes de refletir os sintomas do diabetes em humanos, caracterizando o diabetes experimental animal.

Nos animais hiperglicêmicos, a glicemia estava alta após 48 horas da indução e permaneceu alta durante todo o experimento. A glicemia observada durante as três semanas avaliadas foi semelhante nos grupos de animais hiperglicêmicos tratados com estreptozotocina ou aloxana. Estes valores glicêmicos não foram excessivamente altos de forma que os animais tiveram uma boa sobrevida e não necessitaram tratamento com insulina. Estes resultados sugerem que parte da função das células beta-pancreáticas foi preservada. Ocorreu óbito de apenas dois animais tratados com aloxana e estes animais apresentavam uma glicemia mais alta em relação aos demais.

A dose de aloxana e estreptozotocina escolhida para os experimentos foi determinada através de experimentos prévios. Para este estudo, escolhemos uma dose intermediária de forma a obter animais que desenvolveram o diabetes (hiperglicemia) e animais que se mantiveram normoglicêmicos. Deste modo, foi possível avaliar a dependência da glicemia nas alterações comportamentais avaliadas. Em muitos estudos que avaliam a hipernocicepção associada à hiperglicemia os animais que não desenvolvem diabetes são excluídos dos grupos experimentais (ROMANOVSKY, 2004).

No presente estudo, alterações na sensibilidade mecânica foram avaliados através do teste de von Frey eletrônico. Os resultados indicam que a estreptozotocina causa maior alteração na sensibilidade mecânica nos animais, visto que houve diferença estatística apenas na primeira e quinta semana, quando comparados com o grupo controle, nos animais hiperglicêmicos tratados com estreptozotocina. Interessante notar que a curva de sensibilidade apresentada pelo grupo de animais tratados com estreptozotocina e que permaneceram normoglicêmicos é muito semelhante àquela dos animais hiperglicêmicos. Uma maior variação nos resultados deste grupo, associada ao número de animais, provavelmente impede uma significância estatística. Diante disto, será necessário um aumento do número de animais nos grupos experimentais para

publicação em revistas especializadas. Não foi possível realizar estes experimentos a tempo para a defesa desta dissertação. Ainda assim, podemos observar que os animais diabéticos tratados com aloxana apresentam uma tendência de aumento de sensibilidade mecânica que foi crescente ao longo das cinco semanas de teste, diferente ao observado no grupo de animais diabéticos tratados com estreptozotocina que apresentaram aumento de sensibilidade mecânica significativa logo na primeira semana após indução. Considerando que a glicemia dos animais nestes dois grupos foi semelhante, estes resultados indicam um efeito possivelmente direto da estreptozotocina sobre a sensibilidade mecânica dos animais.

O tempo necessário para desenvolvimento da neuropatia diabética parece variar bastante de acordo com o modelo empregado. Em estudo de Romanovsky (2004), os animais tratados com estreptozotocina que se mantiveram hiperglicêmicos apresentaram uma diminuição de 15-20% no limiar de sensibilidade após 3-4 dias de indução esta alteração se manteve ao longo de todo período experimental, que durou 36 dias. Dois estudos (Bishnoi e col. 2011, Alghren e Levine, 1994) observaram que os animais hiperglicêmicos desenvolveram alodinia mecânica apenas na quarta semana após a indução do diabetes (BISHNOI et al., 2011; AHLGREN e LEVINE, 1994). Utilizando o teste de pressão crescente, Randall & Selito, Beyreuther e colaboradores (2006) verificaram que animais diabéticos desenvolveram hiperalgesia mecânica 21 dias após a indução (BEYREUTHER et al., 2006). Em todos estes estudos, o diabetes experimental foi induzido pela injeção de estreptozotocina.

Em relação à sensibilidade mecânica, assim como nos animais hiperglicêmicos, o efeito de aumento de sensibilidade foi observado nos animais normoglicêmicos após a injeção das drogas diabetogênicas. Esses dados corroboram com estudos de Romanovsky (2004) e Bishnoi et al. (2011), que verificaram que o uso de estreptozotocina também provocou um aumento na sensibilidade mecânica independente do estado glicêmico do animal. Além destes, Cunha e colaboradores (2009) avaliaram 3 diferentes doses de estreptozotocina (10, 20 e 40 mg/kg) e constataram que apenas a maior dose foi capaz de induzir um aumento significativo no nível glicêmico dos animais, entretanto, todos os animais tratados com estreptozotocina (hiperglicêmicos ou não) desenvolveram hiperalgesia mecânica.

Além das alterações na sensibilidade mecânica, as alterações na sensibilidade térmica também são comuns na neuropatia diabética, tanto em humanos quanto em modelos animais (SBD, 2016; BISHNOI et al., 2011). Em vários estudos utilizando estreptozotocina para a indução do diabetes experimental foram observadas respostas inalteradas, exacerbadas ou reduzidas quanto a estímulos térmicos também iniciada em dias alternados (MORGADO e TAVARES et al., 2007; FUCHS et al., 2010; BEYREUTHER et al., 2006; PABREJA et al.,

2011). No presente estudo, o teste de imersão de cauda foi utilizado para avaliar a sensibilidade térmica, mas não foram observadas grandes alterações entre os grupos de animais.

Devido à dificuldade em realizar a dosagem de insulina, no presente estudo, os animais normoglicêmicos foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose de forma a avaliar indiretamente a função das células beta pancreáticas na produção de insulina e também com o intuito de descartar a influência de um estado de pré- diabetes na sensibilidade mecânica induzida pelas drogas. Embora não possamos afirmar com certeza, o resultado sugere que tanto os grupos tratados com aloxana, como os grupos tratados com estreptozotocina possam estar com um comprometimento no metabolismo da glicose, indicando uma falha na secreção de insulina, mas não o suficiente para causar diabetes.

Cunha e colaboradores (2009) verificaram que o tratamento da insulina não evitou o desenvolvimento da sensibilidade mecânica em animais diabéticos, sugerindo que esta condição não é exclusivamente dependente da hiperglicemia. Em contrapartida, há estudos que demonstram que a hiperalgesia induzida por estreptozotocina é associada à hiperglicemia, visto que o seu desenvolvimento foi prevenido pelo tratamento com insulina, sugerindo que é baixa a possibilidade de que a hiperalgesia ocorra por um efeito direto da estreptozotocina (COURTEIX et al., 1996; CALCUTT et al., 1997; ZHUANG et al., 1997; ALEY e LEVINE, 2001; BRUSSEE et al., 2004). Os resultados obtidos no presente estudo, apesar de não ter sido administrada a insulina, sugerem que o efeito da estreptozotocina não depende de insulinopenia. Isto porque a administração de aloxana induziu hiperglicemia de forma muito similar àquela causada pela injeção de estreptozotocina. Além disso, ambas as drogas tiveram efeito similar no teste oral de tolerância à glicose. Portanto, as avaliações da glicemia em relação às respostas comportamentais de sensibilidade mecânica sugerem um efeito direto da estreptozotocina mas não da aloxana.

No presente estudo foi demonstrado uma queda no limiar de sensibilidade mecânica dos animais normoglicêmicos durante a primeira semana de tratamento e no mesmo período, a glicemia desses animais estava aumentada em relação aos controles. Alguns estudos sugerem que tanto a hiperglicemia (ROMANOVSKY et al., 2004; VINCENT et al., 2004), quanto a insulinemia (excesso de insulina no sangue) ou insulinopenia (falta de insulina no sangue) (ROMANOVSKY et al., 2006; BRUSSEE et al., 2004), podem intervir de modo direto sobre os neurônios sensoriais, possivelmente alterando o limiar de excitabilidade neural, contribuindo para um estado de hiperalgesia. No entanto, novamente, como a aloxana causou alteração de glicemia igual à estreptozotocina, enquanto que apenas a estreptozotocina induziu alteração de

sensibilidade, é improvável que o efeito depende da diminuição nos níveis de insulina nos animais.

Ainda no estudo de Cunha e col. (2009) verificou-se que a administração local de estreptozotocina na pata do animal é capaz de induzir um aumento de sensibilidade mecânica o que indica um efeito direto da droga em alterar esta sensibilidade. Para avaliar se a aloxana também apresenta efeito local, foram realizadas injeções locais de aloxana ou estreptozotocina no tecido plantar subcutâneo dos animais. Tanto a administração de estreptozotocina como de aloxana foram capazes de induzir sensibilidade mecânica, que foi resolvida em 24 horas após os tratamentos. Além disso, ambas as substâncias causaram edema na pata dos animais, o que indica que tanto estreptozotocina quanto aloxana induzem uma resposta inflamatória no tecido periférico. O aumento de sensibilidade observado nos animais após injeção local na pata é, provavelmente indireto e não está relacionado à alteração de sensibilidade observada nos experimentos de administração sistêmica para indução de diabetes experimental. Por este motivo, para tentar avaliar um efeito direto, foi realizado experimento com administração de estreptozotocina e aloxana diretamente no gânglio da raiz dorsal (no nível L5 direito) e foram avaliadas as sensibilidades mecânicas nas patas dos animais. Embora não tenha sido possível para o momento a realização de uma curva dose resposta, a administração da mesma dose das duas substâncias produziu um aumento de sensibilidade mecânica. No entanto, a administração de estreptozotocina induziu um efeito de maior intensidade quando comparado ao grupo que recebeu tratamento com aloxana. Assim, este resultado sugere novamente que estreptozotocina pode atuar diretamente sobre os neurônios nociceptivos, enquanto que a aloxana parece ter um efeito direto menos importante.

Foi observado em alguns estudos que em modelos animais de diabetes, onde os animais desenvolveram neuropatia diabética e demonstraram hiperalgesia, foi constatado um aumento da expressão e função do TRPV1 (CATERINA et al., 2001; KAMEI et al., 2001; HONG E WILEY, 2005). O receptor TRPV1 é um canal de cátions seletivo a permeabilização de cálcio e são encontrados predominantemente em fibras C e ativados por calor moderado e por capsaicina (LAING E DHAKA, 2016). Quando estão ativados esses receptores permitem um influxo de sódio e cálcio que inicia a geração de potenciais de ação nas fibras nociceptivas (PURVES et al., 2010).

Andersson e col. (2015) sugerem que estreptozotocina exerce um efeito direto sobre os neurônios nociceptivos de camundongos uma vez que em seus estudos foi verificado um aumento significativo da amplitude da corrente mediada por TRPV1 e influxo de Ca^{2+} em culturas primárias de DRG. Nesse estudo os autores concluem que outros modelos, que não o

diabetes induzido por estreptozotocina, devem ser utilizados para o estudo dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética (ANDERSSON et al., 2015). Pabbidi e colaboradores (2008), utilizando cultura de células do gânglio da raiz dorsal e técnicas de eletrofisiologia, demonstraram que as correntes alteradas para TRPV1 estão correlacionadas com a sensibilidade alterada ao estímulo térmico em animais diabéticos, sugerindo que os receptores TRPV1 possuem um papel importante na hiperalgesia ao calor em animais diabéticos tratados com estreptozotocina. (PABBIDI et al., 2008). De forma semelhante, o estudo de Bisnhoi et al. (2011), confirmaram um aumento significativo da amplitude da corrente mediada por TRPV1 induzida por capsaicina e influxo de Ca^{2+} , indicando que a STZ tem ação direta sobre os neurônios e modula a expressão e função do canal de íons nociceptivo TRPV1 (BISNHOI et al., 2011)

Com o intuito de avaliar se estreptozotocina e aloxana podem atuar sobre a função de receptores TRPV1, foram realizados experimentos em culturas primárias de GRD e a dinâmica de cálcio intracelular avaliada através da fluorescência emitida por incubação com Fluo-3AM. Durante a aquisição de imagens, foi inicialmente avaliado o papel da administração de estreptozotocina ou aloxana sozinhas e em seguida por administrado o agonista capsaicina. Observamos que a estreptozotocina por si induziu uma diminuição nos níveis de cálcio intracelular nos neurônios nociceptivos e que a resposta à capsaicina também foi diminuída nas culturas tratadas com estreptozotocina. Nas placas tratadas com aloxana não houve alteração nos níveis de cálcio e na resposta à capsaicina quando comparado às placas controle. Estes resultados mostram um efeito direto e agudo da estreptozotocina sobre os neurônios nociceptivos. Além disso, é provável que o efeito sobre a resposta à capsaicina não dependa de um efeito direto sobre o receptor TRPV1, visto que a estreptozotocina sozinha causou uma diminuição nos níveis de cálcio. A alteração de cálcio intracelular induzida por estreptozotocina sugere que esta substância possivelmente seja capaz de entrar nos neurônios através do transportador de glicose

Buscando entender as alterações específicas de células induzidas por estreptozotocina, Biswas e colaboradores (2017) verificaram, em neurônios e astrócitos, uma diminuição na expressão dos transportadores de glicose (GLUT 1 e 3), tendo como resultado uma diminuição significativa na captação de glicose em ambas as células. Além disso, o mesmo estudo mostrou que a exposição a droga, causou um declínio significativo na viabilidade celular e aumentou a citotoxicidade das células (BISWAS et al., 2017). Portanto, considerando os resultados obtidos neste estudo e em outras culturas neuronais, é provável que a estreptozotocina seja capaz de acessar as células através dos transportadores de glicose neuronais. O tratamento com aloxana

não causou alteração nos níveis intracelulares de cálcio e nem alterou a resposta à capsaicina. No entanto, não podemos descartar a hipótese de esta droga possa entrar nos neurônios através dos transportadores para glicose. Não foram encontrados estudos avaliando diretos de aloxana em neurônios. Embora não seja possível estabelecer o mecanismo responsável pela diminuição nos níveis de cálcio induzido por estreptozotocina em neurônios nociceptivos, o resultado obtido é suficiente para evidenciar um efeito direto desta substância nestes neurônios. Visto que a administração de estreptozotocina é utilizada com a finalidade de indução de diabetes por ação seletiva em células beta pancreáticas, o efeito direto em neurônio não é desejável, independente de qual for a alteração causada nestas células. Os resultados obtidos com os experimentos *in vitro*, assim como aqueles realizados *in vivo*, sugerem que a aloxana pode ser uma alternativa para o estudo de neuropatia diabética, considerando que a aloxana, na concentração testada, não causou alteração nos níveis intracelulares de cálcio basais e em resposta à capsaicina nos neurônios nociceptivos.

Em resumo, o presente trabalho sugere que aloxana e estreptozotocina são igualmente eficientes na indução de diabetes experimental em ratos. No entanto, a estreptozotocina induz alterações na sensibilidade mecânica dos animais de forma independente da glicemia. Ainda, experimento realizado através de injeção intraganglionar das duas drogas e experimento *in vitro* evidenciaram efeitos diretos da estreptozotocina, mas não de aloxana, em neurônios nociceptivos. Deste modo, concluímos que o uso de aloxana para estudos envolvendo os mecanismos da neuropatia diabética é uma melhor alternativa ao uso de estreptozotocina como agente químico indutor de diabetes experimental.

7. Conclusão

- A aloxana e estreptozotocina são equivalentes na indução de hiperglicemia em ratos.
- A administração sistêmica de estreptozotocina causa maior alteração na sensibilidade mecânica dos animais, independente da condição glicêmica, ao ser comparado com a aloxana, indicando um possível efeito direto da estreptozotocina.
- Alterações nos níveis de insulina não explicam a alteração de sensibilidade detectada nos animais normoglicêmicos que receberam tratamento com estreptozotocina, visto que a curva glicêmica foi igual nos animais tratados com estreptozotocina e com aloxana.
- A administração local periférica de aloxana ou estreptozotocina induz resposta inflamatória em tecido periférico, a qual não está relacionada ao efeito direto destas drogas na sensibilidade nociceptiva.
- A administração intraganglionar de aloxana e estreptozotocina sugere um efeito hipernociceptivo direto apenas de estreptozotocina.
- A administração de aloxana e estreptozotocina em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de ratos mostrou um efeito direto apenas da estreptozotocina, alterando a $[Ca^{2+}]_i$ em neurônios nociceptivos.

Os dados indicam que aloxana é uma melhor alternativa que estreptozotocina como agente indutor de diabetes experimental para estudos envolvendo os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de neuropatia diabética.

Referências bibliográficas

- AHLGREN S.C., LEVINE J. D. Protein kinase C inhibitors decrease hyperalgesia and C-fiber hyperexcitability in the streptozotocin-diabetic rat. **J Neurophysiol.** 72(2):684-92.1994. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.2.684>
- AL MAMUN, A. et al. Comparison of the Hypoglycemic, Hypolipidemic and Hepatoprotective Effects of *Asparagus racemosus* Linn. in Combination with Gliclazide and Pioglitazone on Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 8, n. 02, p. 52, 2017. <https://doi.org/10.4236/pp.2017.82004>
- AL-AWAR, A. et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9051426>
- ALBERTI, S. Neuropatia diabética experimental: estudo da condução nervosa motora dos nervos ciático e caudal em ratos com diabetes induzidos pela aloxana. 2007. 83 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/99906>>. Acesso: 04 de junho de 2018.
- ALEY K.O., LEVINE J.D. Rapid onset pain induced by intravenous streptozotocin in the rat. **J Pain** 2: 146-150.2001. <https://doi.org/10.1054/jpai.2001.21592>
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.35, Suppl 1, S64- 71. 2012. <https://doi.org/10.2337/dc12-s064>
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**. 2015; v. 38, Suppl 1,S4:S1-S94, 2015. <https://doi.org/10.2337/dc15-s003>
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA).Standards of medical care in diabetes. Position statement. **Diabetes Care**, v.40(1), p.S1–135, 2017. <https://doi.org/10.2337/diacare.29.02.06.dc05-1593>
- ANDERSSON, D. A.; FILIPOVIĆ, M. R.; GENTRY, C.; EBERHARDT, M.; VASTANI, N.; LEFFLER, A.;REEH, P.; BEVAN, S. Streptozotocin stimulates the ion channel TRPA1 directly involvement of peroxynitrite. **The journal of biological chemistry**, v. 290, n. 24, p. 12185-15196, 2015. <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.644476>
- AUTHIER, N. et al. An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. **Exp. Neurol.**, 182: 12-20. 2003. [https://doi.org/10.1016/s0014-4886\(03\)00003-7](https://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00003-7)
- BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista deNutrição**, v.22(1), p.113-24, 2009. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732009000100011>
- BASBAUM, A.I., BAUTISTA, D.M., et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v.139, p. 267 284. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>

BAUTISTA, D.M., SIEMENS, J., et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature**. v. 448, p. 2048. 2007. <https://doi.org/10.1038/nature05910>

BERTELSMANN, F. W.; HEIMANS, J. J.; VAN ROOY, J. C.; DANKMEIJER, H. F.; VISSER, S. L.; VAN DER VEEN, E. A. Peripheral nerve function in patients with painful diabetic neuropathy treated with continuous subcutaneous insulin infusion. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 50, n. 10, p. 1337-1341, 1987. <https://doi.org/10.1136/jnnp.50.10.1337>

BEYHEUTHER, B.; CALLIZOT, N.; STÖHR, T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in a rat model for painful diabetic neuropathy. **European Journal of Pharmacology**, v. 539, p.64-70, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.04.009>

BISHNOI, M.; BOSGRAAF, C. A.; ABOOJ, M; ZHONG, L.; PRAMKUMAR, L. S. Streptozotocin induced early thermal hyperalgesia is dependent of glycemic stste of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. **Molecular Pain**, v. 7, n. 52, 2011. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-52>

BISWAS, J.; GUPTA, S.; VERMA, D.V.; SINGH, S. Streptozotocina altera transporte de glicose, expressão de connexin e funções de reticulom endoplasmático em neurons e astrocitos. **Neuroscience**, 356: 151–166. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.018>

BORDIN, D. L. et al. DNA alkylation damage and autophagy induction. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 753, n. 2, p. 91-99, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.001>

BORGOHAIN, M. P. et al. Renoprotective and antioxidative effects of methanolic *Paederia foetida* leaf extract on experimental diabetic nephropathy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 451-459, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.035>

BRAZ, N. I. **A insulina e o cérebro: da função à disfunção**. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal. 2015.

BRIAN C CALLAGHAN, HSINLIN T CHENG, CATHERINE L STABLES, ANDREA L SMITH, EVA L FELDMAN. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. **Lancet Neurol**, 11: 521–34, 2012. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(12\)70065-0](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(12)70065-0)

BRUNTON, L. L. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. Editora McGraw Hill, 12ª ed., 2012.

BRUSSEE V., CUNNINGHAM F.A., ZOCHODNE D.W. Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy. **Diabetes**. 53:1824–1830. 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.7.1824>

CALCUTT N.A., JORGE M.C., YAKSH T.L., CHAPLAN S.R. Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. **Pain**. 68: 293-299. 1996. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(96\)03201-0](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(96)03201-0)

CAMERON, N.E., TUCK, Z., McCABE, L., COTTER, M.A. Effects of the hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, on peripheral nerve tissue perfusion, conduction velocity and nociception in experimental diabetes. **Diabetologia**, v.44, p.1161-9, 2001. <https://doi.org/10.1007/s001250100626>

CATERINA, M.J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Rev. Neurosci.** 24:487-517, 2001. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.487>

CAVALLI V.L.L.O., SORDI C., TONINI K., GRANDO A., MUNERON T., GUIGI A., ROMAN JÚNIOR W.A. Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill). **Rev. Bras. Farmacogn.** 17(1):64-70. 2007. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2007000100014>

CEFALU, W.T. Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. **ILAR Journal**, 47,186-198. 2006. <https://doi.org/10.1093/ilar.47.3.186>

CHERBAL, A. et al. Antidiabetic and hypolipidemic activities of Algerian *Pistachia lentiscus* L. leaves extract in alloxan-induced diabetic rats. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 157-162, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.10.024>

CHRISTOPH, T.; VRY, J. DE; TZSCHENTKE, T.M. Tapentadol, but not morphine, selectively inhibits disease-related thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 470, p. 91-4, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.020>

COHEN G., HEIKKILÄ R. E. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6- hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. **J Biol Chem.** 249:2447–2452, 1974. <https://doi.org/10.1126/science.181.4098.456>

COURTEIX C., BARDIN M., MASSOL J., FIALIP J., LAVARENNE J., ESCHALIER A. Daily insulin treatment relieves long-term hyperalgesia in streptozotocin diabetic rats. **Neuroreport**. 7: 1922-1924. 1996. <https://doi.org/10.1097/00001756-199608120-00010>

CUNHA, A. P. et al. Polysaccharides from *Caesalpinia ferrea* seeds—Chemical characterization and anti-diabetic effects in Wistar rats. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 68-76, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.039>

CUNHA, J. M.; FUNEZ, M. I. CUNHA, F. Q.; PARADA, C. A. FERREIRA, S.H. Streptozotocin-induced mechanical hypernociception is not dependent on hyperglycemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological research**. v. 42, p. 197-206, 2009. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2009000200008>

DAS, J. et al. Taurine exerts hypoglycemic effect in alloxan-induced diabetic rats, improves insulin-mediated glucose transport signaling pathway in heart and ameliorates cardiac oxidative stress and apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 2, p. 296-308, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.009>

DAVIS, K. D. POPE, G. E. Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. **Pain**, v. 98, n. 1-2, p. 179-185, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(02\)00043-x](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00043-x)

DELFINO, V. D. A.; FIGUEIREDO J. F.; MATSUO T.; FAVERO M.E.; MATNI A. M.; MOCELIN A. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24, n. 1, p. 31-6, 2002.

DHANANJAYAN, I. et al. Ameliorating effect of betanin, a natural chromoalkaloid by modulating hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities and glycogen content in streptozotocin–nicotinamide induced experimental rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1069-1079, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.146>

DOBRETISOV, M.; ROMANOVSKY, D.; STIMERS, J. R. Early diabetic neuropathy: Triggers and mechanisms. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 2, p. 175-19. Beijing, 2007. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i2.175>

ELEAZU, C.O et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 60, 2013. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-60>

ELSNER, M., GULDBAKKE, B., TIEDGE, M., MUNDAY, R., & LENZEN, S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia**, 43, 1528-1533.2000. <https://doi.org/10.1007/s001250051564>

FEIN, ALAN. Nociceptores: As Células que sentem dor. Ribeirão Preto: Dor On Line, 2011. Disponível em: <http://www.dol.inf.br/nociceptores>>Acesso em: 01 ago. 2018.

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., F. Q. CUNHA, et al. A novel technique to perform direct intraganglionar injections in rats. **J Neurosci Methods**, v.159, n.2, p.236-43. 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>

FU, Z. et al. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 9, n. 1, p. 25-53, 2013. <https://doi.org/10.2174/157339913804143225>

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. Farmacologia Clínica. Editora Guanabara Koogan, 3a edição, 2010.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ºed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HASANEIN, P. Effects of histamine H3 receptors on chemical hyperalgesia in diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 60, p. 886-91, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.004>

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. *J. Biol. Chem.* 279,29341 -29350. 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.m404167200>

HOSSEINI, Azar et al. Effects of a standardized extract of *Rheum turkestanicum* Janischew root on diabetic changes in the kidney, liver and heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 86, p. 605-611, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.059>

IKEDA, T. *et al.* Effects of intrathecal administration of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. *Neuroscience Research*, v. 63, p. 42-6, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.10.002>

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas Executive Summary. 7a ed. 2015. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>>. Acesso em: 20 de julho de 2018.

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.

ISLAM, M. et al. Streptozotocin is more convenient than Alloxan for the induction of Type 2 diabetes. *International Journal of Pharmacological Research*, v. 7, n. 1, p. 06-11, 2017.

ISLAM, M.D. Animal Models of Diabetic Neuropathy: Progress Since. **Hindawi Publishing Corporation Journal of Diabetes Research** Volume. 149452. 1960 <https://doi.org/10.1155/2013/149452>

IYNEDJIAN, P. B. Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 27-42. 2009. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8322-9>

JAVED, S. PETROPOULOS, L. N., ALAM, U., MALIK, R. A. Treatment of painful diabetic neuropathy. *Ther adv chronic dis*, v. 6, n. 1, p. 15-29, 2015. <https://doi.org/10.1177/2040622314552071>

JULIUS, D.; A.I. BASBAUM. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v.413, p.203-10, n. 6852. 2001. <https://doi.org/10.1038/35093019>

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>

KAMEI, R.; KADOKURA, M.; KITAGAWA, Y.; HAZEKI, O.; OIKAWA, S. 2'-Benzyloxychalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci.*, v. 73, p. 2091-2099, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00563-0](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00563-0)

KOLSI, Riha Ben Abdallah et al. Effects of *Cymodocea nodosa* extract on metabolic disorders and oxidative stress in alloxan-diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 257-267, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.032>

KR, S. G. et al. Mechanism of DNA binding and cleavage. **Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.

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>

LAING, R.J.; DHAKA, A. ThermoTRPs and Pain. **Neuroscientist**. Apr; 22(2): 171–187. 2016. <https://doi.org/10.1177/1073858414567884>

LEE, J. H.; McCARTY, R. Glycemic control of pain threshold in diabetic and control rats. **Physiol Behav**, v. 47, n. 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)

LENZEN S., PANTEN U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia** 31:337–342, 1988. <https://doi.org/10.1007/bf02341500>

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia, Berlin**, v. 51, p. 216–226, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7>

LERCO, MAURO M., et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n.2. 2003. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502003000200010>

LEYBAERT, L., DE BOCK, M., VAN MOORHEM, M., DECROCK, E., AND DE VUYST, E. Neurobarrier coupling in the brain: adjusting glucose entry with demand. **J. Neurosci. Res.** 85, 3213–3220. 2007. <https://doi.org/10.1002/jnr.21189>

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>

LOESER, J.D., TREEDE R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v.137, n.3, p. 473-477, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>

LOVELACE R. E. Experimental neuropathy in rats made diabetic with alloxan. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**. vol. 25, no. 4, p. 399, 1968.

- MACHADO, J.L.M., Caracterização de um modelo experimental de neuropatia em ratos diabéticos induzidos pela aloxana. **Acta Cirúrgica Brasileira**. Sociedade Brasileira para o Desenvolvimento da Pesquisa em Cirurgia, v. 15, n. 2, p. 00-00, 2000. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502000000200003>
- MAHER, F., VANNUCCI, S, J., SIMPSON, I. A. Glucose transporter proteins in brain. **FASEB J** 8:1003–1011. 1994. <https://doi.org/10.1096/fasebj.8.13.7926364>
- MILLAN, M.J., The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, 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.
- MORGADO, C., PINTO-RIBEIRO, F., TAVARES, I. DIABETES affects the expression of GABA and potassium chloride cotransportes in the spinal cord: a study in streptozotocin diabetic rats. **Neurosci Lett**. 438:102-6, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.04.032>
- MUECKLER, M., THORENS, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. **Mol Aspects Med**. 34:121–138. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001>
- MUNDAY, R. Dialuric acid autoxidation: effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of —active oxygen species. **Biochemical pharmacology**, 37, 409-413. 1988. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90207-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90207-9)
- 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.
- NAHID, S. et al. Cardio-and hepato-protective potential of methanolic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels seeds: A diabetic rat model study. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 2, p. 126-133, 2017.
- NECKER, R.; HELLON, R. F. Noxious thermal input from the rat tail: Modulation by descending inhibitory influences. **Pain**. 4:231–242,1978. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90135-x](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90135-x)
- NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev Bras Cienc Farm**, 41, 121-142, 2005. <https://doi.org/10.1590/s1516-93322005000200002>
- NUKATSUKA M., YOSHIMURA Y., NISHIDA M., KAWADA J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. **J Endocrinol** 127: 161-165, 1990. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1270161>
- OBERLEY LW. Free radicals and diabetes. **Free Radic Biol Med**. 5:113–124, 1988. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90036-6)
- OLIVEIRA, L.M. DORES. In: Lente, R. **Neurociência da Mente e do Comportamento**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan. Cap 8, p. 183-201, 2008.

OLIVEIRA, M. C. M. **Caracterização do extrato aquoso de alpiste (*Phalaris canariensis* L.) e avaliação dos efeitos antioxidantes e hipoglicemiantes**. 284 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 2015.

PABBIDI, R.M. et al. Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity. **Molecular Pain**, v. 4, n. 9, p. 1-17, 2008. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-9>

PABREJA, K. *et al.* Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 661, p. 15-21, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.014>

PATRÍCIO, R. CABRAL, S.; PINTO, I. C.; PEREIRA, O. R. **Diabetes mellitus na comunidade do Instituto Politécnico de Bragança: caracterização e conhecimentos**. In: II Congresso Internacional da Saúde Gaia Porto: Livro de Atas. Instituto Politécnico do Porto, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto. p. 56-60. 2015.

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

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais. OTERO, P. E. São Paulo: Interbook, p. 30-74, 2005.

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.

PRESTON, G. M. Peripheral neuropathy in the alloxan-diabetic rat. **Journal of Physiology**. vol. 189, no. 2, 1967. <https://doi.org/10.1093/med/9780190298357.003.0016>

PURVES, D. et al. **Neurociências**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 10, p. 231-250, 2010.

PUYO, S et al. From old alkylating agents to new minor groove binders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, n. 1, p. 43-61, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.07.006>

RAAFAT, K. M.; AMAL G. O. Phytotherapeutic activity of curcumin: Isolation, GC-MS identification, and assessing potentials against acute and subchronic hyperglycemia, tactile allodynia, and hyperalgesia. **Pharmaceutical biology**, vol. 54, no. 8, 1334-1344, 2016. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1077463>

RADENKOVIC, M., STOJANOVIĆ M., JANKOVIĆ R., TOPALOVIĆ M., STOJILJKOVIĆ M. Effects of diabetes and vascular occlusion on adenosine-induced relaxant response of rat common carotid artery. **Pharmacol Rep**. 65(3):632-41. 2013. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71040-5](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71040-5)

RADENKOVIĆ, M et al. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 78, p. 13-31, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>

RAHIMI-MADISEH, M. et al. Effect of hydroalcoholic *Allium ampeloprasum* extract on oxidative stress, diabetes mellitus and dyslipidemia in alloxan-induced diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 363-367, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.028>

RAMADAN, B. K. et al. Hypoglycemic and pancreatic protective effects of *Portulaca oleracea* extract in alloxan induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 37, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1530-1>

RAMSEY, I.S., DELLING, M., CLAPHAM, D.E. An introduction to TRP channels. **Annu. Rev. Physiol.** v. 68, p. 619-647. 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>

RIBEIRO, C.; OLIVEIRA C.A.M.; MELLO M.A.R. Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos. **Motriz.** ;13(1):72-7. 2007.

ROMANOVSKY D.; HASTINGS S.L.; STIMERS J.R.; DOBRETISOV M. Relevance of hyperglycemia to early mechanical hyperalgesia in streptozotocin induced diabetes. **J Peripher Nerv Syst**, v. 9, p. 62-69, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1085-9489.2004.009204.x>

ROTHER, K. I. Diabetes tratamento- colmatar a divisão. **A Nova Inglaterra j de medicina.** 356: 1499-501. 2007. <https://doi.org/10.1056/nejmp078030>

RUTTER, G. A. et al. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. **Biochemical Journal**, v. 466, n. 2, p. 203-218, 2015. <https://doi.org/10.1042/bj20141384>

SAID, G. Diabetic neuropathy-a review. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 3, n. 6, p. 331-340, 2007. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0504>

SALEH, F. A. et al. Hypoglycemic effects of *Prunus cerasus* L. pulp and seed extracts on Alloxan-Induced Diabetic Mice with histopathological evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 870-877, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.155>

SALGADO, P.P.C.A. Prevalência e fatores associados à nefropatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Crocin attenuate Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in streptozotocin-induced diabetic rat aorta. **Cytokine**, v. 88, p. 20-28, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.002>

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, v. 148, n. 5, p. 852-871, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>

SARGIS, R. M. The hijacking of cellular signaling and the diabetes epidemic: mechanisms of environmental disruption of insulin action and glucose homeostasis. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 38, n. 1, p. 13-24, 2014. <https://doi.org/10.4093/dmj.2014.38.1.13>

SCHAIBLE, H. G. Pathophysiology of pain. **Orthopade.** v. 36, n. 1, p. 8-16, 2006.

SCHREIBER, A. K., NONES, C. F. M., REIS, R., CHICHORRO, J. G., CUNHA, J. M. Diabetic neuropathic pain: physiopathology and treatment. **World J Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 432-444, 2015. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.432>

SIMPSON, I. A., CARRUTHERS, A., AND VANNUCCI, S. J. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1766–1791. 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600521>

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.

SOFUE M., YOSHIMURA Y., NISHIDA M., KAWADA J. Uptake of nicotinamide by rat pancreatic beta cells with regard to streptozotocin action. **J Endocrinol** 131: 135-138, 1991. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1310135>

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overreview. **Ageing Research Reviews**, v 12, p 376-390, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>

SUGIMOTO, K.; MURAKAWA, Y.; SIMA, A. A. F. Diabetic neuropathy – a continuing enigma. **Diabetes Metab. Res. Rev.** n.16 p. 408-433, 2000. <https://doi.org/10.1097/00006676-198603000-00004>

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, p. 537–546. 2001.

TALIYAN, R.; SHARMA, P.L. Possible mechanism of protective effect of thalidomide in STZinduced- neuropathic pain behavior in rats. **Inflammopharmacology**, v. 20, p. 89-97, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0106-4>

TESFAYE S., BOULTON A.J.M., DICKENSON A.H. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. **Diabetes Care** 36:2456–2465, 2013. <https://doi.org/10.2337/dc12-1964>

TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D.; Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes Metab. Res. Rev.** v. 28, p. 8-14, 2012. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2239>

TURK J., CORBETT J.A., RAMANADHAM S., BOHRER A., McDANIEL M.L. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. **Biochem Biophys Res Commun** 197: 1458-1464, 1993. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2641>

VINCENT, A.M.; RUSSELL, J.W.; LOW, P.; FELDMAN, E.L. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocr Rev**, v. 25, n 4, p. 612-628, 2004. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0019>

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>

WENG, H. R.; LEE, J. I.; LENZ, F. A.; SCHWARTZ, A.; VIERCK, C.; ROWLAND, L.; DOUGHERTY, P. M. Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord. **Neuroscience**, v. 101, p. 393-401, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00368-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00368-7)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes country profiles, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes/country-profiles>> Acesso em 20 de julho de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes Programme, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>> Acesso em 27 de julho de 2018.

ZHANG YI, YANG SHAO-LONG, WANG AI-HONG, SUN ZHI-CHUN, ZHUO YA-FEN, XU YE-TING, HE YU-LING. Protective Effect of Ethanol Extracts of *Herichium erinaceus* on Alloxan-Induced Diabetic Neuropathic Pain in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2015:595480. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/595480>

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain** 16:109-110, 1983. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4)

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 1- Certificado: Comissão de Ética na Utilização de Animais UFU

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 02 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 213/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 087/17

Projeto Pesquisa: "Comparação entre streptozotocina e aloxana como indutores de diabetes experimental para estudos dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética".

Pesquisador Responsável: Celina Monteiro da Cruz Lotufo

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 04 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU
Portaria nº 665/17