

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Avaliação dos efeitos diretos de aloxana e estreptozotocina sobre neurônios nociceptivos em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de ratos

Bruna Moreira Silva Lemos

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Outubro - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação dos efeitos diretos de aloxana e estreptozotocina sobre neurônios nociceptivos em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de ratos

Bruna Moreira Silva Lemos

Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Outubro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação dos efeitos diretos de aloxana e estreptozotocina sobre neurônios nociceptivos em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de ratos

Bruna Moreira Silva Lemos

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Uberlândia, de de

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Avaliação dos efeitos diretos de aloxana e estreptozotocina sobre neurônios nociceptivos em
culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de ratos

Bruna Moreira Silva Lemos

Celina Monteiro da Cruz Lotufo
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Outubro – 2019

*A todos que, como minha mãe, infelizmente lidam
diariamente com a dor e possuem esperança de
um dia poder aliviá-la. Minha luta e busca pelo
conhecimento é por vocês.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus que esteve sempre comigo e me guiou através de minha fé, abrindo portas e dando forças.

Aos meus pais, Durval e Vilma, por todo auxílio, cuidado, incentivo e amor que me motivaram a ir atrás dos meus sonhos.

A toda minha família, em especial a minha querida e amada tia Amália, que me deu um lar, amor e incentivo. Mesmo não estando mais presente, sou eternamente grata.

À minha orientadora Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo pela compreensão, dedicação, paciência e todo conhecimento passado, que só aumentou minha paixão pela área.

Aos amigos do laboratório, Débora, Taís, Paulla, Júlia, Rafaela, e principalmente Maria Vitória e Ronaldo, por toda ajuda e companheirismo para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos professores da graduação, em especial aos professores Luiz Borges Bispo da Silva e Tarciso Tadeu Miguel por me mostrar a farmacologia e me incentivar a pesquisar nesta área.

Aos colegas da graduação por todo companheirismo e compartilhamento de conhecimentos e experiências.

A Universidade Federal de Uberlândia por dar oportunidade e disponibilidade de um ensino de qualidade.

RESUMO

O diabetes melito é uma das complicações mais prevalentes no mundo. Os modelos animais de estudo do diabetes em nível experimental são fundamentais para entender a patogênese do diabetes e de suas complicações crônicas, como a neuropatia diabética. Para a indução do diabetes em ratos, usualmente utilizam-se substâncias como a estreptozotocina ou aloxana, que destroem as células β pancreáticas, produtoras de insulina. A estreptozotocina é a substância mais utilizada nos estudos envolvendo diabetes e, em especial, em estudos relacionados ao desenvolvimento de dor neuropática diabética. Entretanto, há evidências que indicam que a estreptozotocina altera a sensibilidade dolorosa dos animais de maneira independente do estado glicêmico. Estes dados sugerem que o modelo de estreptozotocina pode não ser adequado para o estudo de neuropatia diabética. Por este motivo, em um estudo prévio de nosso grupo, comparamos a sensibilidade nociceptiva em animais tratados com estreptozotocina ou aloxana. Assim como nos estudos de outros autores, também foi verificado que a estreptozotocina parece induzir aumento de sensibilidade dolorosa independente do diabetes. Por outro lado, os animais tratados com aloxana tiveram uma resposta que parece dependente do estado glicêmico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito direto de estreptozotocina e aloxana sobre os neurônios nociceptivos primários, para testar se estas substâncias podem ter efeitos que seriam independentes do diabetes. Para tanto, foram utilizadas culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de ratos avaliando-se as concentrações de cálcio intracelular e o potencial de repouso da membrana através de ensaios funcionais com indicadores fluorescentes. Em ambos os testes foram avaliadas as respostas diretas às substâncias diabetogênicas e a resposta à capsaicina, substância que ativa o receptor TRPV1 característico de nociceptores. Foi observado que a estreptozotocina causa uma diminuição nos níveis intracelulares de cálcio e reduz o aumento de cálcio induzido por capsaicina, enquanto que a aloxana não alterou nenhuma das respostas. Nenhuma das substâncias diabetogênicas parece alterar diretamente o potencial de membrana neuronal, enquanto que novamente foi observada uma diminuição da resposta à capsaicina na presença de estreptozotocina. Deste modo, estes resultados, em conjunto com os resultados *in vivo*, obtidos anteriormente, sugerem que a estreptozotocina tem um efeito direto sobre os neurônios nociceptivos, provavelmente por atuar sobre o receptor TRPV1. A aloxana não parece atuar diretamente sobre os neurônios nociceptivos de forma que esta substância é uma alternativa melhor para estudos que visem analisar a dor neuropática diabética através de modelos experimentais.

Palavras-chave: Aloxana. Diabetes experimental. Estreptozotocina. Gânglio da raiz dorsal. Neuropatia diabética.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo Geral.....	11
2.2	Objetivos Específicos.....	11
3	METODOLOGIA	12
3.1	Animais	12
3.2	Drogas	12
3.3	Cultura de gânglios da raiz dorsal (DRG)	12
3.4	Avaliação da dinâmica de cálcio intracelular através da microscopia confocal.....	13
3.5	Avaliação do potencial de repouso através do uso de DiBAC4(3) em microscopia confocal	14
3.6	Análise Estatística	15
4	RESULTADOS	16
4.1	Avaliação do efeito de aloxana e estreptozotocina sobre a ativação do receptor TRPV1 e da dinâmica de Ca^{2+} intracelular	16
4.2	Avaliação do efeito da aloxana e estreptozotocina sobre o potencial de repouso neuronal através do indicador fluorescente DiBAC4(3)	19
5	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30
	ANEXO.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação do estado glicêmico dos animais após administração de aloxana ou estreptozotocina.....	8
Figura 2: Efeito da administração de aloxana ou estreptozotocina na sensibilidade mecânica..	9
Figura 3: da injeção intraganglionar de aloxana ou estreptozotocina no limiar de sensibilidade mecânica.	10
Figura 4: Efeitos da aloxana e estreptozotocina em resposta da capsaicina em cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal.	17
Figura 5:Efeito da aloxana e estreptozotocina no influxo de cálcio em neurônios nociceptivos em cultura.....	18
Figura 6:Influxo de cálcio induzido por capsaicina em cultura de neurônios nociceptivos em cultura tratados com aloxana ou estreptozotocina.....	18
Figura 7:Efeitos da aloxana e estreptozotocina em resposta da capsaicina em cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal.	20
Figura 8: Efeito da aloxana e estreptozotocina no potencial de repouso da membrana em neurônios nociceptivos em cultura.	21
Figura 9: Alteração do potencial de repouso da membrana induzido por capsaicina em cultura de neurônios nociceptivos em cultura tratados com aloxana ou estreptozotocina.	22

LISTA DE ABREVIATURAS

1. NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
2. μL – Microlitros
3. g – Gramas
4. β – Beta
5. NAD^+ - Dinucleótido de nicotinamida e adenina
6. DRG – Gânglio da raiz dorsal
7. Ca^{2+} - Cálcio
8. TRPV – Receptor de Potencial Transitório Vanilóide
9. $-\text{SH}$ – Grupo tiol
10. STZ – Estreptozotocina
11. ALX – Aloxana
12. μM – Micromolar
13. mM - Milimolar

1 INTRODUÇÃO

Em 2017, a Federação Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation, IDF) estimou que 425 milhões de pessoas no mundo viviam com diabetes, sendo que dessas, 327 milhões eram pessoas entre 20 e 64 anos. Estimou ainda que o número pode subir para 629 milhões em 2045, onde grande parte dos casos são e serão de países em desenvolvimento. No Brasil, em 2017, foram contabilizados mais de 12,5 milhões de casos e estima-se que esse número possa ultrapassar 20 milhões em 2045.

A Organização Mundial da Saúde (2013) define o diabetes melito como uma doença crônica que tem como início a deficiência na produção ou ação deste hormônio, resultando em um aumento na concentração de glicose no sangue. De acordo com a Federação Internacional do Diabetes, podemos classificar de modo geral o diabetes em diabetes melito 1, onde há deficiência na produção de insulina, por destruição das células β -pancreáticas, que produzem esse hormônio, destruição essa provocada por resposta imune (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA, 2019; PALMER et al., 1983). Há ainda possibilidade de destruição das células por fatores genéticos, como alelos dos locos DR3 e DR4 (VAN DER AUWERA, 1995), participação de radicais livres (RABINOVITCH et al., 1996), dentre outras; o diabetes melito tipo 2, cuja caracterização se dá pela deficiência na ação da insulina nas células-alvo, dada a resistência à insulina, relacionado ao receptor correspondente nas células, levando a uma deficiência na resposta dos tecidos e redução da captação de glicose; e o gestacional que se caracteriza pelo desenvolvimento do tipo 2 durante a gestação, uma vez que os hormônios produzidos pela placenta e o aumento de demanda energética influenciam na resistência à insulina (BEM – HAROUSH, YOGEV; HOD, 2004). Sabe-se que o hormônio lactogênico placentário está relacionado a resistência à insulina, mas hoje descreve-se outros hormônios considerados hiperglicemiantes como progesterona, estrogênio e cortisol (SOCIEDADE

BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2008). O desenvolvimento de resistência à insulina através da demanda energética vem de uma adaptação fisiológica, que é realizada pelos hormônios placentários anti-insulínicos, garantindo glicose ao feto. Mas algumas mulheres podem engravidar com uma resistência prévia, ainda que mínima e com essa imposição fisiológica, haverá incapacidade do pâncreas para a produção de insulina, provocando quadro de hiperglicemia (IDF, 2009)

As alterações causadas pela deficiência de insulina levam a complicações crônicas, acarretando alterações bioquímicas (metabolismo) (FERREIRA et al., 2011). Podemos caracterizar como distúrbios macrovasculares (doença coronariana, doença cerebrovascular e doença arterial periférica) e microvasculares (retinopatia, nefropatia, neuropatia) (MELENDEZ-RAMIREZ; RICHARDS; CEFALU, 2010).

A neuropatia diabética é uma das complicações mais prevalentes (BOULTON, 2005). Ocorre por danos progressivos dos axônios das fibras nervosas, podendo ser caracterizada por sinais de disfunção dos nervos do sistema nervoso periférico. Nesta complicação, autores descrevem algumas alterações, como um fluxo aumentado de glicose para a via poliol, levando ao acúmulo de sorbitol (KUZUMOTO et al., 2006); aumento de radicais superóxidos por diminuição de NADPH disponível (KUZUMOTO et al., 2006) ou uma ativação da fosfoquinase de proteína quinase C (PKC). Esta proteína está relacionada a liberação de Ca^{2+} intracelular, sendo que este pode estar associado à sensibilização neuronal (KASSUYA et al., 2007).

Alguns trabalhos ainda descrevem alterações da angiogênese, além de levar a ativação de fatores transcripcionais, geração de produtos de glicação avançada, liberação de citocinas pro-inflamatórias, endotelinas, culminando em alterações de sinalização celular e/ou morte celular, explicando a condição de alteração da condução nervosa (CORNELL & DUCIC, 2008; EDWARDS et al., 2008). A neuropatia diabética pode resultar em uma diminuição ou

aumento de sensibilidade e, ainda induzir dor. Neste último caso, a dor é denominada de dor neuropática diabética, e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta dor ainda não são bem conhecidos.

A dor neuropática diabética é caracterizada pelo surgimento da hiperalgesia e alodinia mecânica (PISERA, 2005; SCHAIBLE, 2006). Hiperalgesia é uma resposta exagerada ao estímulo doloroso (JENSEN & FINNERUP, 2014) e a alodinia é a geração de dor por um estímulo que geralmente não causa dor (WOOLF & MAX, 2001; WOOLF, 2004).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor, dor é definida como uma “experiência sensorial e emocional de caráter desagradável provocada por lesão tissular, ou atribuída a tal”. Para o organismo funciona como um sinal de alerta, levando a defesa (OLIVEIRA, 2001). Mas além de uma sensação, é algo necessário essencial para sobrevivência (PATEL, 2010), podendo ser classificada principalmente em nociceptiva e/ou neuropática. A dor nociceptiva está associada à ativação de neurônios aferente primários, os nociceptores, por estímulos intensos que podem ou não estar causando uma lesão no tecido (BENNET et al., 2006; FEIN, 2011; OLIVEIRA, 2008). Estes nociceptores possuem os seus corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) ou trigeminal (GT) e o axônio inerva a cabeça e o corpo (BASBAUM et al., 2009; OLIVEIRA, 2008).

Os nociceptores respondem a diversos estímulos, sejam eles físicos, químicos ou mecânicos. Nos gânglios temos então subdivisões, que surgem a partir de critérios fisiológicos. Assim, a classificação ocorre de acordo com o tipo de estímulo a que são sensíveis, sendo os nociceptores então denominados fibras mielinizadas (Fibras A) e não mielinizadas (Fibras C). As fibras A são ainda classificadas, dentre outras, em fibras A δ , e possuem maior velocidade de condução, estando ainda relacionadas a respostas nocivas e a dor rápida (BASBAUM et al., 2009; LIU & WOOD, 2011; OLIVEIRA, 2008). As fibras C

são sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, sendo chamados de nociceptores polimodais (OLIVEIRA, 2008). Estão relacionadas a uma condução lenta, sendo então responsáveis pela dor lenta, e ao contrário das fibras A δ , a dor é mal localizada, e está relacionada a hiperalgesia mecânica, sendo também semelhante a dor crônica (OLIVEIRA, 2008).

Nas membranas desses nociceptores, encontramos canais e receptores que estão envolvidos na transdução dos estímulos nervosos (OLIVEIRA, 2008). A exemplo temos o TRPV1. O Receptor de Potencial Transitório Vanilóide Tipo 1 (TRPV1) é membro da família de receptores de potencial transitório (TRP), que são canais de cátions não seletivos, tendo permeabilidade relativa principalmente ao Ca²⁺ (HOLZER, 2008; TOMINAGA et al., 1998). O TRPV1 é o receptor ativado pela capsaicina, que compõe a pimenta, e participa da dor envolvida em exposições a estímulos nocivos e relacionada a inflamação de tecidos periféricos através da sua ativação relacionada a despolarização dos nociceptores (BASBAUM et al., 2009; CATERINA et al., 1997; JUNG et al., 2004; OLIVEIRA, 2008), tendo papel na dor neuropática (DUX; SANTHA; JANCISO, 2012; SZALLASI et al., 2007). São receptores encontrados principalmente em fibras C (PURVES et al., 2010). Há estudos que indicam participação de receptores TRPV1 dos neurônios sensoriais na hiperalgesia térmica em modelos experimentais de dor (JI et al., 2002; KANAI et al., 2007).

Como condição crônica, tem-se a dor neuropática, que é definida como uma dor vinda de lesões ou doenças que afetam o próprio sistema nervoso (BACKONJA, 2003), não sendo mais apenas um alerta (BASBAUM et al., 2009). Alguns autores recomendam termos para diferenciá-las ou especificá-las, por exemplo, utilização do termo “dor predominantemente neuropática” (BENNET et al., 2006). E ainda mais especificamente, tem-se tipos de dor neuropática, onde se utiliza a classificação com relação ao local da geração da dor, podendo

ser então de origem central ou periférica. Como exemplo da dor de origem periférica, encontramos a neuropatia diabética (CRUCIANI & NIETO, 2006).

A sensibilização vinda de uma neuropatia, como a diabética, envolve alterações bioquímicas e na expressão ou função de canais iônicos (MÁRQUEZ, 2006). Há estudos demonstrando que alterações estruturais ou de atividade dos canais iônicos muitas vezes são responsáveis por alteração da excitabilidade neuronal e/ou de desordens fisiopatológicas, como degeneração axonal (DOBRETISOV; ROMANOVSKY; STIMERS, 2007; RAOUF; QUICK; WOOD, 2010; ROZA et al., 2003), demonstrando a complexidade da neuropatia diabética (LEITE; SALGADO; FONSECA, 2017).

Para avaliação e estudo da neuropatia diabética, se faz indução de diabetes experimental em modelos animais, que pode ser feito por manipulação tanto genética quanto cirúrgica, e por fármacos, com indução por substâncias químicas, como a estreptozotocina (ALWATBAN; BERNARD; ANDRES, 2006) e a aloxana (DALL-AGNOL et al., 2009). Ambas as substâncias são citotóxicas, tendo o mesmo modo de captação da glicose, através do transportador GLUT 2, nas células β -pancreáticas (LENZEN, 2008). A maioria dos experimentos ocorre com roedores, pois há alta disponibilidade de linhagens e questões genéticas como a modificação para superexpressão (REES, 2005). Dentre as substâncias citotóxicas citadas anteriormente, a mais utilizada é a estreptozotocina. A quase totalidade de estudos em dor neuropática diabética utilizam estreptozotocina, sendo que nestes estudos os autores verificam a indução de hiperalgesia e alodinia nos animais diabéticos (SUN et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2009).

A estreptozotocina é um glicosídeo isolado de *Streptomyces achromogenes* (ALI et al., 2012; DELFINO et al., 2002; REUSSER, 1971) e sua utilização depende de fatores como concentração, dose e via de administração (NEGRI, 2005; SZKUDELSKI et al., 2001). Em uma faixa de dose, tem efeito citotóxico, inibindo o ciclo de Krebs, diminuindo consumo de

oxigênio e ainda causando danos no DNA, esgotando NAD⁺ e assim, levando a morte das células β -pancreáticas por falta de energia (ALI et al., 2012; DELFINO et al., 2002; GOYARY & SHARMA, 2010).

Diversos estudos têm mostrado o desenvolvimento de hiperalgesia térmica, mecânica e química na pata de animais após utilização de estreptozotocina (BISHNOI et al., 2011; CHRISTOPH; VRY; TZSCHENTKE, 2010; CUNHA et al., 2009; HASANEIN, 2011; IKEDA et al., 2009; PABREJA et al., 2011). No entanto, alguns estudos sugerem que a hiperalgesia induzida por tratamento com estreptozotocina é independente do estado glicêmico, demonstrando que embora a estreptozotocina seja um bom indutor de diabetes, possivelmente não seja um modelo ideal para estudo da dor neuropática diabética.

Em uma avaliação, Cunha e colaboradores verificaram que a maior dose de estreptozotocina do estudo (40 mg/Kg) induziu aumento significativo de glicose nos animais, porém todos os que foram tratados com a substância desenvolveram hiperalgesia mecânica, que foi reduzida com morfina, porém não foi prevenida com insulina, sugerindo que a hiperalgesia não é dependente da hiperglicemia (CUNHA et al., 2009). Bishnoi e colaboradores reportaram que o desenvolvimento de hiperalgesia ocorreu independente do estado glicêmico após indução por estreptozotocina e correlacionou com aumento da expressão do Receptor de Potencial Transitório Vanilóide Tipo 1 (TRPV1) (BISHNOI et al., 2011). Há ainda estudos que demonstraram que a estreptozotocina exerce efeito direto sobre os neurônios que alteram a expressão e função de TRPV1 através de espécies reativas de oxigênio, observando ainda aumento na forma fosforilada da proteína quinase p38, sugerindo uma expressão proteica aumentada de TRPV1 via p38 por espécies reativas de oxigênio, onde todas essas mudanças foram independentes do estado glicêmico dos animais analisados (PABBIDI et al., 2008a).

Como alternativa ao modelo de estreptozotocina, há a substância citotóxica aloxana, que é um derivado de pirimidina. No entanto, o mecanismo de citotoxicidade da aloxana é diferente daquele induzido por estreptozotocina. A aloxana age através da inibição da glicoquinase, levando a um bloqueio da secreção de insulina mediada pela glicose. Aloxana reage com os grupos -SH no local de ligação da glicoquinase, levando a inativação (LENZEN & MUNDAY, 1991; SZKUDELSKI et al., 2001). Há geração de espécies reativas de oxigênio, levando a quebra do DNA das ilhotas pancreáticas e morte celular por necrose (LENZEN & MUNDAY, 1991). De acordo com Kim et al. (1994), essa substância provoca também um aumento na concentração de cálcio citosólico, levando a um aumento da liberação de insulina e juntamente com a ação das espécies reativas de oxigênio, gera danos rápidos as células β -pancreáticas (KIM et al., 1994; WEAVER et al., 1978).

Considerando que a estreptozotocina parece não ser um modelo ideal para estudo da dor neuropática diabética, nosso grupo buscou realizar um estudo *in vivo* comparando os efeitos sobre a glicemia (Figura 1) e sobre a sensibilidade a estímulos mecânicos (Figura 2) em animais tratados com estreptozotocina ou aloxana.

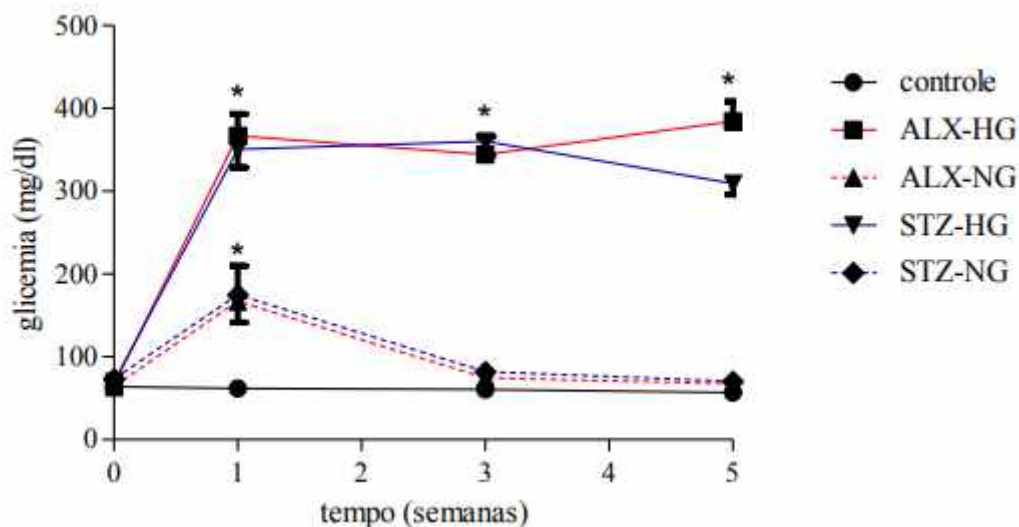


Figura 1: Avaliação do estado glicêmico dos animais após administração de aloxana ou estreptozotocina. Aferições realizadas antes, na primeira semana e depois a cada duas semanas durante cinco semanas (semana 0,1,3 e 5). O gráfico mostra os dados dos grupos controle, aloxana (30 mg/kg) e estreptozotocina (35 mg/kg), ambos divididos em normoglicêmicos (ALX-NG e STZ-NG) e hiperglicêmicos (ALX-HG e STZ-HG). Dados como média e EPM de 9-20 animais por grupo experimental. * $p < 0,01$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA duas vias, Bonferroni) (RODRIGUES, 2018).

Após a injeção de estreptozotocina ou aloxana, alguns animais desenvolvem o diabetes (hiperglicemia) enquanto que outros sofrem uma pequena alteração inicial, mas se mantêm normoglicêmicos. Quando foi avaliada a sensibilidade mecânica na pata destes animais, através do teste de von Frey eletrônico, foi observado um aumento de sensibilidade mecânica nos animais tratados com estreptozotocina, mesmo naqueles que não ficaram hiperglicêmicos. No caso dos animais tratados com aloxana, os animais normoglicêmicos tiveram apenas um pequeno aumento de sensibilidade, que não foi diferente do controle, enquanto que os animais hiperglicêmicos tiveram um aumento gradual na sensibilidade mecânica.

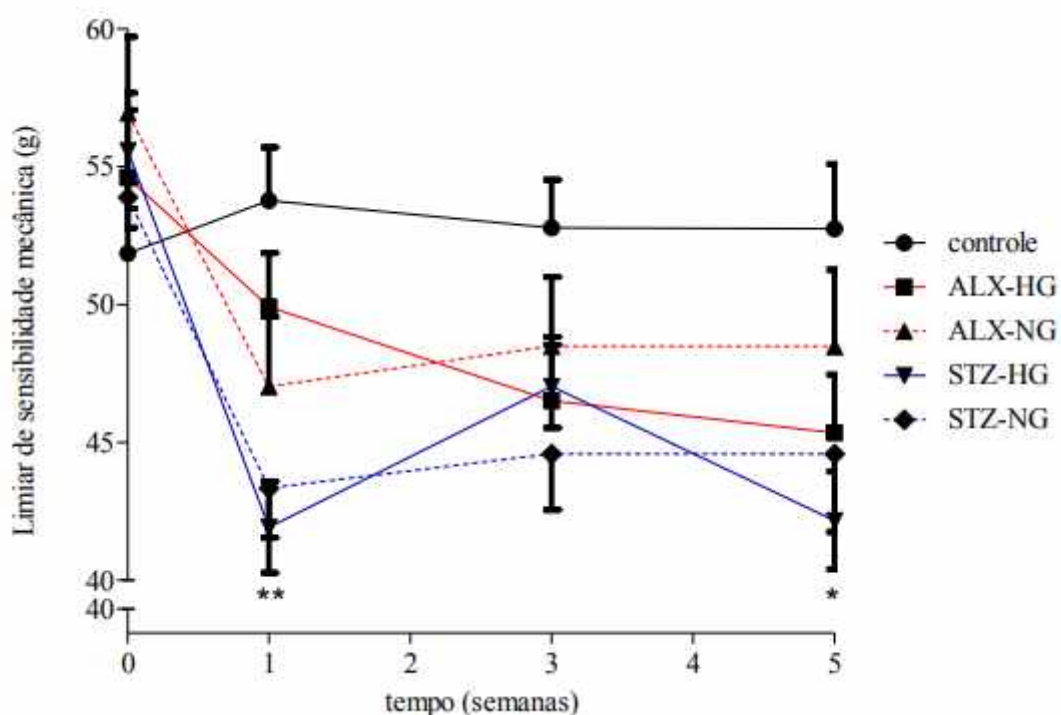


Figura 2: Efeito da administração de aloxana ou estreptozotocina na sensibilidade mecânica. O gráfico mostra o limiar de sensibilidade mecânica, em gramas, dos grupos controle, aloxana e estreptozotocina, ambos divididos em normoglicêmicos e hiperglicêmicos. Dados como média e EPM de 9-20 animais por grupo experimental. * $p < 0,01$ significativamente diferente do grupo controle. ** $p < 0,01$ significativamente diferente dos grupos normoglicêmicos e hiperglicêmicos que receberam estreptozotocina (STZ-NG e STZ-HG) em relação ao grupo controle. (ANOVA duas vias, Bonferroni) (RODRIGUES, 2018).

Além disso, foi realizado experimento onde foi feita injeção intraganglionar de aloxana ou estreptozotocina diretamente no gânglio da raiz dorsal (L5) direito. O limiar de sensibilidade mecânica foi avaliado nas patas traseiras direitas, regiões inervadas pelo gânglio L5 (Figura 3). Resultados encontrados mostram que nos animais tratados com estreptozotocina apresentam redução significativa do limiar em todos os tempos de estudo em relação ao basal, ao contrário dos tratados com aloxana, que apresentaram apenas uma pequena alteração no tempo de 15 minutos. Isso sugere que a estreptozotocina age diretamente sobre os neurônios nociceptivos, mas que a aloxana tem um efeito direto menor.

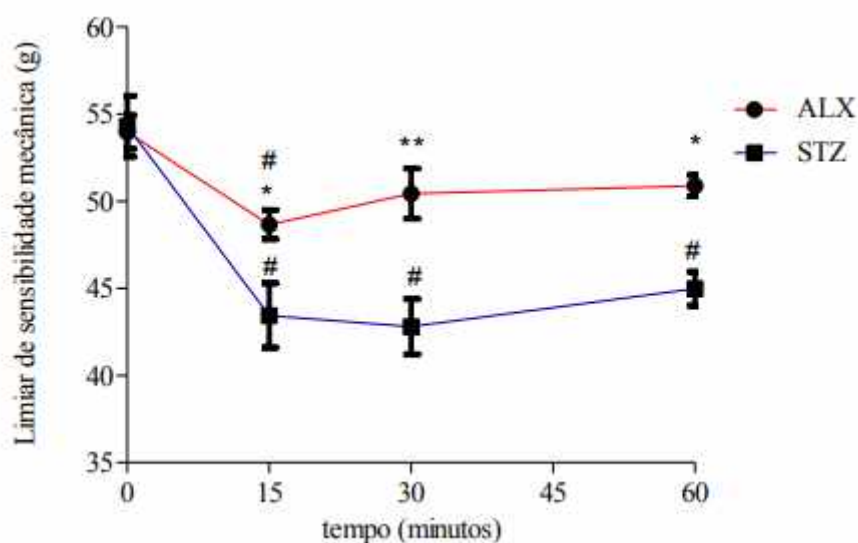


Figura 3: da injeção intraganglionar de aloxana ou estreptozotocina no limiar de sensibilidade mecânica. O gráfico mostra o limiar de sensibilidade mecânica em patas dos animais antes e 15, 30 e 60 minutos após injeção de aloxana ou estreptozotocina gânglio da raiz dorsal (15) direito. Dados apresentados 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) (RODRIGUES, 2018).

O presente estudo teve como finalidade complementar os resultados obtidos através do estudo *in vivo*. Isto foi realizado através de ensaios *in vitro*, em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal (DRG) de ratos, para avaliação do efeito direto da administração de estreptozotocina ou aloxana em neurônios nociceptivos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos diretos da aloxana e estreptozotocina sobre neurônios nociceptivos presentes em gânglios da raiz dorsal de ratos através de culturas primárias.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar os efeitos diretos de aloxana e estreptozotocina sobre os níveis intracelulares de cálcio e sobre o potencial de repouso neuronal.
- 2) Avaliar se aloxana e estreptozotocina interferem no influxo de cálcio ou despolarização induzidos pela ativação do receptor TRPV1 por capsaicina.
- 3) Determinar qual substância, aloxana ou estreptozotocina, é mais adequada para estudos envolvendo dor neuropática diabética.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Para realização dos testes foram utilizados 8 animais, sendo fêmeas e machos Wistar adquiridos no biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU), com idade de 4 semanas. Os mesmos foram mantidos em pares em sala com temperatura (25 °C) e ciclo de luminosidade controlada (12/12h), com acesso livre à água filtrada e ração à vontade em mini-isoladores Ventilife de dimensões 48,3 cm x 33,7 cm x 21,4 cm.

Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas, recomendadas pela IASP (ZIMMERMANN, 1983), e aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia segundo o Protocolo 077/18 (Anexo I).

3.2 Drogas

- Estreptozotocina (Streptozotocin, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA);
- Aloxana (Alloxan monohydrate, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) ;
- Capsaicina (Sigma);

Para os experimentos todas as drogas foram diluídas em solução Hank's/Hepes (Solução de Hanks' Balanced Salts e Hepes) para obter as concentrações usuais finais.

3.3 Cultura de gânglios da raiz dorsal (DRG)

Os ratos foram eutanasiados após anestesia em isofurano 4%, administrado através de vaporizador específico para uso veterinário, garantindo anestesia durante o tempo necessário.

As culturas foram realizadas conforme protocolo descrito por Linhart et al. (2003). Os gânglios da raiz dorsal da região lombar e torácica foram removidos (cerca de 15 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank's estéril com 10 mM de tampão HEPES. As células foram dissociadas por incubação a 37 °C por 75 minutos em solução salina de Hank's contendo 0,28 U/mL de colagenase (tipo 2, Sigma) e depois por 12 minutos em solução contendo 0,25 mg/mL de tripsina. Os gânglios foram lavados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina. As células foram então cultivadas em placas cobertas com Matrigel e mantidas em atmosfera de 5% CO₂ (37°C) com o mesmo meio de cultura já descrito e utilizadas após 48 horas.

3.4 Avaliação da dinâmica de cálcio intracelular através da microscopia confocal

As culturas foram utilizadas após 48 horas, lavadas 2x em solução Hank's/Hepes e os neurônios foram incubados com o indicador fluorescente intracelular de Ca²⁺ Fluo-3AM (5 µM) durante 40 minutos no escuro e depois lavadas 3X em solução Hank's, sendo mantidas nesta solução (90 µL).

Fluo-3 é uma molécula que ao se ligar ao Ca²⁺, proporciona um aumento na fluorescência, mas os sais de Fluo-3 não são capazes de penetrar a membrana celular, sendo necessário uso do éster acetoximetílico (AM), que no meio intracelular é clivado por esterases, impossibilitando que o Fluo-3 saia para o meio extracelular.

As placas já preparadas, foram levadas para microscópio confocal (Zeiss) e separadas em placas controles e tratadas com estreptozotocina ou aloxana. Nas placas controle foi administrado Hank's e nas tratadas foi administrado aloxana (10 µM) ou estreptozotocina (10 µM) no volume de 10 µL, adicionadas aos 90 µL de solução, resultando em concentrações

final de 1 μ M. Entre as administrações não foi feita a lavagem das placas. Realizou-se uma sequência de fotos, obtidas durante 03 minutos. Após administração das drogas, ainda na presença das substâncias diabetogênicas, foi realizada administração de capsaicina (concentração final de 100 nM) e as imagens foram adquiridas por 02 minutos. Posteriormente as imagens foram analisadas através do software ImageJ (NIH) onde quantificou-se a fluorescência emitida de cada neurônio em cada momento, isoladamente. A variação da fluorescência correspondeu as alterações nos níveis de Ca^{2+} . 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.

3.5 Avaliação do potencial de repouso através do uso de DiBAC4(3) em microscopia confocal

Lavou-se as placas em tampão Hanks, sendo incubadas com 5 μ M do indicador de potencial de repouso DiBAC4(3) (Molecular Probes) por 20 minutos no escuro em temperatura ambiente. O indicador é uma molécula apolar, embora aniônica, e a difusão deste pela membrana celular, de acordo com o gradiente eletroquímico, determina a fluorescência emitida. Este indicador penetra pela membrana em células despolarizadas, onde a ligação com proteínas intracelulares induz aumento de fluorescência desta molécula. Desta forma, um aumento de fluorescência indica despolarização, enquanto que uma diminuição indica hiperpolarização da membrana celular.

Da mesma forma do procedimento anterior, as placas já preparadas, foram levadas para microscópio confocal (Zeiss) e separadas em placas controles e tratadas com aloxana ou estreptozotocina. Nas placas controle foi administrado Hank's e nas tratadas foi administrado

aloxana (1 μ M) ou estreptozotocina (1 μ M). Entre as administrações não foi feita a lavagem das placas. Realizou-se uma sequência de fotos, obtidas durante 05 minutos. Após administração das drogas, ainda na presença das substâncias diabetogênicas, foi realizada administração de capsaicina e as imagens foram adquiridas por 03 minutos. A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de séries temporais de imagens obtidas através de microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta). Para avaliação de alterações do potencial de repouso dos neurônios, considerou-se a fluorescência emitida por cada neurônio após 5 minutos da administração de aloxana e estreptozotocina, nas concentrações propostas no estudo. Os dados são mostrados como ($\Delta F/F_0$).

3.6 Análise Estatística

As médias obtidas foram comparadas do máximo de variação de fluorescência considerando como n amostral cada neurônio mensurado. A análise dos resultados foi feita pelo programa GraphPad Prisma 5, pelo teste de variância ANOVA uma via, seguido de pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito de aloxana e estreptozotocina sobre a ativação do receptor TRPV1 e da dinâmica de Ca²⁺ intracelular

Por meio da microscopia confocal e utilização do indicador de cálcio intracelular Fluo-3-AM, avaliou-se as alterações nos níveis intracelulares de cálcio nos neurônios em culturas primárias de DRG. As drogas de estudo foram administradas diretamente nas culturas na concentração final de 1 μ M após obtenção das imagens basais (Figura 4: 1, 2, 3A) e uma sequência de imagens foi obtida durante 03 minutos (Figura 4: 1,2,3B). Após isso, sem lavagens, foi realizada administração de capsaicina, que ativa receptores TRPV1 (Figura 4: 1,2,3C).

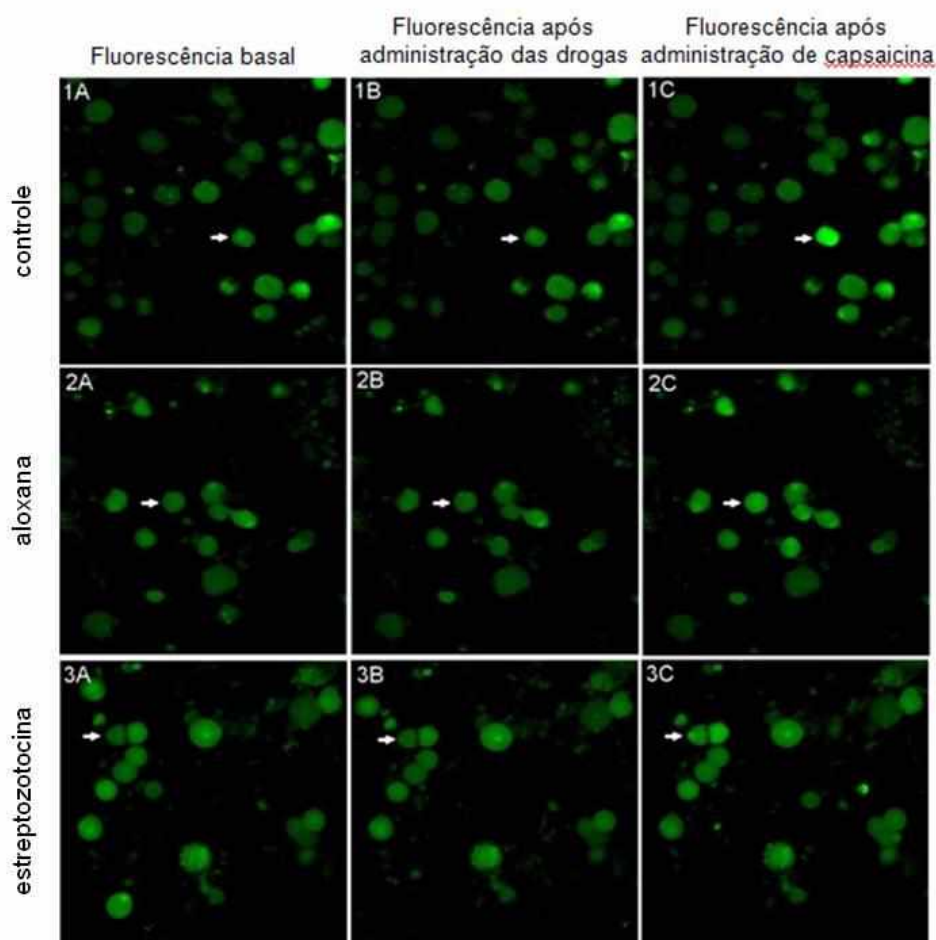


Figura 4: Efeitos da aloxana e estreptozotocina em resposta da capsaicina em cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal. Imagens representativas obtidas por microscopia confocal (Zeiss) utilizando o indicador fluorescente Fluo-3-AM). A: fluorescência basal. B: Aos 3 minutos após a administração de Hank's, aloxana ou estreptozotocina. C: Aos 2 minutos após a administração de capsaicina. As setas indicam neurônios representativos do aumento de fluorescência. Imagens obtidas usando ampliação de 400x.

Como esperado, a administração de Hank's (veículo) não levou a nenhuma alteração nos níveis de Ca^{2+} nos neurônios avaliados. O mesmo ocorre com a administração de aloxana. Porém, administração de estreptozotocina causou uma diminuição significativa nos níveis de Ca^{2+} das células analisadas (Figura 5).

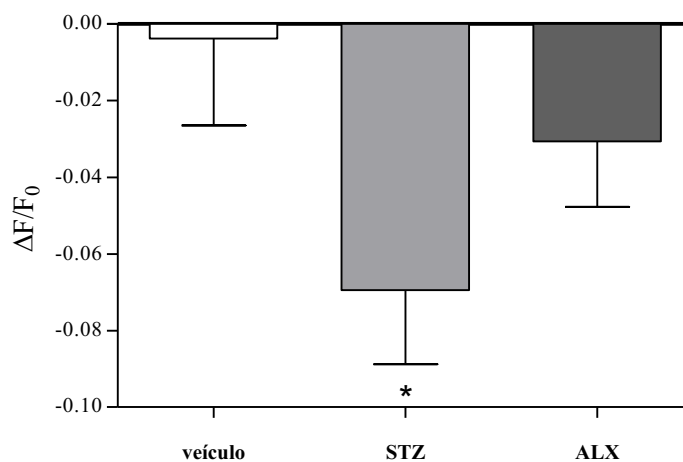


Figura 5: Efeito da aloxana e estreptozotocina no influxo de cálcio em neurônios nociceptivos em cultura. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por Fluo-3/AM após 03 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal em solução de Hank's (veículo) ou após administração de aloxana ou estreptozotocina. Dados apresentados como média $\pm$ E.P.M de 20 a 25 neurônios. * $p < 0,05$ significativamente diferente com o grupo controle (Dados avaliados por teste t).

Após os 3 minutos de avaliação dos efeitos diretos de aloxana e estreptozotocina, ainda na presença destas, foi realizada a administração de capsaicina (100 nM) (Figura 6).

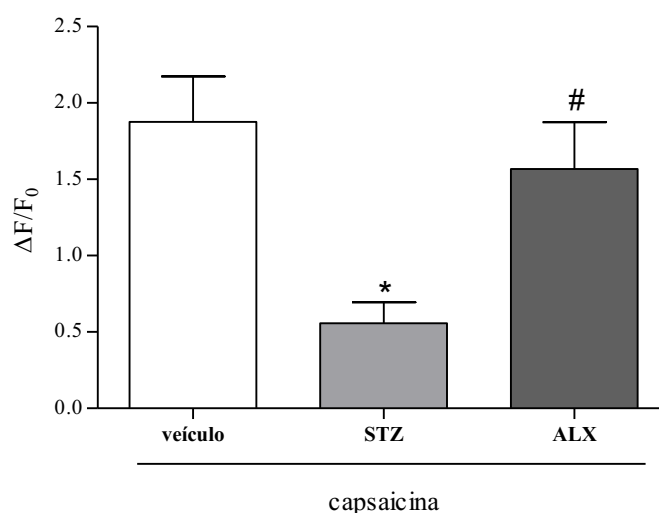


Figura 6: Influxo de cálcio induzido por capsaicina em cultura de neurônios nociceptivos em cultura tratados com aloxana ou estreptozotocina. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por Fluo-3 após 2 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal após a administração de capsaicina (100 nM) em placas contendo solução de Hank's (veículo) ou aloxana ou estreptozotocina. Dados apresentados como média $\pm$ E.P.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).

A capsaicina induziu um aumento de fluorescência, indicando influxo de cálcio, em neurônios presentes nas placas controle e nas placas tratadas com aloxana, enquanto que o influxo de cálcio foi significativamente reduzido nas placas tratadas com estreptozotocina.

4.2 Avaliação do efeito da aloxana e estreptozotocina sobre o potencial de repouso neuronal através do indicador fluorescente DiBAC4(3)

As alterações relativas ao potencial de repouso da membrana nos neurônios em culturas primárias foram avaliadas através de microscopia confocal com o indicador DiBAC4(3). As drogas de estudo foram administradas de modo direto sobre as culturas selecionadas em concentração de 1 μ M após obtenção das imagens correspondentes a fluorescência basal (Figura 7: 1,2,3A) e uma sequência de imagens foi obtida após 05 minutos (Figura 7: 1,2,3B). Posteriormente, uma terceira sequência de imagens (Figura 7: 1,2,3C) foi obtida após administração de capsaicina após 03 minutos.

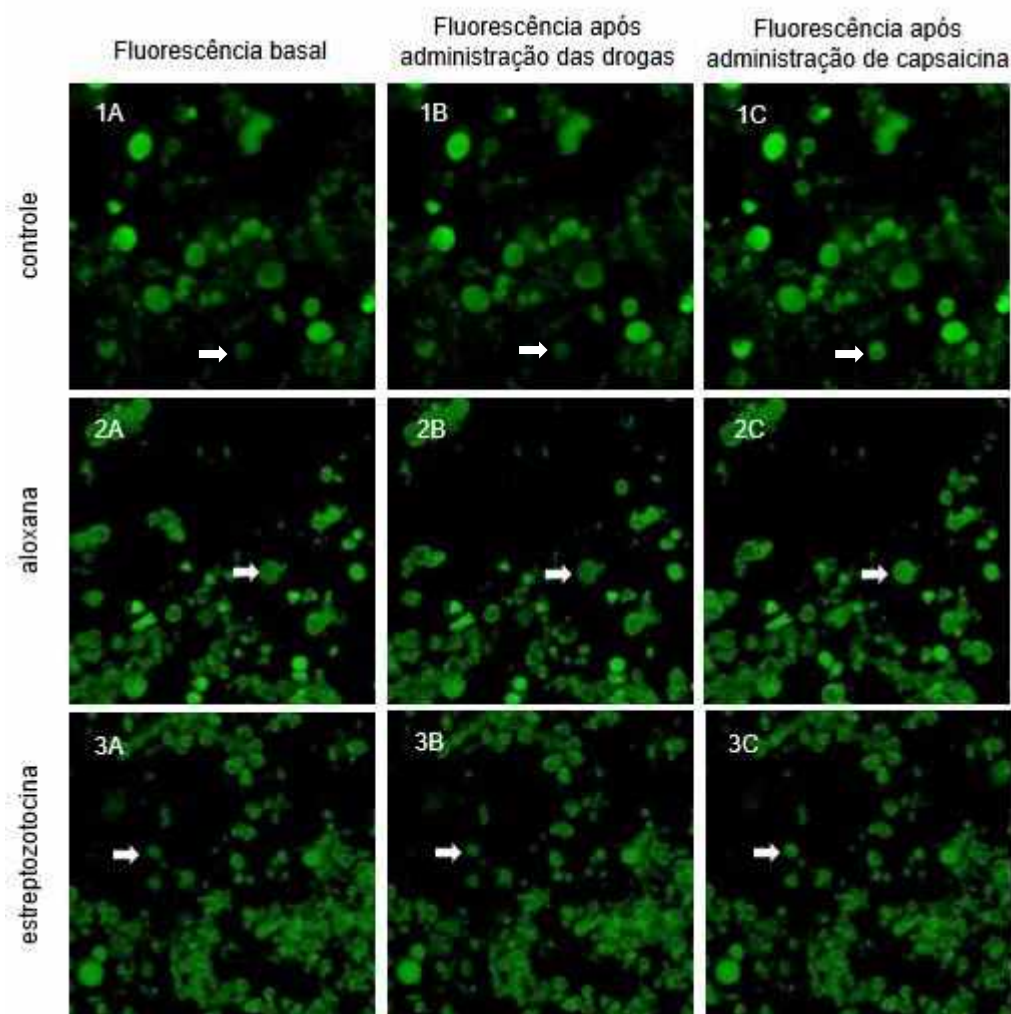


Figura 7: Efeitos da aloxana e estreptozotocina em resposta da capsaicina em cultura primária de neurônios sensoriais primários do gânglio da raiz dorsal. Imagens representativas obtidas por microscopia confocal (Zeiss) utilizando o indicador fluorescente DiBAC4(3). A: fluorescência basal. B: Aos 05 minutos após a administração de Hank's, aloxana ou estreptozotocina. C: Aos 03 minutos após a administração de capsaicina. As setas indicam neurônios representativos do aumento de fluorescência. Imagens obtidas usando ampliação de 400x.

Foram avaliadas as alterações referentes ao potencial de repouso da membrana nos neurônios tratados com Hank's (veículo), aloxana e estreptozotocina (Figura 8). A administração de estreptozotocina, assim como a de aloxana, não alterou o potencial de repouso da membrana.

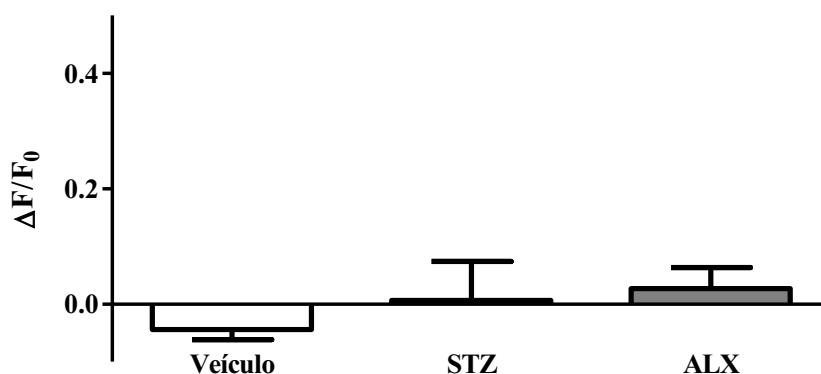


Figura 8: Efeito da aloxana e estreptozotocina no potencial de repouso da membrana em neurônios nociceptivos em cultura. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC4(3) após 5 minutos de aquisição de imagens de culturas de gânglios da raiz dorsal após a administração de capsaicina (100 nM) em placas contendo solução de Hank's (veículo) ou aloxana ou estreptozotocina. Dados apresentados como média $\pm$ E.P.M. de 20 a 25 neurônios. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

Após 05 minutos de aquisição de imagens depois da administração das drogas de estudo, cada placa recebeu 100 nM de capsaicina e foi feita aquisição de imagens por mais 03 minutos. Analisando a variação de fluorescência nas células (Figura 9), observa-se células que tratadas com estreptozotocina apresentaram variação menor na fluorescência, resposta essa significativa se comparada as células que foram tratadas com aloxana. Deste modo, infere-se que o tratamento com estreptozotocina inibiu a despolarização induzida por capsaicina, enquanto que a aloxana não apresentou efeito.

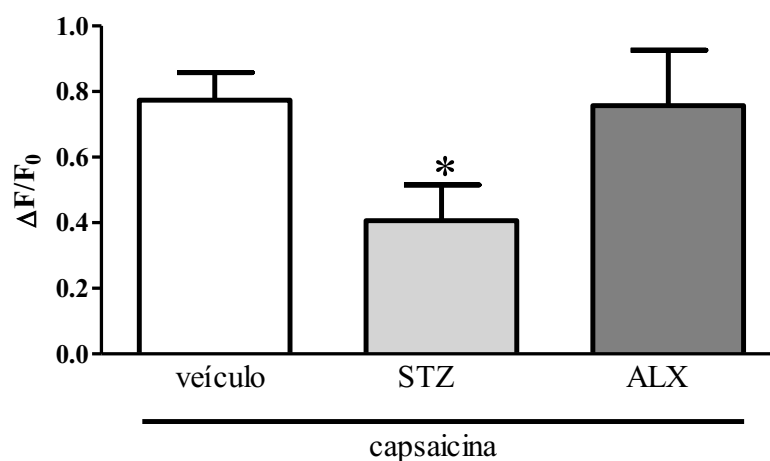


Figura 9: Alteração do potencial de repouso da membrana induzido por capsaicina em cultura de neurônios nociceptivos em cultura tratados com aloxana ou estreptozotocina. É mostrada a variação das intensidades de fluorescência emitidas por DiBAC4(3) após 3 minutos de aquisição de imagens de culturas de 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 $\pm$ E.P.M. de 20 a 25 neurônios. * $p < 0,05$ significativamente diferente do grupo STZ em relação ao grupo ALX. (Dados avaliados por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

Diante da grande prevalência do diabetes *mellitus* e dos impactos que as complicações relativas a essa doença causam nos indivíduos diagnosticados, faz-se necessário que se conheçam os mecanismos envolvidos para que seja possível a estes indivíduos um tratamento adequado e uma melhora na qualidade de vida.

Para entender a patogênese desta doença e as suas complicações, os modelos animais de diabetes experimental têm sido de grande valia (AL-AWAR et al., 2016). Um dos modos mais utilizados para a indução de diabetes experimental é pela utilização de drogas diabetogênicas, sendo as mais conhecidas a aloxana e estreptozotocina, sendo que os estudos em sua quase totalidade, utilizam estreptozotocina. Mas como visto anteriormente, diversos estudos tem questionado o uso desta substância para avaliação dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética, uma vez que resultados demonstram que a estreptozotocina parece alterar o limiar nociceptivo independente do estado glicêmico do animal (BISHNOI et al., 2011; CUNHA et al., 2009). A aloxana pode ser uma alternativa para o estudo de neuropatia diabética. O presente estudo objetivou verificar e comparar os efeitos diretos de aloxana e estreptozotocina sobre neurônios nociceptivos primários em cultura. Foram avaliados os níveis intracelulares de cálcio e o potencial de repouso da membrana em neurônios nociceptivos em resposta aos tratamentos com aloxana ou estreptozotocina e ainda foram avaliadas as respostas ao agonista TRPV1, capsaicina, na presença das substâncias diabetogênicas. Os resultados obtidos sugerem que apenas a estreptozotocina tem efeito direto nos neurônios nociceptivos.

Conforme descrito anteriormente, este estudo teve por objetivo complementar resultados anteriores em que foram comparados os efeitos do tratamento com estreptozotocina com aqueles do tratamento com aloxana em ratos (RODRIGUES, 2018). Os resultados obtidos *in*

vivo mostraram que a estreptozotocina causa uma alteração na sensibilidade nociceptiva mecânica em animais que não desenvolveram hiperglicemia, corroborando com o resultado obtido por outros autores (BISHNOI et al., 2011; ROMANOVSKY et al., 2004). Por outro lado, o efeito induzido por aloxana parece ser dependente do desenvolvimento do diabetes. Além disso, verificamos que a injeção de estreptozotocina diretamente no gânglio da raiz dorsal de ratos induziu um aumento de sensibilidade mecânica, enquanto que a injeção de aloxana não induziu efeito significativo. Estes resultados sugerem que a estreptozotocina, mas não a aloxana pode ter um efeito direto sobre o sistema nociceptivo. Para testar esta hipótese avaliamos inicialmente o efeito do tratamento com estreptozotocina ou aloxana sobre os níveis de cálcio intracelular em culturas primárias de gânglio da raiz dorsal de ratos.

Assim, foram realizados experimentos em culturas primárias sendo considerado para isso a emissão de fluorescência pelas células após incubação com indicador Fluo-3AM. Inicialmente foram avaliados os efeitos diretos da administração das substâncias diabetogênicas de estudo e posteriormente, o efeito da administração do agonista capsaicina. Observamos uma redução nos níveis de cálcio intracelular tanto após utilização da estreptozotocina quanto do influxo de cálcio induzido por capsaicina. Estes resultados indicam um efeito direto da estreptozotocina, possivelmente por atuar no receptor TRPV1. A capsaicina é um agonista seletivo que ativa receptores TRPV1, característicos de fibras C nociceptivas (CATERINA & JULIUS, 2001; HONG & WILEY, 2004). Uma redução na ativação de receptores TRPV1 poderia explicar a diminuição do influxo de cálcio induzido por capsaicina nas células tratadas com estreptozotocina e talvez também explique a diminuição dos níveis intracelulares de cálcio induzida por estreptozotocina na ausência de estímulo. Isto porque no sistema nervoso central já foi verificada uma atividade basal tônica de receptores TRPV1 em temperatura ambiente (SHOUDAI et al., 2010). Estudos em humanos e em animais sugerem que alterações na expressão e função do receptor TRPV1

podem estar envolvidas no desenvolvimento da neuropatia dolorosa diabética (CATERINA & JULIUS, 2001; HONG & WILEY, 2004; KAMEI et al., 2003). No entanto, estudos realizados em animais (ANDERSSON et al., 2015; BISHNOI et al., 2011) verificaram que o tratamento com estreptozotocina induz um aumento na expressão do receptor TRPV1 de maneira independente do desenvolvimento de hiperglicemia. Deste modo, nosso estudo corrobora com a hipótese de que a estreptozotocina possui efeito direto sobre os neurônios nociceptivos por atuar em receptores TRPV1. Embora os resultados de nossos experimentos possam parecer contrários a parte da literatura, podemos considerar que uma diminuição na ativação de receptores pode induzir um aumento na expressão destes, explicando a aparente discrepância. Além disso, as concentrações de estreptozotocina utilizadas nos outros estudos foram superiores àquela testada nos experimentos encontrados na literatura. De qualquer maneira, considerando que o interesse no uso de estreptozotocina é o desenvolvimento de modelos experimentais para estudo do diabetes, o efeito direto desta substância em neurônios nociceptivos é indesejado, independente do mecanismo envolvido. Considerando ainda a importante participação do receptor TRPV1 em processos dolorosos (DAÍ, 2016), um efeito sobre este receptor pode explicar as alterações de sensibilidade verificadas nos testes *in vivo* nos animais tratados com estreptozotocina.

Visto que o objetivo principal de nosso estudo é avaliar se a aloxana pode ser um modelo mais adequado para estudo da dor neuropática diabética, o efeito da administração de aloxana foi testado utilizando-se o mesmo protocolo para avaliação dos níveis de cálcio intracelular nas culturas primárias de neurônios nociceptivos. Observamos que a aloxana, na concentração testada, não alterou o nível intracelular de cálcio e também não afetou o influxo de cálcio induzido por capsaicina. Desta forma, estes experimentos estão de acordo com nossos resultados anteriores obtidos *in vivo*, que sugerem que aloxana não tem efeito direto sobre o sistema nociceptivo.

Nas células β -pancreáticas, estreptozotocina e aloxana, ao acessarem o meio intracelular promovem alterações no potencial de membrana, uma vez que tem o mesmo modo de captação da glicose (LENZEN, 2008). O metabolismo de glicose leva a geração de adenosinatrifosfato (ATP) e ocorre um aumento de adenosinadifosfato (ATP/ADP) no citoplasma (MATSCHINSKY, 1996). Esse último produto gera uma despolarização da membrana, abrindo canais de cálcio sensíveis a voltagem (PRENTKI & CORKEY, 1996). Como forma de tentar verificar se a estreptozotocina e a aloxana podem entrar em neurônios nociceptivos, foram realizados experimentos para avaliar o efeito destas substâncias sobre o potencial de repouso neuronal. Em células β -pancreáticas já foi relatado que a aloxana levou a uma hiperpolarização de membrana após redução da produção de ATP que causou abertura de canais de potássio (DREWS et al., 2000). Do mesmo modo, Carroll et al. (1994), em uma concentração fixa de 75 μ M de aloxana, também em células β , verificou que a substância sempre induzia uma rápida hiperpolarização da membrana, indicando um aumento de condução de íons potássio, sendo acompanhada por diminuição de células. Ao contrário disso, um estudo verificou uma despolarização rápida das células das ilhotas a uma concentração de 5 mM (DEAN & MATTHEWS, 1972).

Considerando os dados expostos acima, que mostram que ao entrar nas células β pancreáticas, os agentes diabetogênicos causam alterações no potencial de repouso celular, decidimos por avaliar os efeitos de estreptozotocina e aloxana sobre o potencial de repouso neuronal como uma forma de avaliar um possível efeito intracelular. Deste modo, possíveis alterações no potencial de repouso poderiam ser indicativos de que as substâncias indutoras de diabetes podem entrar e afetar o meio intracelular dos neurônios. Utilizando o indicador fluorescente, DiBAC4(3), foi possível avaliar alterações no potencial de repouso da membrana em culturas primárias de neurônios através de variações de fluorescência. Foram avaliadas, primeiramente, as respostas à administração de aloxana e estreptozotocina *per se* e

posteriormente, o efeito sobre a administração de capsaicina. Observou-se que as drogas diabetogênicas por si só não causam alteração significativa do potencial de repouso da membrana neuronal, uma vez que não houve variação significativa de fluorescência. Os neurônios sensitivos primários captam glicose de maneira independente de insulina (PATEL et al., 1994), provavelmente através do transportador neuronal GLUT3, ou ainda GLUT1, visto que estes são os transportadores encontrados no sistema nervoso em geral. Embora não tenhamos encontrado estudo que descreva quais transportadores para glicose são expressos nos neurônios periféricos, estes não possuem o transportador GLUT2, que é responsável pela captação de glicose em células β pancreáticas. Considerando que estreptozotocina e aloxana tem a capacidade de acessar o interior das células β pancreáticas, e outras, através de GLUT2, o resultado de efeito de estreptozotocina e aloxana sobre o potencial de repouso neuronal não indica que estas substâncias estejam sendo captadas pelos neurônios nociceptivos primários. Por outro lado, assim como no experimento realizado para avaliação do cálcio intracelular, a estreptozotocina induziu uma diminuição da resposta de despolarização induzida por capsaicina, sugerindo um efeito sobre a atividade do receptor TRPV1. Embora não possamos afirmar com segurança, os resultados obtidos são indicativos de que estreptozotocina apresenta um efeito inibitório sobre o receptor TRPV1 através de um mecanismo extracelular. Em resumo, os experimentos para avaliação dos efeitos de aloxona e estreptozotocina sobre o potencial de repouso neuronal novamente sugerem que a estreptozotocina tem efeito direto nos neurônios nociceptivos, enquanto que a aloxana parece não afetar estes neurônios.

Os dados encontrados no nosso estudo corroborando com a literatura fortalecem a ideia de que a estreptozotocina exerce um efeito direto em neurônios nociceptivos, provavelmente por afetar a ativação do receptor TRPV1. Ainda que a administração de estreptozotocina é um bom modelo para indução de diabetes experimental, estes resultados indicam que este modelo não é adequado para estudos que avaliam dor neuropática diabética. Por outro lado, a aloxana

parece não causar efeitos independentes de hiperglicemia e não afeta diretamente os neurônios nociceptivos primários de forma que parece ser uma alternativa mais adequada para estudos que visem avaliação de dor neuropática diabética.

6 CONCLUSÃO

- Aloxana pode ser mais adequada para estudos envolvendo dor neuropática diabética, uma vez que foi visto que a administração de estreptozotocina altera os níveis de cálcio intracelular e reduz o efeito da capsaicina, demonstrando ter efeito direto sobre neurônios nociceptivos.

REFERÊNCIAS

ALI, S. et al. Streptozotocin induced diabetes: mechanisms of induction. **International Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 4, n. 04, p. 11-5, 2012.

ALWATBAN, F. A. H.; BERNARD, L.; ANDRES, R. M. T. Polychromatic LED in Oval Full- Thickness Wound Healing in Non-diabetic and Diabetic Rats. **Photom. Laser Surg**, v.24, n.1, p. 10–16. 2006.

AL-AWAR, A. et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al. 12. Older adults: standards of medical care in diabetes—2019. **Diabetes Care**, v. 42, n. Supplement 1, p. S139-S147, 2019.

ANDERSSON, D. A. et al. Streptozotocin stimulates the ion channel TRPA1 directly involvement of peroxynitrite. **The journal of biological chemistry**, v. 290, n. 24, p. 12185-15196, 2015.

BACKONJA, M. M. Defining neuropathic pain. **Anesthesia & Analgesia**, Baltimore, v. 97, n.3, p. 785-790, 2003.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v.139, n.2, p. 267-284, 2009.

BENNET, M. I. et al. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 289-294, 2006.

BEM-HAROUSH, A.; YOGEV, Y.; HOD, M. Epidemiology gestational diabetes mellitus and its association with type 2 diabetes. **Diabet. Med.**, v. 21, n.2, p. 103-113, 2004.

BISHNOI, M. et al. Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators. **Molecular Pain**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2011.

CARROLL, P. B. et al. The diabetogenic agent alloxan increases K⁺ permeability by a mechanism involving activation of ATP-sensitive K⁺-channels in mouse pancreatic β -cells. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 140, n. 2, p. 127-136, 1994.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-824, 1997.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Rev. Neurosci.** v.24, n.1, p.487-517, 2001.

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.

CORNELL, R. S.; DUCIC, I. **Painful diabetic neuropathy**. Clin Podiatr Med Surg., 2008.

CRUCIANI, R. A.; NIETO, M. J. Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes. **Revista de la Sociedad Española Del Dolor, La Coruña**, v. 13, n. 5, p. 312-327, 2006.

CUNHA, J.M. et al. Streptozotocin-induced mechanical hypernociception is not dependent on hyperglycemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 2, p. 197206, 2009.

DAI, Yi. TRPs and pain. In: **Seminars in Immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, 2016. p. 277-291.

DALL-AGNOL, M. A. D.; NICOLAU, R. A.; LIMA C.J.; MUNIN E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (lightemitting diode) for tissue repair in diabetic rats. **Lasers Med. Sci.** v.24, p.909–916, 2009.

DELFINO, V.D.A. et al. 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.

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.

DEAN, P. M.; MATTHEWS, E. K. The bioelectrical properties of pancreatic islet cells: effect of diabetogenic agents. **Diabetologia**, v. 8, n. 3, p. 173-178, 1972.

DREWS, G. et al. Contrasting effects of alloxan on islets and single mouse pancreatic β -cells. **Biochemical Journal**, v. 352, n. 2, p. 389-397, 2000.

DUX, M.; SANTHA, P.; JANCOS, G. The role of chemosensitive afferent nerves and TRP ion channels in the pathomechanism of headaches. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 464, n. 3, p. 239-248, 2012.

EDWARDS, J. L. et al. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. **Pharmacology & therapeutics**, v. 120, n. 1, p. 1-34, 2008.

FEIN, A. **Nociceptores: As células que sentem dor**. Ribeirão preto: Dor On Line, 2011. Disponível em: <http://www.dol.inf.br/nociceptores>>. Acesso em: 28 out. 19.

FERREIRA, L. T. et al. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n.3, p.182-8, 2011.

GOYARY, D.; SHARMA, R. Dietary restriction prevents diabetogenic effect of streptozotocin in mice. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 47, p. 254-6, 2010.

HASANEIN, P. Effects of histamine H3 receptors on chemical hyperalgesia in diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 60, p. 886-91, 2011.

HOLZER, P. The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nocisensor. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 8, p. 1145-1162, 2008

HONG, S. et al. Early Painful Diabetic Neuropathy Is Associated with Differential Changes in Tetrodotoxin-sensitive and - resistant Sodium Channels in Dorsal Root Ganglion Neurons in the Rat. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 29341 -29350. 2004.

IDF Clinical Guidelines Task Force. Global Guideline on Pregnancy and Diabetes. Brussels: **International Diabetes Federation**, 2009

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. 42-46, 2009.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **Diabetes Atlas Executive Summary**. 7. ed. 2017. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

JENSEN, T. S.; FINNERUP, N. B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 9, p. 924-935, 2014.

JI, R. R. et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2002.

JUNG, J. Y. et al. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 8, p. 7048-7054, 2004.

KAMEI, R. et al. 2'- Benzyloxychalcone derivatives stimulate glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **Life Sci.**, v. 73, p. 2091-2099, 2003.

KANAI, Y. et al. Differential involvement of TRPV1 receptors at the central and peripheral nerves in CFA-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 733-738, 2007.

KASSUYA, C. A. et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **Br J Pharmacol.**, v.150, p. 727-737, 2007.

KIM, H.R. et al. Role of Ca in alloxan-induced pancreatic β -cell damage. **Biochim. Biophys Acta**, v.1227, p.87-91, 1994.

KUZUMOTO, T. et al. Effect of the aldose reductase inhibitor fidarestat on experimental diabetic neuropathy in the rat. **Diabetologia**. v.49, n.12, p.3085-93, 2006.

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

LENZEN, S., MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its n-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochem. Pharmacol.**, v.42, p.1385-91, 1991.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia, Berlin**, v. 51, p. 216–226, 2008.

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

MÁRQUEZ, J. O. Neuropatia Periférica Diabética Dolorosa. **Revista Neurociências**, v. 14, n. 3, p. 166-168, 2006.

MATSCHINSKY, F. M. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v. 45, n. 2, p. 223-241, 1996.

MELLENDEZ-RAMIREZ, L.Y.; RICHARDS, R.J.; CEFALU, W.T. Complications of type 1 diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, p. 625-40, 2010.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.41, n.2, p. 121-142, 2005.

OLIVEIRA, L. F. Atualização em mecanismos e Fisiopatologia da dor. **In: Primer simposio virtual de dolor, medicina paliativa y avances en farmacologia del dolor**. La Plata:Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de La Plata, 2001.

OLIVEIRA, L. M. DORES. In: Lent, R. **Neurociência da Mente e do Comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan. Cap. 8, p. 183-201, 2008.

PABBIDI, R. M. et al. Direct role of streptozotocin in inducing thermal hyperalgesia by enhanced expression of transient receptor potential vanilloid 1 in sensory neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 995-1004, 2008a.

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.

PALMER, J. P. et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. **Science**, v. 222, p.1337-1339, 1983.

PATEL, N. J. et al. Glucose and leucine uptake by rat dorsal root ganglia is not insulin sensitive. **Journal of the neurological sciences**, v. 121, n. 2, p. 159-162, 1994.

PATEL, N. B. Physiology of pain. In: KOPF, A.; PATEL, N. B. **Guide to pain management in low-resource settings**. Amsterdam: Internacional Association for the Study of Pain, Cap. 3, p.13-18, 2010.

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

PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. Are the β -cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?. **Diabetes**, v. 45, n. 3, p. 273-283, 1996.

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

RABINOVITCH, A. L. E. X. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 2093-2099, 1996.

RAOUF, R.; QUICK, K.; WOOD, J.N. Pain as a channelopathy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3745–3752, 2010.

REES, D. A. Alcolado JC. **Animal models of diabetes mellitus**. Diabet Med. 2005.

REUSSER, F. Mode of Action of Streptozotocin. **Journal of Bacteriology**, v. 105, n. 2, p. 580-8, 1971.

RODRIGUES, P. V. **Comparação entre estreptozotocina e aloxana como indutores de diabetes experimental para estudos dos mecanismos envolvidos na neuropatia diabética**. 2018.78f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2018.

ROMANOVSKY D. et al. Relevance of hyperglycemia to early mechanical hyperalgesia in streptozotocin induced diabetes. **J Peripher Nerv Syst**, v. 9, p. 62-69, 2004.

ROZA, C. et al. The tetrodotoxinresistant Na⁺ channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. **The Journal of Physiology**, v. 550, p. 921-926, 2003.

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

SHOUDAI, K. et al. Thermally active TRPV1 tonically drives central spontaneous glutamate release. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 43, p. 14470-14475, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA et al. Diabetes mellitus gestacional. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 6, p. 477-480, 2008.

SUN, W. et al. Gastrodin inhibits allodynia and hyperalgesia in painful diabetic neuropathy rats by decreasing excitability of nociceptive primary sensory neurons. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. e39647, 2012.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiol. Res.**, v. 50, p. 536-546, 2001.

SZALLASI, A. et al. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 5, p. 357-372, 2007.

TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**, v. 21, n. 3, p. 531-543, 1998.

VAN DER AUWERA, B. A. R. T. Genetic susceptibility for insulin-dependent diabetes mellitus in Caucasians revisited: the importance of diabetes registries in disclosing interactions between HLA-DQ-and insulin gene-linked risk. Belgian Diabetes Registry. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80, n. 9, p. 2567-2573, 1995.

WEAVER, D. C. et al. Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets of Langerhans. **Diabetes**, v.27, p.1205-14, 1978b.

WOOLF, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: Implications for diagnosis and therapy. **Life Sciences**, Oxford, v. 74, p. 2605-2610, 2004.

WOOLF, C. J.; MAX, M. B. Mechanisms-based pain diagnosis. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 95, p. 241-249, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy. Geneva, 2013.

YAMAMOTO, H. et al. Pharmacological characterization of standard analgesics on mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 57, p. 403-8, 2009.

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

ANEXO



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 161/18 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 077/18

Projeto Pesquisa: "Avaliação dos efeitos diretos de aloxana e estreptozotocina sobre neurônios nociceptivos em culturas primárias de gânglios da raiz dorsal de ratos."

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, 02 de Outubro de 2018