



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - FISILOGIA E FARMACOLOGIA

WILLIAM VALADARES CAMPOS PEREIRA

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA
PI3K γ /AKT/NO/GMPC/CANAIS PARA POTÁSSIO
SENSÍVEIS AO ATP NO CONTROLE ENDÓGENO DA DOR
NEUROPÁTICA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA EM
CAMUNDONGOS OBESOS**

Belo Horizonte
2021

WILLIAM VALADARES CAMPOS PEREIRA

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA
PI3K γ /AKT/NO/GMPC/CANAIS PARA POTÁSSIO
SENSÍVEIS AO ATP NO CONTROLE ENDÓGENO DA DOR
NEUROPÁTICA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA EM
CAMUNDONGOS OBESOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero

043

Pereira, William Valadares Campos.

Investigação da participação da via PI3K γ /AKT/NO/GMPc/canais para potássio sensíveis ao ATP no controle endógeno da dor neuropática induzida por dieta hiperlipídica em camundongos obesos [manuscrito] / William Valadares Campos Pereira. – 2021.

85 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Diabetes Mellitus Tipo 2. 3. Neuropatias Diabéticas. 4. Dor / prevenção & controle. 5. Analgesia. I. Romero, Thiago Roberto Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA TESE N° 337 DE WILLIAM VALADARES CAMPOS PEREIRA

Às 13:30 horas do dia 08 do mês de junho de 2021, transmitida através de webconferência do Google Meet, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **William Valadares Campos Pereira**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Adriana Cristina Soares de Souza**, CCO/Universidade Federal de São João del-Rei, **Profa. Dra. Luciana Souza Guzzo Costa**, FARMACIA/Universidade Federal de Juiz de Fora, **Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Investigação da Participação da Via PI3Ky/AKT/NO/GMPc/canais Para Potássio Sensíveis ao ATP no Controle Endógeno da Dor Neuropática Induzida por Dieta Hiperlipídica em Camundongos Obesos**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 08 de junho de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Stéfany Bruno de Assis Cau**, Professor do Magistério Superior, em 17/06/2021, às 16:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Cristina Soares de Souza**, Usuário Externo, em 17/06/2021, às 16:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sergio Henrique Sousa Santos**, Professor do Magistério Superior, em 17/06/2021, às 19:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Roberto Lima Romero**, Professor do Magistério Superior, em 19/06/2021, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Souza Guzzo Costa**, Usuário Externo, em 03/08/2021, às 12:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0789274** e o código CRC **95761EF1**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me segurar em seus braços nos momentos mais difíceis e acalmar minha mente nos dias de desânimo e desesperanças. À minha mãe Aparecida, que mesmo sem entender ao certo o que era um doutorado, rezou incansavelmente para que eu tivesse forças para cumprir essa etapa. Ao meu pai Matuzalém, que mesmo de longe, sempre se preocupou com meu estado físico e emocional, estando o mais presente que conseguiu. Aos meus irmãos, Gleica e Wendell, fontes de grande inspiração pessoal e profissional, pilar de amor, carinho e consolo. À Renata, pelas noites de companhia na montagem das dietas e por me amparar sempre que pensei em desistir.

Aos meus sobrinhos, Diogo e João Paulo, por terem renovado a energia de nossas famílias, à Livinha por nos presentear com esses amores. Aos meus amigos, Pablinho (saudosos), Luis, Athos, Fabrício, Renato, Lucas, Paulo, Erick e Jony, pelas conversas e risadas aleatórias, essas coisas aliviam a vida.

Ao meu orientador Thiago Roberto Lima Romero por me orientar como aluno e pessoa ao longo desses quatro anos, por me mostrar que a ciência e a religiosidade podem caminhar juntas, obrigado por me ensinar a insistir nas pessoas, a ser tolerante e enxergar as qualidades, mesmo nos momentos mais difíceis, onde o erro parece ser mais importante que os acertos, gratidão!

A todos os professores e colegas de laboratório de Dor e Analgesia (LDA): Prof. Igor Dimitri Gama Duarte, Profa. Andrea de Castro Perez, à Renata, Daniel, Raquel, Vanessa, Amanda, Thamyris, Thaís, William Gonçalves, Caio, Bárbara que me acolheram com leveza desde o primeiro momento, obrigado por toda a troca de experiência, pelos ensinamentos e risadas, pelo clima leve do LDA, em especial aos meus novos irmãos de consideração, Douglas Lamounier de Almeida e Danielle Diniz Aguiar, pessoas que sempre me deram suporte técnico e emocional, vocês são um presente que o doutorado me agraciou e que levarei para a vida.

À Profa. Giselle Foreaux Heida e Celso Martins Queiroz-Junior do Laboratório de Biologia Translacional, pela parceria e ensinamentos das técnicas de histopatologia e imunohistoquímica, obrigado por todo o apoio.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia, pelo aprendizado, por me formarem um profissional mais crítico e pelas experiências científicas incríveis que me possibilitaram participar. Aos colegas de Pós-graduação pelo companheirismo e convívio agradável, aos servidores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Rinaldo do Nascimento, Cyntia Menezes e Thiago Abílio por todo o suporte e disponibilidade. E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

PEREIRA, William Valadares Campos. **Investigação da participação da via $\pi 3ky/akt/no/gmpc$ /canais para potássios sensíveis ao atp no controle endógeno da dor neuropática induzida por dieta hiperlipídica em camundongos obesos.** 2021. 86 páginas. Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia

RESUMO

A Diabetes mellitus (DM) é uma das doenças crônicas mais documentadas no mundo e afeta mais de 100 milhões de pessoas no planeta. Possui como característica principal a hiperglicemia crônica, resultante da ausência da produção de insulina ou da resistência à mesma. A DM tipo 2 é o tipo mais prevalente, representando cerca de 85-90% dos casos. O controle inadequado da DM compromete tecidos musculares e nervosos, cujo metabolismo depende fundamentalmente do suprimento de glicose e aumenta a probabilidade do surgimento de complicações microvasculares, como: retinopatia diabética, nefropatia diabética, neuropatia autonômica e neuropatia diabética periférica. As neuropatias diabéticas caracterizam-se pela presença de sintomas e/ou sinais de disfunção dos nervos do sistema nervoso periférico somático e/ou do autonômico em indivíduos com diagnóstico de DM. Atualmente, existe um número reduzido de tratamentos disponíveis para a dor neuropática diabética, sendo basicamente utilizados antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes, no entanto tais fármacos não possuem grande eficácia no controle da dor, com apenas 30% dos pacientes apresentando algum tipo de alívio. Neste contexto, a proposta deste estudo foi avaliar se a via $\pi 3Ky/AKT/NO/GMPc$ /canais para potássio sensíveis ao ATP, participa do controle endógeno na dor neuropática diabética. A descoberta de vias que participem de mecanismos modulatórios da dor podem trazer respostas importantes para a escolha de fármacos mais eficazes ou a criação de drogas específicas que garantam alívio satisfatório deste tipo de dor, com consequente melhoria da qualidade de vida dos pacientes. A dor neuropática diabética foi induzida por dieta hiperlipídica (HFD 40%), os animais foram alimentados por 12 semanas até o surgimento da hiperalgesia, este fenômeno foi então acompanhado do diagnóstico de obesidade, resistência à insulina e intolerância à glicose, representando assim um modelo semelhante à DM tipo 2 em humanos. A hiperalgesia foi testada por meio do método de compressão mecânica da pata e para confirmar que a dor frente ao estímulo mecânico possui características neuropáticas e não apenas inflamatórias, realizou-se a histopatologia da pata e do nervo ciático dos animais do grupo controle e alimentados com a dieta diabetogênica. Os resultados encontrados foram satisfatórios para a comprovação de que a dor evocada pela dieta possui características tipicamente neuropática. Registros de desorganização do tecido conjuntivo do epineuro/perineuro, axônios retraídos e posicionados excentricamente, aumento do espaço correspondente à mielina e perda axonal foram observados, mostrando assim a eficácia do modelo na indução da dor neuropática diabética. Para as análises estatísticas dos testes farmacológicos utilizaram-se o teste *two-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni e para a quantificação das alterações morfológicas por análise histopatológica e imunohistoquímica, utilizou-se o teste T pareado. Todas as drogas foram administradas pela via intraplantar. Para a avaliação da participação da via $\pi 3k$, foi utilizado AS-605240, inibidor seletivo de $\pi 3Ky$ nas dosagens de 90 e 180 μg /pata, observou-se que $\pi 3Ky$ quando inibida não modulou a nocicepção induzida

pela dieta hiperlipídica. Para a determinação da expressão das proteínas p-AKT/total AKT, utilizou-se a técnica de Western Blot e para isso foram coletados coxins plantares dos animais do grupo controle e alimentados com a dieta diabetogênica. Verificou-se diferença estatística significativa na expressão da proteína p-AKT, que representa a forma ativa desta proteína, a mesma, encontra-se expressa em menor quantidade nos animais acometidos pela dor neuropática diabética (DND), o que reforça a não participação desta via na modulação endógena na dor investigada. Para avaliação da participação da via de sinalização do óxido nítrico foram utilizadas as drogas L-NOarg, inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase, nas doses de 24 e 48 µg/pata e o ODQ, inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel, nas doses de 100 e 200 µg/pata, em nenhum dos casos, observou-se redução do limiar nociceptivo caracterizando que não houve modulação endógena na dor neuropática diabética quando utilizado, L-NOarg ou ODQ, estes achados demonstram que a via do óxido nítrico não participa da modulação endógena da dor investigada. Seguiu-se para a análise da participação seletiva destes canais, desta forma, foi utilizada a glibenclamida, bloqueador seletivo de canais para potássio sensíveis ao ATP, nas doses 80 e 160 µg/pata, onde observou-se redução do limiar nociceptivo nos animais com dor neuropática diabética, o que significa que estes canais participam endogenamente na tentativa de controle da dor neuropática diabética. Após esses achados, investigou-se a expressão dos canais para potássio sensíveis ao ATP, com intuito de observar se, em um cenário de DNP induzido exclusivamente por dieta rica em gordura, estes apresentavam sua expressão alterada, para isso, foi realizada a imunohistoquímica dos coxins plantares, os quais foram marcados com Kir 6.2, um marcador de canais para potássio sensíveis ao ATP e os resultados encontrados apresentaram aumento da expressão destes canais, o que acredita-se ser uma estratégia de alteração funcional do sistema endógeno, na tentativa de controle da dor. Para determinação da atividade de canais para potássio sensíveis a voltagem (Kv), foi utilizado o Tetraetilamonio, bloqueador seletivo de Kv na dose de 30 µg, onde observou-se modulação do limiar nociceptivo dos animais acometidos pela dor neuropática diabética. A partir destes achados, investigou-se também a participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de baixa e alta condutância. Para tais análises utilizou-se respectivamente, Dequalíneo (bloqueador seletivo de canais para potássio sensíveis ao cálcio de baixa condutância), na dose de 50 µg/pata e Paxilina (bloqueador seletivo de canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância), na dose de 20 µg/pata. O limiar nociceptivo dos animais com dor neuropática diabética não sofreu alteração com a administração dos fármacos supracitados, descartando assim a participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio na modulação endógena da dor neuropática diabética. Os resultados fornecem evidências de que a dor evocada pelo modelo de indução exclusivamente por dieta hiperlipídica possui característica neuropática. Além disso, observou-se que a via PI3Kγ/AKT/NO/GMPc não participa endogenamente do controle da dor neuropática diabética, no entanto, os canais para potássio sensíveis ao ATP e a voltagem, modulam endogenamente a dor supracitada, o bloqueio destes canais reduziu o limiar nociceptivo dos animais acometidos pela dor, além disso, a expressão de KATP encontra-se aumentada. Nossa hipótese é que o aumento da expressão destes canais sejam uma adaptação fisiológica funcional do sistema endógeno periférico, uma tentativa de controle da dor neuropática diabética e que fármacos que potencializem a abertura destes canais podem contribuir com o controle da dor neuropática diabética. APOIO FINANCEIRO: CAPES. PROTOCOLO CEUA: 57/2017. APOIO FINANCEIRO: CAPES. PROTOCOLO CEUA: 57/2017.

Palavras-chave: Obesidade, Síndrome metabólica, Neuropatia diabética, Canais de potássio.

PEREIRA, William Valadares Campos. **Investigation of the participation of the pi3ky / akt / no / gmpc / atp-sensitive potassium channels in the endogenous control of neuropathic pain induced by a high-fat diet in obese mice.** 2021. 86 páginas. Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is one of the most documented chronic diseases in the world and affects more than 100 million people on the planet. Its main characteristic is chronic hyperglycemia, resulting from the absence of insulin production or its resistance, type 2 DM is the most prevalent type, representing about 85-90% of cases. Inadequate DM control compromises muscle and nerve tissues, the metabolism of which depends fundamentally on the supply of glucose and increases the likelihood of the appearance of microvascular complications, such as: diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, autonomic neuropathy and peripheral diabetic neuropathy. Diabetic neuropathies are characterized by the presence of symptoms and / or signs of somatic and / or autonomic nervous system nerve dysfunction in individuals diagnosed with DM. Currently, there is a reduced number of treatments available for diabetic neuropathic pain, and basically tricyclic antidepressants and anticonvulsants are used, however, these drugs are not very effective in controlling pain, with only 30% of patients showing some type of relief. In this context, the purpose of this study was to evaluate whether the PI3K γ / AKT/ NO/ cGMP/ channels for potassium sensitive to ATP, participates in endogenous control in diabetic neuropathic pain. The discovery of pathways that participate in modulatory mechanisms of pain can bring important answers to the choice of more effective drugs or the creation of specific drugs that guarantee satisfactory relief of this type of pain, with a consequent improvement in the quality of life of patients. Diabetic neuropathic pain was induced by a high-fat diet (HFD 40%), the animals were fed for 12 weeks until the onset of hyperalgesia, this phenomenon was then accompanied by the diagnosis of obesity, insulin resistance and glucose intolerance, thus representing a model similar to type 2 DM in humans. Hyperalgesia was tested using the mechanical paw compression method and to confirm that the pain at the mechanical stimulus has neuropathic and not just inflammatory characteristics, the histopathology of the paw and the sciatic nerve of the animals in the control group and fed with diabetogenic diet. The results found were satisfactory to prove that the pain evoked by the diet has typical neuropathic characteristics, records of disorganization of the connective tissue of the epineurium / perineurium, axons retracted and positioned eccentrically, an increase in the space corresponding to myelin and axonal loss were observed, guaranteeing thus the effectiveness of the model in the induction of diabetic neuropathic pain. For pharmacological tests, statistical analyzes used two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test, for the quantification of morphological changes by histopathological and immunohistochemical analysis, a paired T test was used. All drugs were administered via the intraplantar route. To assess the participation of the PI3k pathway, AS-605240 was used, a selective inhibitor of PI3K γ in the dosages of 90 and 180 μ g / paw, it was observed that PI3K γ when inhibited did not modulate the nociception induced by the hyperlipidic diet. For the determination of the expression of

p-AKT / total AKT proteins, the Western blot technique was used and for this purpose plantar cushions were collected from the animals of the control group and fed with the diabetogenic diet. There was a statistically significant difference in the expression of the p-AKT protein, which represents the active form of this protein, the same, it is expressed in a smaller amount in animals affected by diabetic neuropathic pain (DNP), which reinforces the non-participation of this via endogenous modulation in the investigated pain. To evaluate the participation of the nitric oxide signaling pathway, the drugs L-NOarg, a non-selective inhibitor of the enzymes nitric oxide synthase, were used at doses of 24 and 48 µg / paw and ODQ, a selective inhibitor of the enzyme soluble guanylate cyclase, in doses of 100 and 200 µg / paw, endogenous modulation was not observed in diabetic neuropathic pain when used, L-NOarg or ODQ, meaning that the nitric oxide pathway does not participate in the endogenous modulation of the investigated pain. We proceeded to the analysis of the selective participation of these channels, thus, we used glibenclamide, a selective blocker of potassium channels sensitive to ATP, at doses 80 and 160 µg / paw, where a reduction in the nociceptive threshold was observed in animals with neuropathic pain diabetic, which means that these channels participate endogenously in the attempt to control diabetic neuropathic pain. After these findings, he investigated the expression of ATP-sensitive potassium channels, with the aim of observing whether, in a scenario of DNP induced exclusively by a high-fat diet, they showed their altered expression, for this, immunohistochemistry of the cushions was performed. plants, these were marked with Kir 6.2, a marker of potassium channels sensitive to ATP and the results found, showed an increase in the expression of these channels, which is believed to be a strategy of functional alteration of the endogenous system, in an attempt to control the ache. To determine the activity of voltage-sensitive potassium channels (Kv), Tetraethylammonium, a selective blocker of channels for Kv, was used at a dose of 30 µg, where modulation of the nociceptive threshold of animals affected by diabetic neuropathic pain was observed. Based on these findings, the participation of low- and high-conductivity calcium channels for potassium was also investigated. For such analyzes, Dequalíneo (selective blocker of potassium channels sensitive to calcium of low conductance) was used, respectively, in the dose of 50 µg / paw and Paxilína (selective blocker of channels for potassium sensitive to calcium of high conductance), in the dose 20 µg / paw. The nociceptive threshold of animals with diabetic neuropathic pain did not change when any of the aforementioned drugs were administered, thus ruling out the participation of calcium-sensitive potassium channels in the endogenous modulation of diabetic neuropathic pain. The results provide evidence that the pain evoked by the induction model exclusively by high-fat diet has a neuropathic characteristic. In addition, it was observed that the PI3Kγ/ AKT/ NO/cGMP pathway does not participate endogenously in the control of diabetic neuropathic pain, however, the ATP-sensitive potassium channels and voltage, endogenously modulate the pain, blocking these channels reduced the nociceptive threshold of animals affected by pain, in addition, the expression of KATP is increased. Our hypothesis is that the increased expression of these channels is a functional physiological adaptation of the peripheral endogenous system, an attempt to control diabetic neuropathic pain and that drugs that enhance the opening of these channels can contribute to the control of diabetic neuropathic pain. FINANCIAL SUPPORT: CAPES. CEUA PROTOCOL: 57/2017.

Key words: Obesity, Metabolic syndrome, Diabetic Neuropathy, Potassium channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de ligação entre obesidade abdominal e síndrome metabólica	15
Figura 2 – Estimativa de incidência de diabetes mellitus no mundo por região em 16	
Figura 3 – Hipótese proposta para expansibilidade limitada do tecido adiposo	17
Figura 4 – Consequências funcionais da resistência à insulina do músculo esquelético.....	18
Figura 5 – Hipótese da progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica e sua relação com a resistência à insulina	19
Figura 6 – Via geral de progressão das complicações microvasculares diabéticas	20
Figura 7 – Modelos animais de indução de diabetes mellitus	22
Figura 8 – Possíveis mecanismos envolvidos no surgimento da neuropatia diabética periférica	24
Figura 9 – Tipos de dor.....	26
Figura 10 – Alteração de canais iônicos modulando a excitabilidade de neurônios nociceptivos	30
Figura 11 – Diagrama esquemático dos mecanismos potenciais da via PI3K / Akt no processamento da dor inflamatória	32
Figura 12 – Diagrama esquemático que descreve a via de sinalização de NO analgésico periférico	33
Figura 13 – Dieta padrão (Purina - Labina®) e dieta hiperlipídica (HFD 40%).....	38
Figura 14 – (Ugo Basile, Itália) Utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico	40
Figura 15 – Parte compressora do aparelho (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos	40
Figura 16 – Vias de administração das drogas (A e B)	41
Figura 17 – Diagrama esquemático do mecanismo de ação dos fármacos que agem na via PI3K γ /AKT e via NO/GMPc/KATP	41
Figura 18 – Análise histopatológica do coxim plantar de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperlipídica.....	50

Figura 19 – Análise histopatológica do nervo ciático de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperlipídica	51
Figura 20 – Análise imuno-histoquímica do coxim plantar de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperlipídica	58
Figura 21 – Mecanismos diabetogenicos envolvidos na administração de estreptozotocina.....	65
Figura 22 – Estrutura química da substância Celikalim.....	71
Figura 23 – Representação esquemática da estrutura de canais para potássio sensíveis à voltagem (KV).....	72
Figura 24 – Estrutura química da substância Retigabina	73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Avaliação temporal do peso corporal total ao longo de 13 semanas e adiposidade.....	46
Gráfico 2- Teste de sensibilidade à insulina e tolerância à glicose.....	48
Gráfico 3- Quantificação das alterações degenerativas e perda axonal do nervo ciático.....	52
Gráfico 4- Limiar nociceptivo basal no teste de retirada da pata.....	52
Gráfico 5- Teste farmacológico para análise da participação da via PI3K.....	53
Gráfico 6- Quantificação dos níveis proteicos de p-AKT /Total AKT.....	54
Gráfico 7- Teste farmacológico para análise participação da via NO.....	55
Gráfico 8- Teste farmacológico para análise da participação do GMPc.....	56
Gráfico 9- Teste farmacológico para avaliação da participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K^{ATP}).....	57
Gráfico 10- Teste farmacológico para avaliação da participação dos canais para potássio sensíveis a voltagem (K^V).....	59
Gráfico 11- Teste farmacológico para avaliação da participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de baixa condutância.....	60
Gráfico 12- Teste farmacológico para avaliação da participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Causas não diabéticas que devem ser excluídas para o manejo da dor.....	23
Quadro 2- Fármacos recomendados pela Sociedade Brasileira de Diabetes para o controle da DNP.....	27
Quadro 3- Fármacos recomendados pela Sociedade Brasileira de Diabetes para o controle da PNP.....	28
Quadro 4- Subunidades α da família de canais para potássio sensíveis ao ATP e possíveis ensaios em ratos.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína cinase específica de serina/treonina
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ATP	Adenosina trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DCNT	Doença crônica não transmissível
DM	Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DND	Dor neuropática diabética
DQ	Dequalíneo
GLUT- 4	Transportador de Glicose - 4
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HFD	High Fat diet
HNE	Hidroxinoneal
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina-6
NOS	Óxido nítrico sintase induzível
INSR	Insulin-sensitive receptor
IRS1	Insulin receptor substrate 1
K ⁺	Elemento químico potássio
KATP	Canais para potássio sensíveis ao ATP
IASP	International Association for the Study of Pain
L-NOarg	NG-Nitro-L-arginina
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos
MAO	Monoaminoxidade
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NDs	Neuropatias diabéticas
NGF	Fatores de crescimento neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOSe	Óxido nítrico sintase do tipo endotelial

NOS _n	Óxido nítrico sintase do tipo neuronal
NOS _i	Óxido nítrico sintase do tipo indutível
NOS	Óxido nítrico sintase
NT	Nitrotirosina
ODQ	1H-(1,2,4) Oxadiazolo(4,3-a) quinoxalin-1-one
<i>PAI-1</i>	<i>Inibidor-1 do ativador do plasminogênio</i>
PAX	Paxilina
PGE ₂	Prostaglandina natural E2
PI3K	Fosfatidil-inositol 3-quinase
PNP	Polineuropatia
<i>PKC</i>	<i>Protein kinase C</i>
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
<i>sICAM</i>	<i>Molécula de adesão intracelular solúvel</i>
SM	Síndrome metabólica
TEA	Tetraetilamonio
<i>TGF-β</i>	<i>Fator de transformação do crescimento-beta</i>
<i>TNF- α</i>	Fator de Necrose Tumoral <i>Alfa</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVO GERAL	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade e Diabetes

A obesidade é uma doença crônica não transmissível (DCNT), definida como um distúrbio multifatorial que possui como característica principal, o excesso de gordura corporal que gera prejuízos à saúde dos indivíduos, assume condição epidêmica no mundo e afeta indivíduos de diversas faixas etárias, inclusive crianças. Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade, entre eles estão: dietas com balanço calórico positivo, sedentarismo, redução da taxa metabólica basal, fatores genéticos e hereditários (Sahoo *et al.*, 2015).

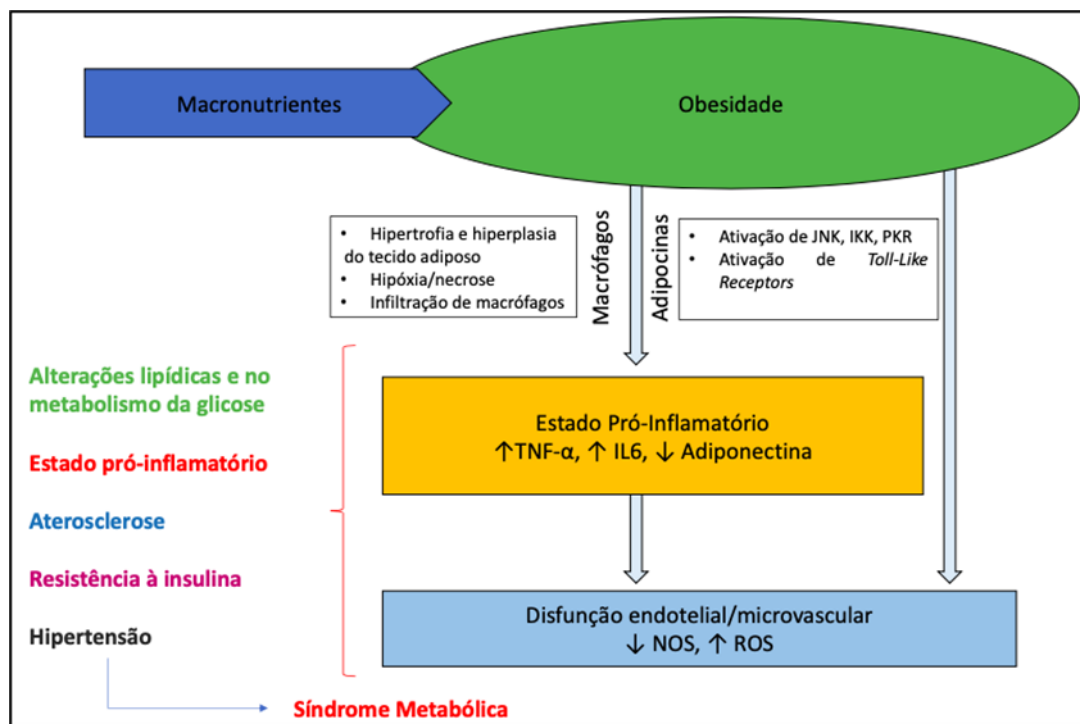
O excesso de gordura visceral decorrentes dos fatores supracitados, acarretam na liberação de quantidade aumentada de adipocinas pró-inflamatórias e suprimem a secreção de adipocitocinas anti-inflamatórias, acarretando em inflamação sistêmica conhecida como inflamação crônica de baixo grau, comprometimento o sistema metabólico e cardiovascular (Finkelstein *et al.*, 2012).

A inflamação sistêmica, proveniente do tecido adiposo visceral inflamado, resulta em níveis elevados de necrose do tecido adiposo, devido em parte à hipóxia persistida nos depósitos de gordura e ao recrutamento de macrófagos, com fenótipo inflamatório (macrófagos M1), que são recrutados e migram em direção das células necrosadas ou que sofreram apoptose (González-Muniesa *et al.*, 2017). A infiltração das células supracitadas, relacionadas à obesidade, processo inflamatório e aumento do estresse oxidativo, acarretam deficiências metabólicas nos tecidos sensíveis à insulina, culminando na resistência à insulina, falência de órgãos e envelhecimento prematuro (Daryabor *et al.*, 2020).

A inflamação sistêmica de baixo grau do tecido adiposo em indivíduos obesos, é caracterizada pelo aumento da capacidade de síntese de moléculas com ação pró-inflamatória, como a enzima óxido nítrico sintase induzível (NOSi), a proteína C reativa, o fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β), a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), a molécula de adesão intracelular solúvel (sICAM), o angiotensinogênio, inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), TNF- α , interleucina-6 (IL-6) e leptina (Ouchi *et al.*, 2011).

O cenário pró-inflamatório observado na obesidade acarreta danos estruturais e funcionais no corpo humano e é responsável por desordens fisiopatológicas que acarretam o surgimento de diversas doenças crônicas não transmissíveis (Cardoso *et al.*, 2020). A hipertensão, a resistência à insulina e a hiperglicemia em jejum são sinais característicos da síndrome metabólica (SM), um transtorno complexo usualmente associado às doenças cardiovasculares e Diabetes mellitus (DM) (Eckel *et al.*, 2010; Emanuela *et al.*, 2012).

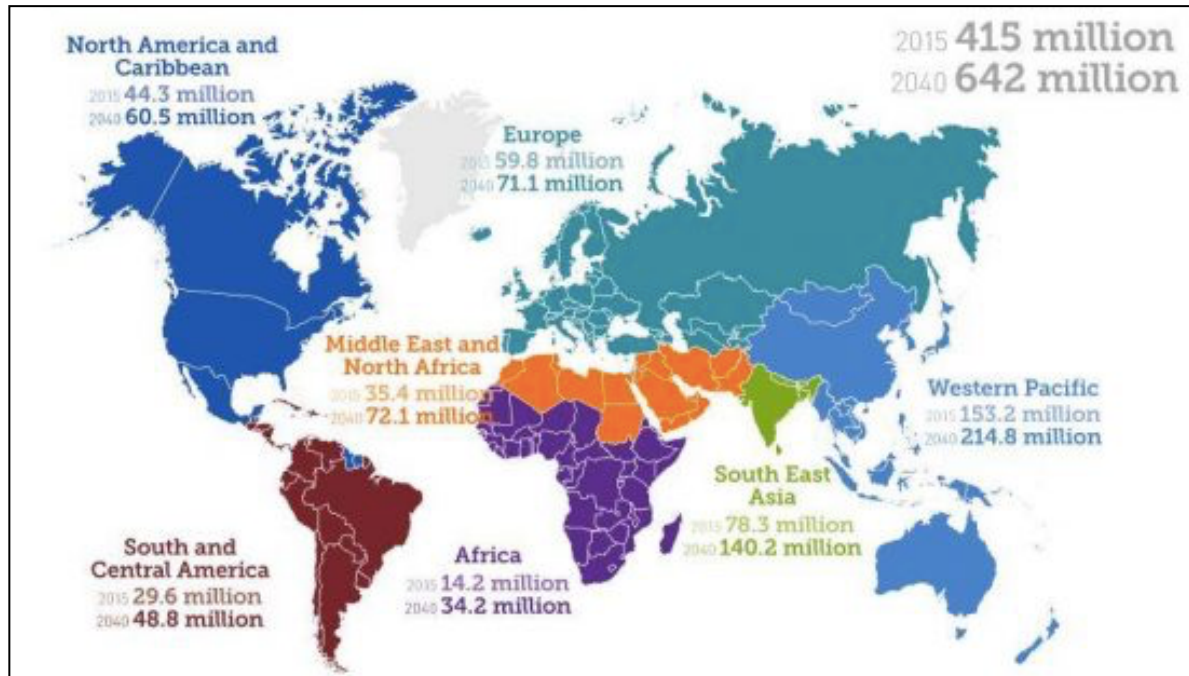
Figura 1 - Mecanismos de ligação entre obesidade abdominal e síndrome metabólica.



Fonte: Adaptado de Emanuela e colaboradores, 2012.

A DM é uma das doenças crônicas mais documentadas no mundo e afeta mais de 463 milhões de pessoas (Pereira Valadares *et al.*, 2017). Em 2017, a *International Diabetes Federation* (IDF) estimou que 8,8% da população mundial com idade entre 20 e 79 anos apresenta DM. A expectativa de aumento é superior a 628,6 milhões em 2045. Cerca de 79% dos casos vivem em países em desenvolvimento, nos quais deverá ocorrer significativo aumento de diagnósticos durante as próximas décadas (Cho *et al.*, 2018).

Figura 2 – Estimativa de incidência de diabetes no mundo por região em 2015 e 2040



Fonte: Adaptado do Google Imagens

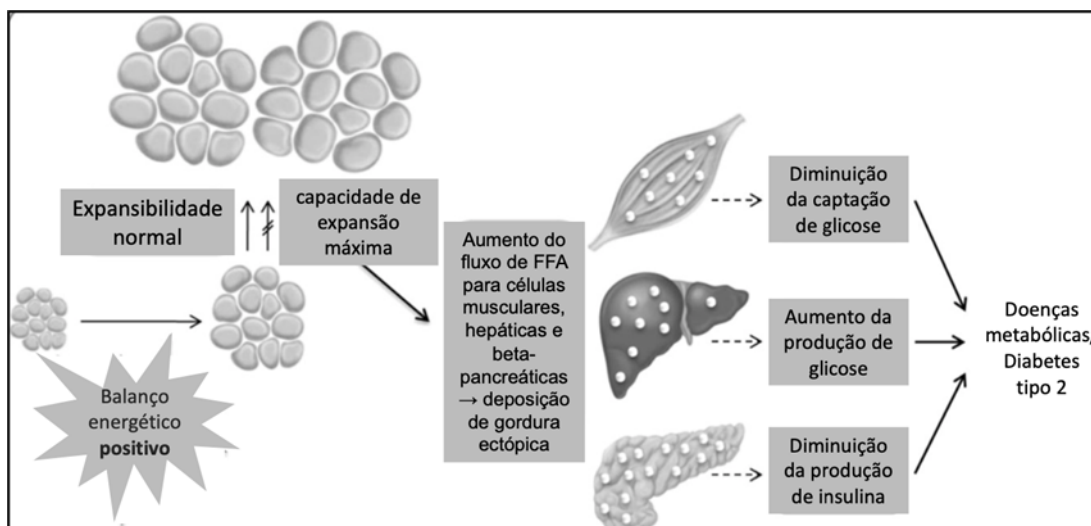
A DM é uma alteração fisiopatológica da SM (de Luca e Olefsky, 2006) e é definida como uma doença crônica não transmissível, que possui como característica principal a hiperglicemia crônica devido à ausência de insulina ou à resistência a esta. Entre os principais tipos de diabetes, a diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a mais prevalente, representando cerca de 85-90% dos casos (SBD, 2020; Taylor, 1999; Wu e Huan, 2007).

A DM1 é uma doença autoimune que causa falência das células beta pancreáticas, fazendo com o que pâncreas pare de produzir insulina definitivamente. A DM2 ocorre devido a falência das células β pancreáticas, associado à resistência à insulina (Care e Suppl, 2018). A resistência insulínica não pode ser superada pela hipersecreção de insulina inicial (hiperinsulinemia) acarretando a hiperglicemia em jejum (Taylor, 1999; Eckel *et al.*, 2005; Elias *et al.*, 2012).

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da resistência insulínica, ainda são discutidos e precisam ser plenamente elucidados; no entanto, a expansão do tecido adiposo pode ter importância central neste cenário. Humanos possuem capacidade fisiológica máxima de expansão do tecido adiposo, sendo essa,

determinada por fatores genéticos e ambientais. Ao atingir o limite de expansão, o tecido adiposo perde sua capacidade de armazenar energia de forma eficiente e os lipídios acumulam-se em tecidos não adiposos, como o fígado, músculo e outros órgãos. O excesso de ácidos graxos livres e intermediários lipídicos como o diacilglicerol (DAG) e ceramidas, possuem efeitos lipotóxicos que prejudicam a ação da insulina no músculo. Além disso, aumentam a produção de glicose hepática e posteriormente, acarretam a falência das células Beta pancreáticas (provavelmente, devido à toxicidade da glicose e lipídios acima dos valores de referência). Como resultado, há um severo prejuízo no metabolismo da glicose (Brøns e Grunnet, 2017; Petersen e Shulman, 2018).

Figura 3 – Hipótese proposta para expansibilidade limitada do tecido adiposo



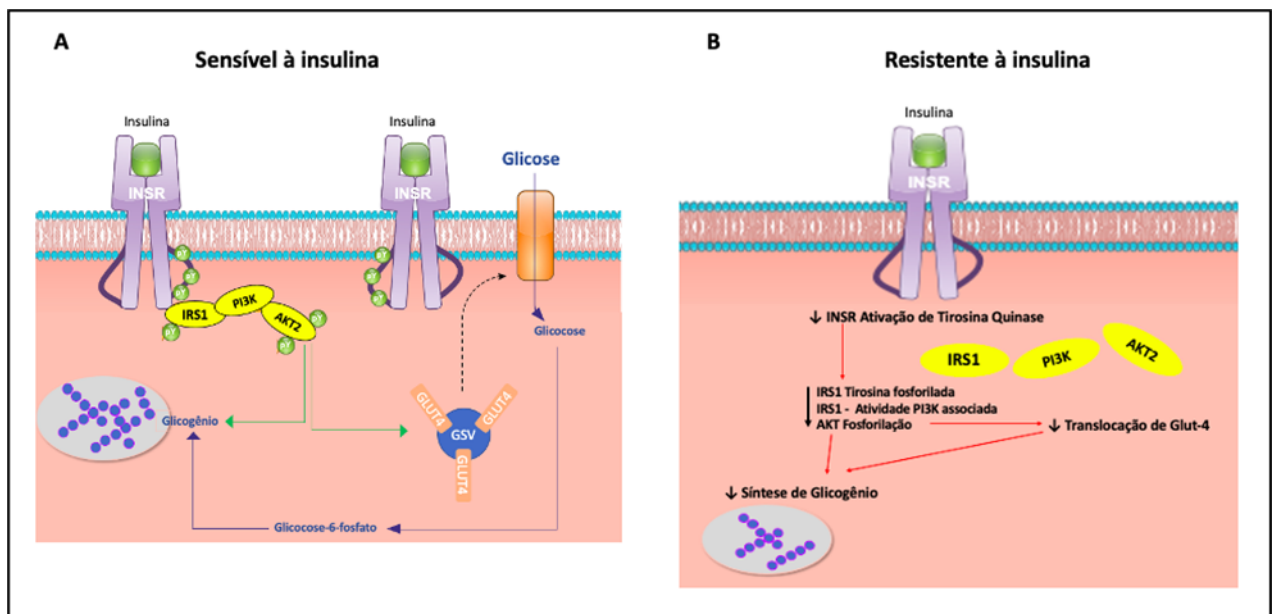
Fonte: Adaptado de Brøns and Grunnet, 2017.

Acreditava-se, que resistência à insulina poderia ser explicada apenas por falhas na ligação entre este hormônio e seu receptor (Insulin-sensitive receptor: INSR), no entanto, após o avançar da ciência, observou-se que tal fenômeno envolve também defeitos na transdução de sinal pós-receptor, ou seja, falhas diversas nos eventos de sinalização da insulina proximal, prejudicam sua capacidade de estimular a translocação de transportador de Glicose 4 (GLUT4) e a síntese de glicogênio (Petersen e Shulman, 2018).

Como apresentado anteriormente na **figura 3**, a fisiopatologia da resistência à insulina afeta principalmente três órgãos; são eles: músculo esquelético, fígado e o pâncreas (Brøns e Grunnet, 2017).

Alteração na captação da glicose pelo músculo esquelético, pode ser considerada o fator central da resistência à insulina, pois este é responsável por até 80% de utilização da glicose estimulada por insulina, durante um clamp euglicêmico hiperinsulinêmico. Prejuízos na captação celular de glicose (mecanismo controlado pelo recrutamento e translocação de GLUT-4), geram graves prejuízos à saúde. A resistência insulínica no músculo esquelético, apresenta deficiência na atividade de INSR, IRS1, PI3K e AKT, prejudicando a entrada da glicose celular e a síntese de glicogênio (figura 4) (Petersen e Shulman, 2018).

Figura 4 - Consequências funcionais da resistência à insulina no músculo esquelético

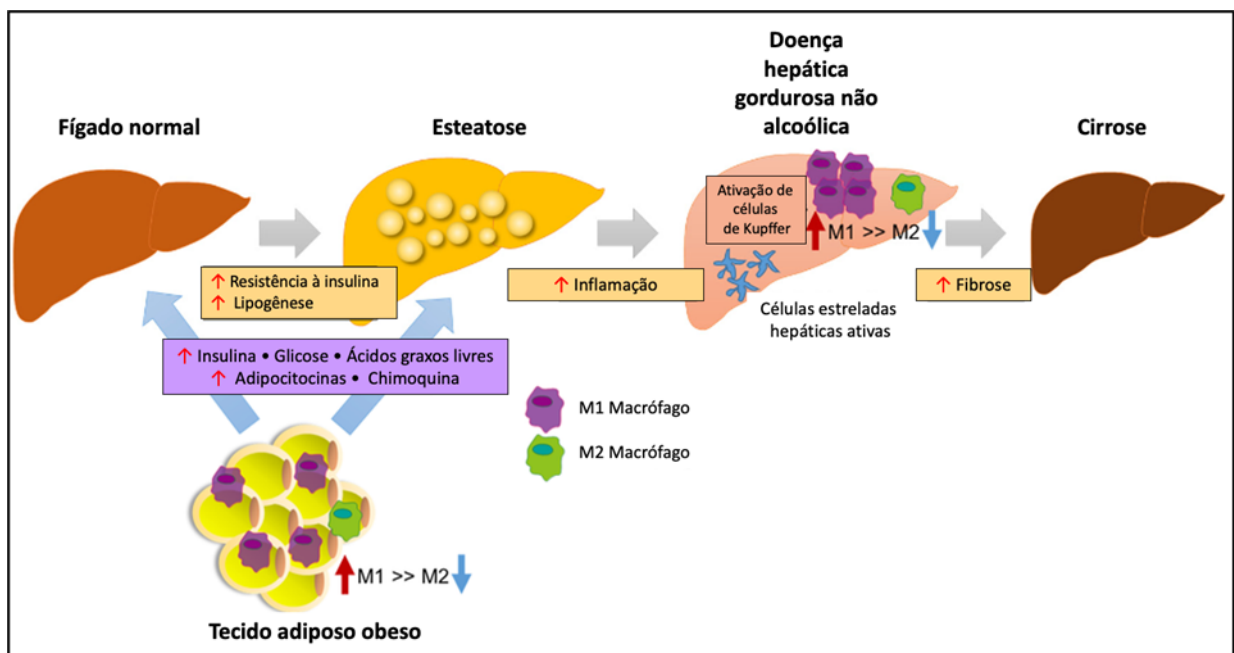


Fonte: Adaptado de Petersen e Shulman, 2018.

Como representado na figura acima, a regulação da fosforilação em tirosina induzida pela insulina (IRS1) e a atividade da PI3K e da AKT fosforilada, são moduladas devido à resistência insulínica, e como consequência, ocorre uma menor translocação de GLUT-4 e síntese de glicogênio muscular (Brøns e Grunnet, 2017; Petersen e Shulman, 2018).

Além da alteração na captação da glicose pelo tecido muscular, a resistência à insulina, a lipólise aumentada e inflamação, são responsáveis por alterações hepáticas importantes, como esteatose (doença hepática gordurosa não alcoólica) e até cirrose (Figura 5), acometendo até 80% de pacientes obesos ou com diagnóstico de DM2 (Kitade *et al.*, 2017).

Figura 5 - Hipótese da progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica e sua relação com a resistência à insulina



Fonte: Adaptado de Kitade *et al.*, 2017.

Como observado na **figura 5**, a resistência insulínica e a lipogênese, levam à maior ativação de macrófagos M1, que secretam citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6) inibindo a ação de macrófagos M2 que sustentam a sensibilidade à insulina por meio da secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-13), acarretando as disfunções hepáticas que culminam nas fisiopatologias representadas na figura 5 (Kitade *et al.*, 2017).

Além dos músculos e fígado, o pâncreas encontra-se entre os órgãos afetados pela resistência à insulina, lipogênese e inflamação, com consequente alteração no metabolismo da glicose. O pâncreas gorduroso, como mostrado na figura 3, pode contribuir para a disfunção das células β pancreáticas (Elhady *et al.*, 2019).

Matsuda e colaboradores, demonstraram que o pâncreas gorduroso estava associado ao aumento da resistência à insulina, de expressão de citocinas pró-inflamatórias e redução da massa de células β pancreáticas, sendo este último, fator determinante para a diminuição da produção de insulina observada em indivíduos acometidos pela fisiopatologia da resistência à insulina (Matsuda *et al.*, 2014), fenômeno este, observado após a tentativa do organismo de compensar a resistência adquirida com a hiperinsulinemia (SBD, 2020).

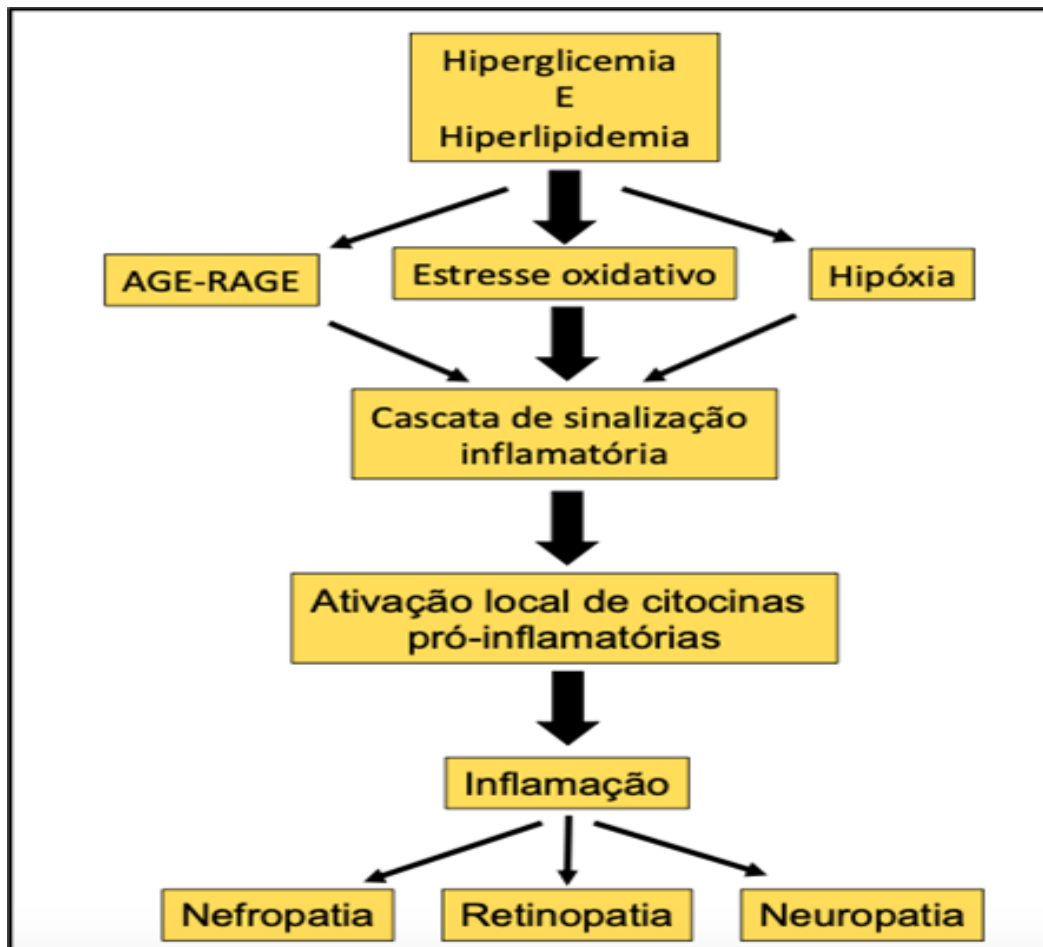
Pacientes que manifestam os sintomas do DM2 são geralmente sedentários e possuem maus hábitos alimentares, com uma dieta rica em lipídeos e açúcares (Kahn e Flier, 2000).

O controle inadequado da diabetes aumenta a probabilidade do surgimento de complicações microvasculares, sendo as mais comuns: retinopatia diabética, nefropatia diabética, neuropatia autonômica e neuropatia periférica (SBD, 2020).

O DM2 representa um fator comprometedor para tecidos musculares e nervosos, cujo metabolismo depende fundamentalmente do suprimento de glicose. Além desses tecidos, os vasos sanguíneos também sofrem diversas alterações devido ao comprometimento metabólico sistêmico (Liu *et al.*, 2012) decorrentes de aumento no estresse oxidativo (Bandeira *et al.*, 2013) e do perfil pró-inflamatório (Sytze Van Dam *et al.*, 2013).

À medida que a síndrome metabólica e a inflamação persistem, o estresse oxidativo, a hipóxia e os produtos finais de glicação avançada (AGEs) / receptor de AGE (RAGE) desencadeiam uma progressão de cascata inflamatória levando ao surgimento de complicações crônicas da diabetes devido às lesões de estruturas microvasculares (Nguyen, Shaw e Grant, 2012).

Figura 6 - Via geral de progressão das complicações microvasculares diabéticas.



Fonte: Adaptado de Nguyen e colaboradores, 2012.

Observa-se, portanto, que a obesidade, a diabetes e a hiperglicemia, criam um microambiente pró-inflamatório que progride para complicações microvasculares e inibem a função e o reparo dos tecidos afetados (Emanuela *et al.*, 2012; Nguyen, Shaw e Grant, 2012).

Modelos experimentais em animais têm desempenhado um papel fundamental na caracterização de fisiopatologias semelhantes à de seres humanos, permitindo assim a identificação de alvos terapêuticos e desenvolvimento de novas drogas. Dentre os modelos animais para indução de diabetes em ratos ou camundongos, os mais utilizados são: ratos *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF), ratos BB, *Goto-Kakizaki Rats* e modelos por indução química da diabetes (Calcutt, 2004).

Modelos de ratos *Zucker* foi descoberto em 1961 após um cruzamento de ratos *Merck* e ratos *Sherman*. Eles são caracterizados por um receptor de leptina mutado que induz hiperfagia, os animais tornaram-se obesos com 4 semanas de idade,

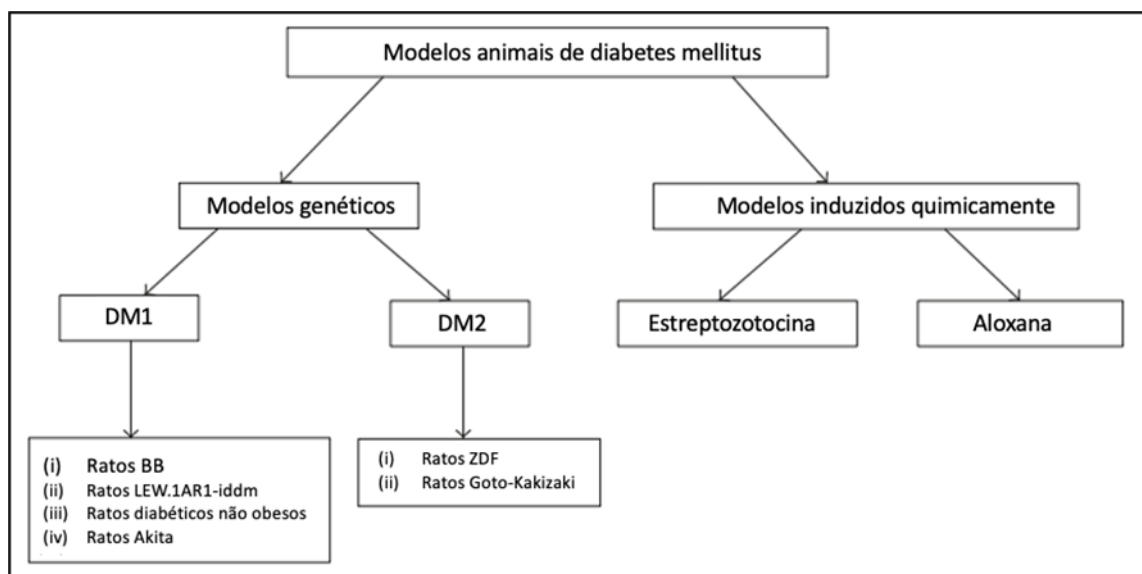
além de hiperinsulinêmicos, hiperlipidêmicos, hipertensos e apresentam tolerância à glicose diminuída. Além deste cruzamento, muitos estudos adicionam dietas com alto valor energético ou ricas em gordura associadas a este modelo, alcançando assim um modelo de DM2 (Tokuyama *et al.*, 1995).

O modelo de indução por ratos BB foi descoberto em 1974 por meio do cruzamento de ratos *Wistar* consanguíneos, os mesmos apresentam diabetes autoimune e usualmente são utilizados como modelo de diabetes tipo 1 (DM1).

O modelo de diabetes utilizando ratos *Goto-Kakizaki*, apresenta como característica uma hiperglicemia leve nas semanas iniciais de vida dos animais e não apresenta a obesidade como característica marcante, apesar disto, este modelo é considerado um modelo animal de DM2 e é consequência de herança poligênica estabelecido por endogamia repetida com ratos *Wistar* (Al-Awar *et al.*, 2016). β

Modelos por indução química representam frequentemente similaridades à fisiopatologia da DM1, a administração de drogas como streptozotocina (STZ) e aloxana, são consideradas diabetogênicas que atuam como citotóxicos da glicose que e se acumulam nas células β pancreáticas por meio do transportador de glicose 2 (GLUT2) (Lenzen, 2008).

Figura 7. Modelos animais de indução de diabetes mellitus



Fonte: Adaptado de Calcutt (2004)

1.2 Neuropatia diabética e Dor neuropática

Um estudo recente demonstrou que, apesar das neuropatias periféricas estarem comumente relacionada à indivíduos com DM, indivíduos com intolerância à glicose e normoglicêmicos, também podem ser afetados, além disso os achados deste mesmo estudo, sugerem que além dos riscos aumentados de quedas, amputações e incapacidade para o trabalho, a diminuição da sensibilidade nos pés, que ocorre devido à degeneração de neurônios sensitivos periféricos, também pode estar associada à doenças cardíacas e ser um fator de risco subestimado de morte cardiovascular na população em geral (Hicks *et al.*, 2020).

As neuropatias diabéticas (NDs) são as complicações crônicas mais prevalentes na DM, estudos mostram que mais da metade dos pacientes com DM apresentam essa neurodegeneração, que afeta diversas regiões do sistema nervoso e apresenta diversas manifestações clínicas (Boulton *et al.*, 2005; Pop-Busui *et al.*, 2017; Benzing, Chang e Schmidt, 2018). As NDs caracterizam-se pela presença de sintomas e/ou sinais de disfunção dos nervos do sistema nervoso periférico somático e/ou do autonômico em indivíduos com diagnóstico de DM.

Recebem diagnóstico de NDs os pacientes diabéticos que, após investigação, exclui-se outras possíveis causas de neuropatias, tais como as polineuropatias (PNPs) resultantes de doenças metabólicas, sistêmicas, infecciosas, inflamatórias e nutricionais, a intoxicação por agentes industriais, drogas e metais, além das neuropatias hereditárias (SBD, 2020, Pop-Busui *et al.*, 2017).

Quadro 1. Causas não diabéticas que devem ser excluídas para o manejo da dor.

Doenças metabólicas, sistêmicas, infecciosas e inflamatórias	Metabólicas: doenças tireoidiana e renal; sistêmicas: vasculite sistêmica, vasculite não sistêmica, disproteinemias e amiloidose; infecciosas: HIV, hepatite B, doença de Lyme e hanseníase; inflamatórias: polirradiculoneuropatia inflamatória desmielinizante crônica.
Aspectos nutricionais	Deficiência de vitamina B12, pós-gastropastia e deficiência de piridoxina, tiamina e tocoferol.
Intoxicação	Intoxicação por agentes industriais (acrilamida, organofosforados etc.), por drogas (álcool, amiodarona, colchicina, dapsona, alcaloides da vinca, platina, taxol etc.) e por metais (arsênico e mercúrio).
Hereditariedade	Causas hereditárias motora, sensitiva e autonômica.

Fonte: Adaptado de Pop-Busui *et al.*, (2017)

À medida que progridem, as NDs tornam-se fatores de risco para ulcerações nos pés, amputações e desequilíbrio ao andar, determinando, ainda, manifestações clínicas relacionadas aos distúrbios cardiovasculares, sudorese e aos sistemas geniturinário e gastrointestinal (Pop-Busui *et al.*, 2017).

Dentre as neuropatias diabéticas, a mais comum é a polineuropatia (PNP) difusa simétrica, que possui início insidioso, podendo comprometer apenas fibras finas, apenas fibras grossas ou ser mista (mais comum). A maioria dos pacientes com PNP somática crônica apresenta-se assintomático, mas cerca de 10% dos pacientes podem ter sintomas sensitivos incapacitantes, requerendo tratamento específico.

A dor é percebida pelos nociceptores que são terminações nervosas livres, a porção distal de fibras nervosas especializadas que têm ampla distribuição pelo corpo, tecidos diversos, como pele, mucosas, músculos e outros. Estes nociceptores são capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos e dolorosos. Estímulos como a pressão intensa, calor ou químicos são capazes de ativar os nociceptores (Julius e Basbaum, 2001).

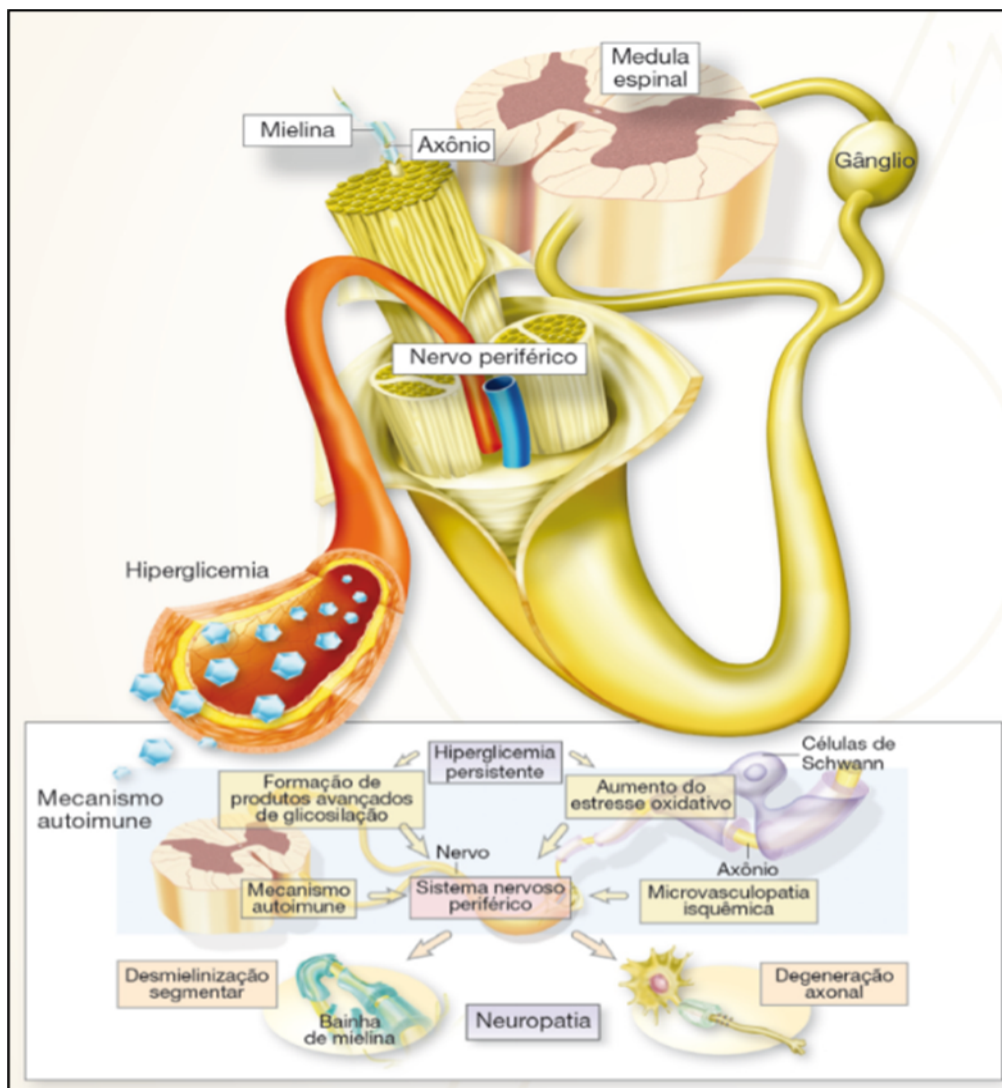
O estímulo nocivo percebido é transformado em potencial de ação, em um processo chamado de transdução. Após a transdução, ocorre o processo transmissão do estímulo, que consiste na passagem de potenciais de ação do terminal periférico ao longo dos axônios, chegando até o sistema nervoso central, pelas fibras nervosas A α e C. Tais fibras são responsivas a estímulos nocivos térmicos e/ou mecânicos, gerando sensação dolorosa localizada e específica, as fibras do tipo C são responsivas a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (Julius e Basbaum, 2001; Woolf, 2004).

A transmissão segue pelos neurônios aferentes de primeira ordem até substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinhal, onde realizam sinapses com neurônios aferentes de segunda ordem, que ascendem pela medula contralateral até o tálamo. Nessa região ocorre sinapses com os neurônios aferentes de terceira ordem, que se projetam para o córtex somatossensorial, local onde os estímulos nociceptivos são traduzidos ao nível da consciência (Vanderah, 2007).

Pacientes com PNP podem apresentar dores neuropáticas, como parestesias ou hiperestésias e alodinia. A alodinia e a hiperalgesia são sintomas frequentes e incômodos observados em pacientes que apresentam dor devido a uma doença ou

lesões no sistema nervoso. Entende-se por alodinia como dor causada por um estímulo que normalmente não provoca dor e por hiperalgesia o aumento da sensibilidade à dor causada por um estímulo que normalmente provoca dor (Schestatsky, 2008).

Figura 8. Possíveis mecanismos envolvidos no surgimento da neuropatia diabética periférica.



Fonte: Adaptado de RGR publicações, 2012.

Segundo a IASP (*International Association for the Study of Pain*) a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e/ou emocional desagradável associada a dano real ou potencial dos tecidos ou descrita em termos de tal dano”. O componente

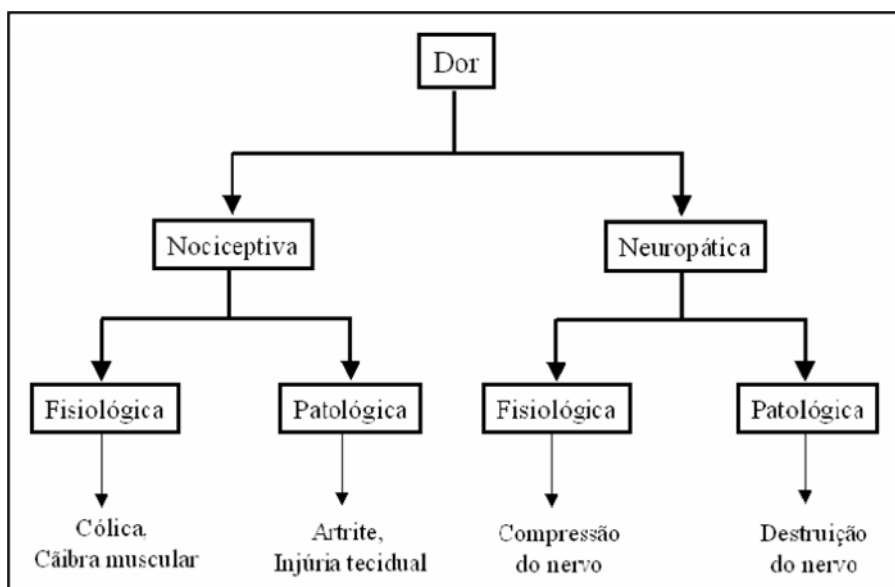
sensorial da dor é denominado nocicepção, que pode ser definida como a resposta fisiológica a uma lesão tecidual (Barke, 2019).

Existem várias formas de manifestação da dor o que faz com que a mesma possa ser classificada de acordo com vários critérios, tais como: rápida ou lenta, aguda ou crônica e alguns autores ainda a classificam como nociceptiva, inflamatória ou patológica (Fox., Hershberger, e Bouchard, 1996, Loeser e Melzack, 1999, Woolf, 1994, Schestatsky, 2008). A PNP é responsável por uma manifestação de dor crônica e patológica, a dor crônica é definida como dor que dura ou se repete por mais de três meses, e pode ser dividida em dor crônica primária, onde a dor crônica é considerada a doença em si, e dor crônica secundária, onde a dor é um sintoma de uma condição subjacente (Barke, 2019, SBD, 2020). A dor crônica secundária, está relacionada à hiperalgesia e à alodinia, além de sensibilização central (Loeser e Melzack, 1999).

A dor crônica possui grande proximidade com a dor patológica, esta perde seu caráter protetor, pois manifesta-se com perfil mal-adaptativo, resultante do funcionamento anormal do sistema nervoso. Pode ocorrer após lesões no sistema nervoso (dor neuropática), mas também em condições em que não há tal dano ou inflamação (dor disfuncional) (Patil *et al.*, 2015).

Acredita-se que a diabetes induza a dor neuropática por meio da ativação dos neurônios sensoriais do corno dorsal na medula espinhal (Ved *et al.*, 2018). Os sintomas manifestos na dor neuropática diabética decorrente da PNP são descritos como superficiais e semelhantes a uma queimadura, ou como ósseas, profundas e de rasgamento (SBD, 2020).

Figura 9. Tipos de dor



Fonte: Adaptado de Schestatsky (2008)

O exame clínico geralmente revela déficit sensitivo com distribuição originando-se nas regiões plantares dos pés e direcionando-se para as pernas (distribuição em meias). Por vezes, os sinais de disfunção motora estão presentes, com fraqueza dos músculos menores e reflexos ausentes no tornozelo (Oliveira, Júnior e Vencio, 2018, Kapur, 2001).

Quadro 2. Diferença entre dor nociceptiva e dor neuropática.

Tipo	Nociceptiva	Neuropática
Definição oficial	Dor causada por ativação de nociceptores periféricos	Dor causada por lesão ou disfunção do sistema nervoso
Mecanismo	Transdução fisiológica natural	Geração ectópica de impulsos entre outros
Localização dos Sintomas	Dor local + referida	Território da inervação da via nervosa afetada
Qualidade dos Sintomas	Sensação dolorosa comum da vida diária (bons descritores verbais)	Novas sensações, desconhecidas, aberrantes (maus descritores verbais)
Tratamento	Eficaz, analgesia convencional	Parcialmente eficaz (anticonvulsivantes, antidepressivos)

Fonte: Adaptado de Schestatsky (2008).

Existe um número reduzido de tratamentos disponíveis para a dor neuropática diabética. Basicamente são utilizados antidepressivos tricíclicos (Sindrup e Jensen, 2000) e anticonvulsivantes, no entanto tais fármacos não possuem grande eficácia no controle da dor, além de apresentarem diversos efeitos colaterais, reduzindo assim a adesão dos pacientes ao tratamento (Duby *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 2008).

A terapia orientada para o controle da dor neuropática diabética segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) baseiam-se em fármacos inespecíficos e que muitas vezes não conseguem modular a dor de forma satisfatória, portanto, além de tratamentos farmacológicos a SBD recomenda que estes sejam acompanhados de cuidados gerais como: suporte psicológico, evitar contato direto com roupas que possuam costuras diretamente sobre a pele, optar por roupas de tecido fino como o cetim, meias sem costuras grossas, entre outros (SBD, 2020).

Quanto aos tratamentos farmacológicos atualmente recomendados pela SBD, encontram-se, ligantes de subunidade $\alpha 2$ -d dos canais para cálcio, inibidores de receptação de serotonina e de norepinefrina, antidepressivos tricíclicos, além de outros fármacos como tramadol, oxicodona de liberação controlada e ácido tióctico.

Quadro 3. Fármacos recomendados pela Sociedade Brasileira de Diabetes para o controle da DNP.

Família ou fármaco	Droga	Mecanismo de ação	Efeitos adversos
Ligantes da de subunidade $\alpha 2$ - δ os de canais para cálcio	Pregabalina	Liga-se a canais de cálcio e inibe a liberação de neurotransmissores excitatórios.	Sonolência, tonturas e ganho de peso.
	Gabapentina	Modula a síntese e a liberação de ácido γ -aminobutírico (gamma-aminobutyric acid, GABA), além de alterar a secreção de neurotransmissores e os níveis plasmáticos de serotonina	Sonolência, tonturas, ganho de peso e edema periférico.
Inibidores de receptação de serotonina e norepinefrina	Duloxetina	Inibe a receptação balanceada de serotonina e noradrenalina.	Náuseas, sonolência, cefaleia e tontura. Há risco de síndrome serotonérgica com o uso de inibidores de monoaminoxidase (MAO).
	Venlafaxina	Inibe a receptação balanceada de serotonina e noradrenalina	Náuseas, sonolência, cefaleia. Há risco de síndrome serotonérgica com o uso de MAO.
Antidepressivos tricíclicos	Amitríptilina	Inibe a receptação de serotonina e de	Efeitos anticolinérgicos,

		noradrenalina.	sedação e alterações da condução cardíaca. Há risco de síndrome serotoninérgica com o uso de MAO.
Outros fármacos	Tramadol	Analgésico de ação central mecanismo de ação monoaminérgico e opioide.	Sonolência, tonturas e cefaleia. Risco de síndrome de abstinência se interrompido abruptamente.

Fonte: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2020)

Existem vários modelos de experimentação animal (ratos ou camundongos) de indução de neuropatia diabética em modelos de, dentre eles destacam-se: utilização de estreptozotocina, modelos induzidos por dieta/nutrição (dietas ricas em gordura e/ou carboidratos), modelos químicos com utilização de dieta e ainda, modelos geneticamente alterados (*ob/ob*, *knockout* para o gene da leptina ou *db/db*, *knockout* para o gene do receptor de leptina), entre outros.

Trabalhos do grupo de Comelli feitos em camundongos mostraram que a indução do diabetes com estreptozotocina levou a reduções nos níveis de glutathione reduzida (GHS) e a aumentos nos níveis de lipoperóxido em nervos ciáticos, acompanhados por reduções nos níveis de fatores de crescimento neuronal (NGF). Esses dados indicam marcantes alterações relacionadas com estresse oxidativo e com a viabilidade do nervo ciático (Comelli *et al.*, 2010).

Além disso, em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, Obrosova *et al.*, (2010) demonstraram alterações nas velocidades de condução no ramo sensitivo e no ramo motor dos nervos ciáticos de camundongos diabéticos associadas com elevações na expressão de 12/15-lipoxigenase e acúmulo de nitrotirosina (NT) e hidroxinoneal (HNE) em neurônios do gânglio da raiz dorsal.

Acredita-se que devido a um aumento no estresse oxidativo causado por acúmulo de produtos finais de glicação e por uma alta atividade de PKC, tem-se início alterações marcantes que culminam na degeneração nervosa periférica, dificultando o aporte sanguíneo para os nervos (Morales-Vidal *et al.*, 2012). É importante lembrar que indivíduos obesos desenvolvem um perfil inflamatório com altos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias que também podem estar envolvidas com a patologia da neuropatia diabética e com a lesão no nervo (Pop-Busui *et al.*, 2016).

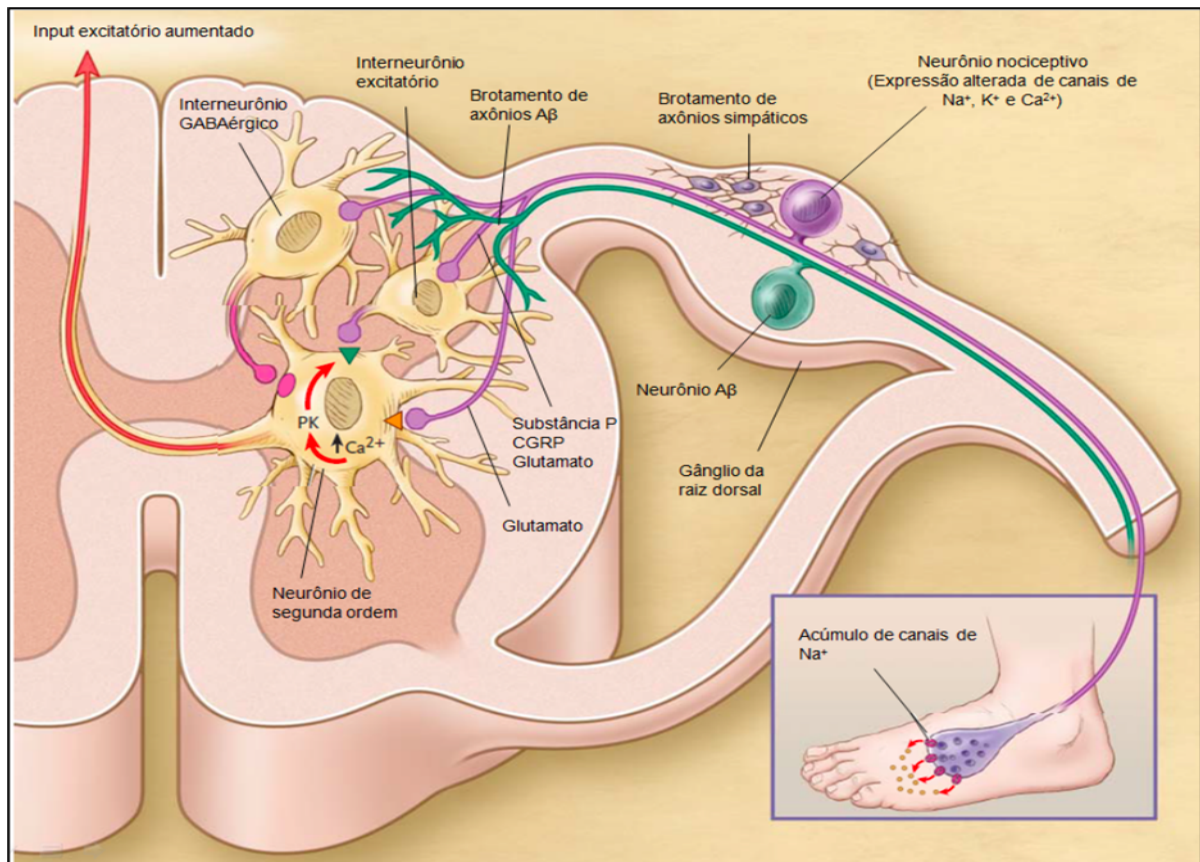
Acredita-se também que a dor neuropática diabética está associada a uma excitabilidade sustentada dos neurônios sensoriais presentes nas vias modulatórias da dor (Latremoliere e Woolf, 2010). A prevalência de dor neuropática na polineuropatia diabética simétrica distal é de aproximadamente 1-10%, dependendo do grau de envolvimento das fibras pequenas. Raramente ocorre dor na ausência de sinais e sintomas típicos de disfunção das fibras grossas, uma vez que as fibras pequenas são acometidas mais precocemente na neuropatia diabética (Schestatsky, 2008).

Os axônios longos são os primeiros a serem afetados pela diabetes, e os pacientes descrevem a dor neuropática usando termos como queimação, formigamento, dor aguda e com a sensação de agulhas (Yoo *et al.*, 2012).

Além disso, sabe-se que após a lesão de um nervo periférico, uma cascata de eventos aumenta a expressão de canais iônicos nas membranas dos neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal, principalmente canais para sódio e cálcio (Finnerup e Jensen, 2006, J R Mendell e Sahenk, 2003).

O aumento da excitabilidade desses neurônios nociceptivos causa um aumento na ativação dos neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula, tanto por meio dos receptores AMPA quanto por meio dos receptores NMDA, fazendo com que mais estímulos nociceptivos sejam levados para centros superiores, exacerbando a sensação dolorosa (Mendell e Sahenk, 2003).

Figura 10. Alteração de canais iônicos modulando a excitabilidade de neurônios nociceptivos



Fonte: Mendell e colaboradores (2003).

Na prática clínica, os fármacos utilizados para o controle da dor neuropática são potenciais bloqueadores dos canais para sódio, inibidor de enzimas e Antagonista de receptor, incluindo antidepressivos tricíclicos, carbamazepina, oxcarbazepina, fenitoína, topiramato, lamotrigina, mexiletina, e lidocaína, e inibidores potenciais do canal para cálcio, como gabapentina e a lamotrigina, no entanto, além de não gerar alívio satisfatório da dor, podem apresentar efeitos adversos indesejáveis (McQuay *et al.*, 1996).

1.3 Vias Intracelulares

Em 1965 Melzack e Wall propuseram a “Teoria do portão da dor”, de acordo com essa teoria, as fibras de maior diâmetro e as fibras de menor diâmetro se projetam para o corno dorsal da medula espinhal e interferem na transmissão dos impulsos nervosos/dolorosos. As fibras táteis, quando estimuladas, ativam interneurônios inibitórios na região que inibem a transmissão nociceptiva, impedindo a passagem do

impulso nervoso. Em contrapartida, o estímulo das fibras nociceptivas inibiria estes interneurônios inibitórios, abrindo o portão para a passagem do impulso. Na mesma década, Reynolds demonstrou experimentalmente a existência do controle endógeno da dor (também chamada de via descendente). Ao estimular a substância cinzenta periaqueductal de ratos, induziu processos endógenos analgésicos nos animais durante a cirurgia, estes não haviam sido anestesiados (Millan, 2002).

Modulações nos mecanismos de controle da dor, como alterações tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico podem resultar em dor neuropática, incluindo alteração na expressão e função dos canais para sódio e potássio, aumento do influxo celular de cálcio, alteração das resposta ao glutamato e substância P, reestruturação organizacional celular, aumento da excitabilidade neuronal, brotamento de fibras do sistema nervoso periférico, diminuição da atividade ou perda dos neurônios inibitórios, ativação da via facilitatória descendente e inibição da via inibitória descendente da transmissão dolorosa, entre outros (Sousa, 2009; Basbaum *et al.*, 2009; Austin e Moalem-Taylor, 2010).

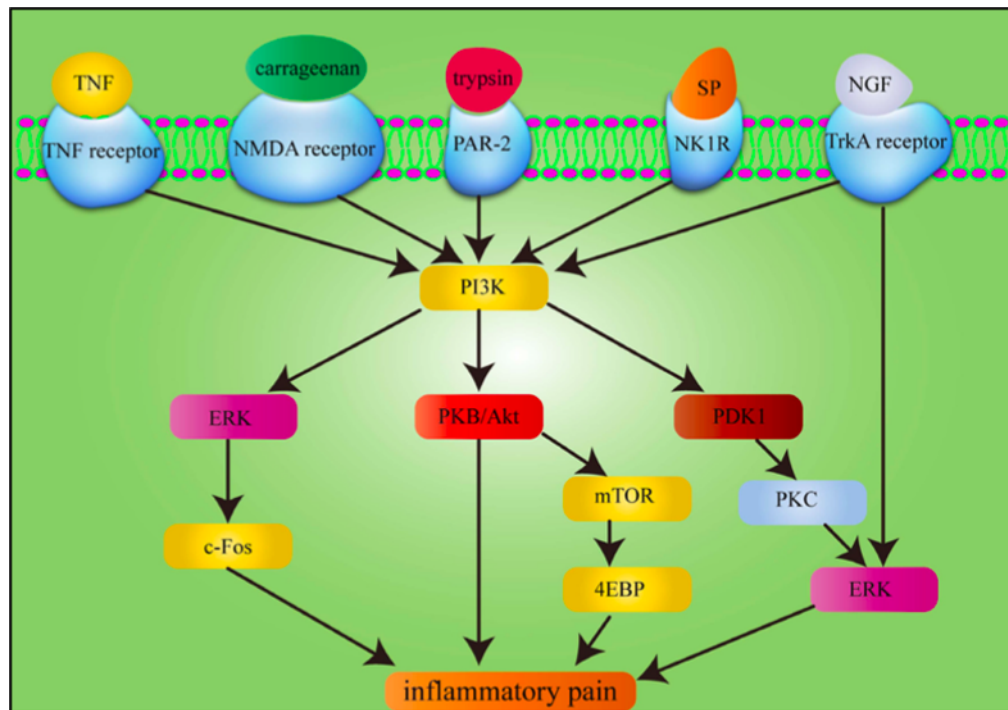
Tais alterações desencadeiam variações na síntese de neurotransmissores, na expressão e ativação de receptores e canais iônicos, levando à sensibilização periférica e central, gerando descargas ectópicas, que se amplificam e ativam células vizinhas caracterizando a dor crônica (Stein e Machelska, 2011), e normalmente se manifestam como dor intensa e persistente, podendo ser espontânea, associada a sensação de queimação e alfinetadas, hiperalgesia e/ou alodinia (Jensen *et al.*, 2011).

Além dos neurônios diretamente envolvidos na dor neuropática, as células da glia, como micróglia e astrócitos, também participam da geração e manutenção dos sintomas da dor neuropática. Estes grupos celulares liberam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, que são um dos principais componentes de mediação ou na manutenção de hiperalgesia e alodínia (Chacur *et al.*, 2001).

Diversas vias intracelulares estão envolvidas com os mecanismos modulatórios da dor, segundo Zhuang (2004) a inibição de PI3K induz hipersensibilidade ao calor no teste de retirada de pata mediante estímulo térmico, e a inibição de mTOR por meio de injeção intratecal de rapamicina em ratos Sprague-Dawley induz uma diminuição de forma dose dependente da hiperalgesia térmica em modelo de dor inflamatória induzida pela carragenina (Gregory *et al.*, 2011).

Sabe-se que a via PI3K/AKT/mTOR é uma via envolvida com plasticidade neuronal, autores demonstraram que a inflamação local na pata de animais submetidos ao teste da formalina induz aumento nos níveis de fosforilação de AKT e de mTOR no corno dorsal da medula e que o tratamento com inibidores de PI3K e AKT atenuou a resposta de contorção na segunda fase do teste de formalina (Xu *et al.*, 2011).

Figura 11. Diagrama esquemático dos mecanismos potenciais da via PI3K / Akt no processamento da dor inflamatória



Fonte: Chen *et al.* (2017)

Paralelamente, pesquisadores demonstraram a participação da via do NO na modulação da dor inflamatória (Reis *et al.*, 2009); (Costa *et al.*, 2014), o papel da sinalização do NO na neurobiologia da dor nociceptiva e patológica tem demonstrado que o NO pode ter efeitos pró e antinociceptivos no processamento da dor, dependendo de fatores como o local de ação e a concentração de NO (Change, 2003).

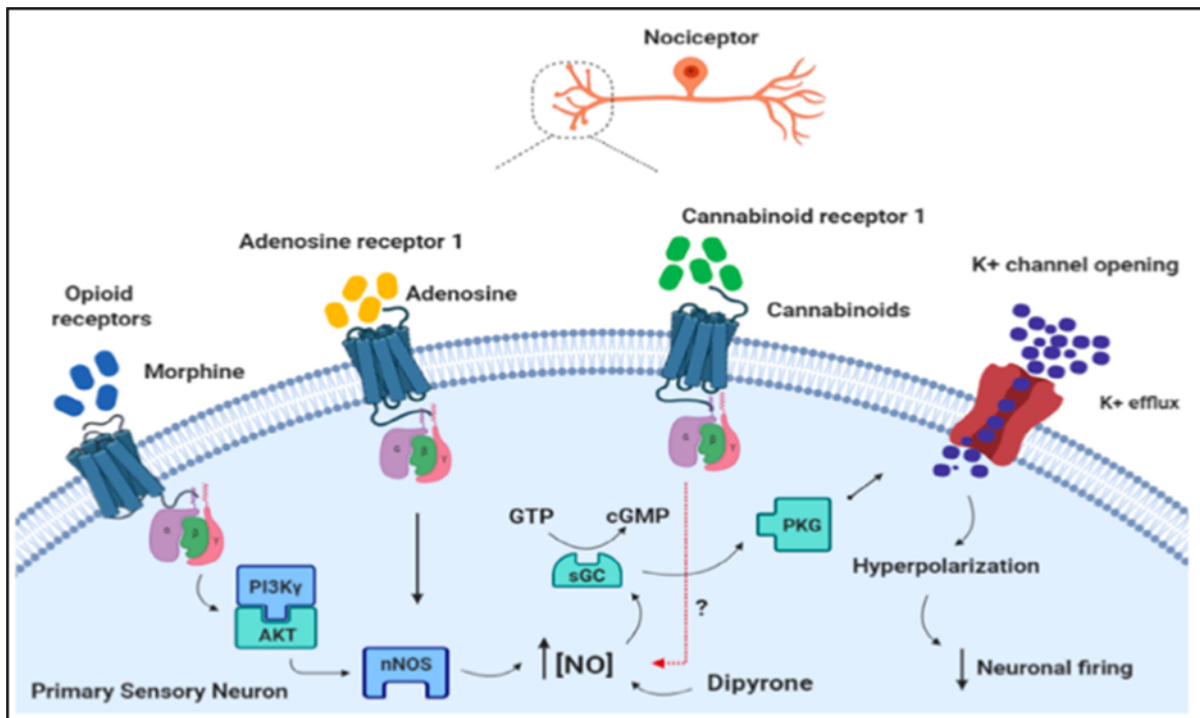
Trabalhos do nosso grupo demonstraram a participação do óxido nítrico nas respostas nociceptivas em modelos de dor inflamatória. Observou-se que o efeito antinociceptivo periférico da morfina foi perdido em camundongos geneticamente

modificados que não expressavam óxido nítrico sintase neuronal (NOSn) e a morfina induziu a produção de óxido nítrico em neurônios nociceptivos primários. A ativação da via do óxido nítrico pela morfina foi dependente de uma estimulação inicial da proteína PI3K γ /AKT (AKT) e culminou no aumento da ativação dos canais KATP.

Tang *et al.* (2007) mostraram redução nas contorções no teste da formalina mediante injeção intratecal de 1400W, um inibidor seletivo da enzima NOSi. Outros autores demonstraram que a sinalização da via do óxido nítrico periférico causou analgesia periférica na dor inflamatória. Gomes e Cunha (2020) em um modelo animal de dor neuropática pós cirurgica, observaram que a incisão cirúrgica resultou em alodinia mecânica e em níveis elevados de óxido nítrico na medula espinhal. Saad *et al.* (2016), demonstraram também que o tratamento com L-NAME, inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS) por via intraperitoneal antes da cirurgia induziu uma redução na alodinia mecânica observada.

Sabe-se que a via do NO e seu maquinário intracelular participa do processo fisiopatológico da neuropatia diabética processo esse envolvido com a cascata inflamatória já apresentada ao longo da introdução, podendo alcançar antinocicepção por meio do controle da diabetes e de fármacos inibidores desta via (Jang *et al.*, 2008). No entanto, a participação desta via na analgesia endógena da dor neuropática diabética é algo que precisa ser esclarecido.

Figura 12. Diagrama esquemático que descreve a via de sinalização de NO analgésico periférico



Fonte: Gomes e Cunha (2020)

A literatura relata que o influxo de íons pelos canais podem estar envolvidos no desenvolvimento na sensibilidade periférica da dor inflamatória, como por exemplo, os íons K^+ e H^+ , além de outros agentes como serotonina, histamina, bradicinina, já citados anteriormente (Woolf, 1994). No entanto, a literatura discute a participação dos canais para potássio como um canal envolvido em processos antinociceptivo. Sabe-se que estes canais podem ser encontrados em vários tipos de célula, como por exemplo células b pancreáticas, miócitos cardíacos, músculo vascular e outro músculo liso e neurônios. A diabetes afeta os sistemas vasculares de canais K_{ATP} , aorta e vasos cerebrais de ratos diabéticos, estes demonstraram relaxamento prejudicado aos abridores de canais K_{ATP} (Hohman, Cotter e Cameron, 2000).

Portanto, os canais para potássio parecem sofrer modulações devido ao microclima inflamatório ofertado pela diabetes e sua contribuição na analgesia endógena na dor neuropática diabética deve ser investigada.

Ambas as vias de PI3K/AKT/mTOR e de NO/GMPc/ K_{ATP} são importantes em eventos de controle dos estímulos nociceptivos e alterações nos níveis desses segundos mensageiros foram reportadas tanto em neurônios de primeira ordem no gânglio da raiz dorsal quanto em neurônios de segunda ordem no corno dorsal da

medula. Grande parte dos trabalhos mostra a participação dessas vias em modelos de dor inflamatória, porém ainda é necessário avaliar o papel dessas vias na modulação da dor neuropática diabética em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

2. JUSTIFICATIVA

A síndrome metabólica é caracterizada como um conjunto de alterações metabólicas que tem como principal componente a hiperglicemia em jejum. Como consequência dos altos níveis plasmáticos de glicose, diversas complicações cardiovasculares são observadas, bem como alterações em outros tecidos do corpo, como os nervos e órgãos.

Entre as consequências da hiperglicemia crônica está a neuropatia periférica, uma condição altamente debilitante que pode se iniciar com uma hiperalgesia patológica devido à hipersensibilidade sustentada dos neurônios nociceptivos, passando para uma fase de ausência de sensação dolorosa devido à degeneração das fibras nervosas ascendentes nociceptivas, podendo culminar em lesões nos membros superiores e inferiores, e consequente amputação, devido à ausência de sinal doloroso percebido pelos pacientes acometidos.

O Tratamento da DNP de primeira e segunda linha para neuropatia diabética dolorosa, envolvem classes de medicamentos, como: anticonvulsivantes, inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina e antidepressivos tricíclicos, no entanto, tais fármacos possuem dificuldade no controle pleno da neuropatia dolorosa diabética. Aproximadamente 30% dos pacientes acometidos por essa dor, alcançam alívio satisfatório dos sintomas dolorosos, demonstrando a necessidade de terapias mais avançadas (Feldman *et al.*, 2019).

Diversas pesquisas investigam o papel da PI3K (Pritchard *et al.*, 2016), da via do NO/GMPc (Alves *et al.*, 2013) e de canais iônicos como canais para K⁺ sensíveis ao ATP (Du e Gamper, 2013) na modulação da dor inflamatória, o que abre a possibilidade de uma possível participação destes, também na modulação da dor neuropática diabética.

Diante do exposto, o estudo das vias intracelulares responsáveis pelos eventos de modulação endógena dos estímulos dolorosos ascendentes da DNP diabética é importante para que se possa desenvolver ferramentas farmacológicas direcionadas a essas vias sinalizadoras, no intuito de controlar alguns dos sintomas relacionados à neuropatia diabética.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação da via PI3K γ /AKT/NO/GMPc/KATP nos substratos periféricos envolvidos com a modulação endógena da dor neuropática induzida por dieta hiperlipídica em camundongos.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre o estado nutricional (ingestão calórica, eficiência alimentar, peso e gordura corporal, índice de adiposidade e glicemia);
- Avaliar a resposta tecidual à insulina e o perfil de utilização da glicose de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica;
- Caracterização anatômica da neuropatia na pata e nervo ciático de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica;
- Investigar o papel da via PI3K γ /AKT/NO/GMPc e canais para potássio em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica;
- Investigar a expressão proteica de AKT em tecidos do coxim plantar em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss machos, pesando entre 30 e 35 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG (Cebio/UFMG). Os animais foram divididos em 2 grupos de animais e acomodados em caixas plásticas de dimensões 30x16x12 centímetros com cama de forragem, tendo livre acesso à ração e água. Dois dias antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos em sala controlada termicamente (22 a 24°C) e com ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas, para ambientalização.

Todos os experimentos foram realizados entre 8:00h e 17:00 h. Após os procedimentos experimentais os animais foram eutanasiados com solução de Cloridrato de Ketamina 10% (Dopalen, Vetbrands, Brasil) na dose de 50 mg/Kg e Cloridrato de Xilazina 2% (Dopaser, Calier, Brasil) com a dose de 5 mg/Kg, injetados por via intraperitoneal. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela comissão de experimentação e uso de animais (CEUA) sob o protocolo número: 57/2017.

4.2 Dietas

A obesidade foi induzida em camundongos Swiss machos por meio de dieta hiperlipídica (HFD) por 14 semanas. A dieta HFD foi preparada de acordo com os padrões da Associação Oficial de Análises Químicas, como descrito por (Oliveira Andrade *et al.*, 2014). Os macronutrientes da dieta foram pesados e homogeneizados para formar uma massa macia. As dietas foram guardadas separadamente num refrigerador em embalagens plásticas. Dieta padrão (Purina - Labina®) que foi usada para manutenção regular nos nossos camundongos é composta por 66,0% carboidratos, 23% proteínas e 11% de gordura, apresentando um total de 2,18 kcal por grama de dieta. A dieta hiperlipídica é composta por 39% de carboidratos, 17% de proteínas e 44% de gordura apresentando um total de 5,28 kcal por grama de dieta.

Todos os componentes da dieta hiperlipídica foram obtidos da Rhooster® LTDA (São Paulo, Brasil).

Figura 13. Dieta padrão (Purina - Labina®) E dieta hiperlipídica (HFD 40%)



Fonte: foto elaborada pelo autor

4.3 Testes de tolerância intraperitoneal à glicose e resistência à insulina

O teste de tolerância intraperitoneal à glicose foi adaptado de Schreyer et al (Pereira Valadares *et al.*, 2017). Após 8 semanas de dieta (grupo controle e grupos de animais que receberam dieta hiperlipídica), os animais foram submetidos a um jejum de 12h (overnight). Pela manhã, foi injetada uma solução de 25% de glicose em salina 0,9% estéril, a uma dose de 2 g de glicose/kg de peso corporal, via intraperitoneal. O sangue foi coletado para quantificação de glicose nos intervalos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após pequeno corte na ponta da cauda do animal.

O teste de sensibilidade insulínica foi realizado pela manhã, com os animais no estado alimentado, através da aplicação intraperitoneal de 0,75U de insulina/kg de peso corporal. O sangue foi coletado para quantificação de glicose nos intervalos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos após pequeno corte na ponta da cauda do animal decorridos da aplicação. Ambos os testes foram realizados utilizando um glicosímetro (Accu-Check® Active) com tiras de medição retiradas da embalagem no dia do experimento.

4.4 Medidas do peso corporal, ingestão alimentar e extração dos tecidos

A ingestão alimentar foi mensurada duas vezes por semana durante o tratamento com as dietas para obter a eficiência alimentar (ingestão alimentar/peso corporal). Animais submetidos ao jejum overnight foram eutanasiados para a coleta do sangue, coxim plantar, gânglios da raiz dorsal, corno dorsal da medula e mesencéfalo. Tecidos foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para análise subsequente.

4.5 Teste algesimétrico de mensuração de hiperalgesia na pata dos camundongos

Para realizar a medida da hiperalgesia, foi utilizado o método de retirada de pata submetida à compressão, descrito originalmente para ratos por Randall e Sellito (1957) e adaptado para camundongos por Kawabata *et al* (1992). No teste, o animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata sob teste é colocada com sua superfície plantar na parte compressora do aparelho.

A parte compressora consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se coloca a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm² na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície da pata do animal. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 10 g/centímetro marcado na régua numerada do aparelho, para camundongos, mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador, necessária para induzir uma reação de fuga do animal (reflexo de retirada de pata).

Ao observar a retirada da pata do animal, o experimentador desacionará o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, que corresponde ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g). É importante ressaltar que o animal é ambientalizado (mesmas condições do dia de testes) ao aparelho no dia que antecede o teste.

Figura 14. (Ugo Basile, Itália) Utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico



Fonte: Foto elaborada pelo autor.

Figura 15. Parte compressora do aparelho (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos.



Fonte: Foto elaborada pelo autor.

4.6 Drogas utilizadas

As drogas foram administradas por via intraplantar nas patas posteriores direita em um volume final de solução de 20 μ l/pata.

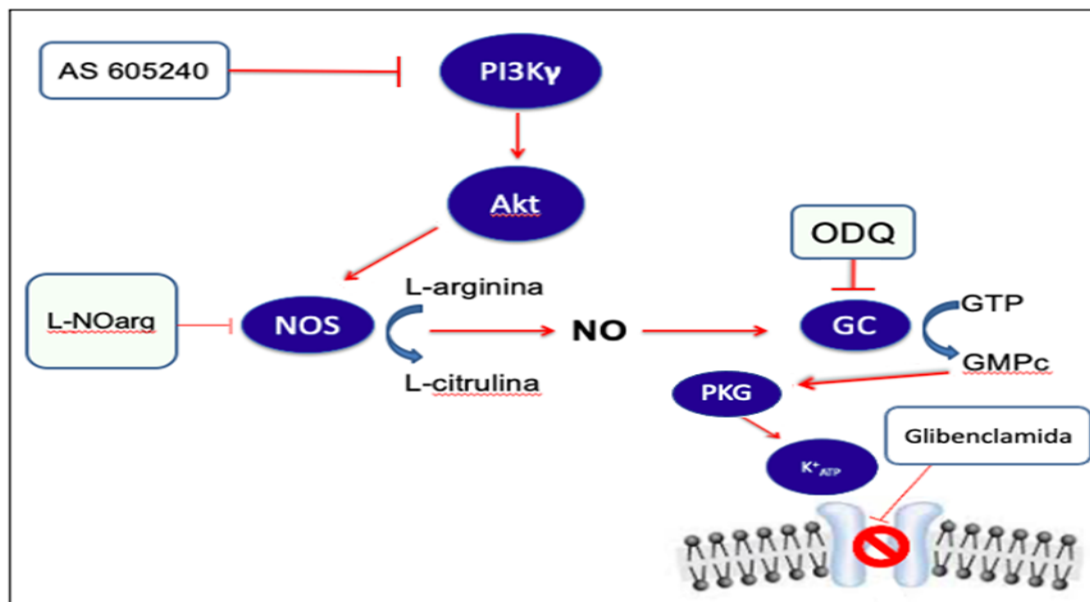
Figura 16. Vias de administração das drogas (lado esquerda via intraplantar e direito intraperitoneal)



Fonte: Adaptado Google images

Para avaliação da via PI3Ky, foi utilizada a droga AS-605240, inibidor seletivo de PI3Ky. Para avaliação da participação da via de sinalização do óxido nítrico foram utilizadas as drogas L-NOarg, inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase e o ODQ, inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel; para determinação da atividade de canais para K⁺, foi utilizada a glibenclamida, bloqueador seletivo de canais para potássio sensíveis ao ATP.

Figura 17. Diagrama esquemático do mecanismo de ação dos fármacos que agem na via PI3Ky/AKT/NO/GMPc/KATP



Fonte: Esquema elaborado pelo autor.

4.7 Procedimento Experimental

O limiar nociceptivo de cada animal foi determinado antes e após a administração de cada droga. O limiar é sempre medido três vezes, sendo o resultado a média dessas medidas. As doses e os tempos de administração das drogas utilizadas foram baseados em dados da literatura e experiência de estudos prévios de nosso grupo (Romero e Duarte, 2012; Alves *et al.*, 2013; De Carvalho Veloso *et al.*, 2015; Nerry e Cunha, 2020).

O inibidor seletivo das enzimas PI3Kγ (AS-605240), o inibidor não seletivo das isoformas da enzima NO-sintase (L-NOArg), foram administrados 30 minutos antes da segunda medida, o inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel (ODQ) foi administrado 10 minutos depois da segunda medida. O bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP (glibenclamida) foi administrado 5 minutos antes da segunda medida.

O bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis a voltagem (Tetraetilamonio) foi administrado 30 minutos antes da segunda medida, o bloqueador seletivo de canais para cálcio de baixa condutância (Dequalíneo) e o bloqueador dos canais para cálcio alta condutância (Paxilína), foram administrados 5 minutos antes da segunda medida.

4.8 Quantificação das proteínas AKT pela técnica de Western Blot

Para a determinação da expressão das proteínas p-AKT/total AKT pela técnica de Western blot foram coletados coxins plantares e estes foram homogeneizados com um homogenizador de tecidos tipo turrax (Marconi®, Brasil) em presença de tampão RIPA (0.05M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.25% deoxycholic acid, 1% NP-40, 10mM EDTA, 0,3 % de Triton X-100, 0,5% de SDS) acrescido de 1mM Fluoreto de Fenilmetanosulfonila (PMSF), 1mM Ortovanadato de sódio, 1mM fluoreto de sódio, e de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma).

Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método de Bradford. As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6,8, 3% Glicerol, 1% SDS, 0,6% β -mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) e aquecidas a 95 °C por 10 minutos. Para separação, foram aplicados 50 μ g de proteína em gel depoliacrilamida 10% SDS-PAGE.

Após serem separadas no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (GE Healthcare®, USA) com poro de 0,45 μ m. Após o bloqueio (2h em TBS-Tween 0,1% mais 5% de albumina bovina), a membrana foi incubada “overnight” em câmara fria (6-8 °C), com o anticorpo primário específico diluído em 3% de albumina em TBS-Tween 0,1%. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-AKT (policlonal feito em coelho; diluição de 1:1000), anti-phosphoAKT (policlonal feito em coelho; diluição de 1:1000).

Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP), anti-IgG de camundongo (diluição de 1:10.000 em TBS-Tween com 3% de albumina), ou anti-IgG de coelho (diluição de 1:10.000 em TBS-Tween com 3% de albumina).

Após o período de incubação, a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas proteicas foram detectadas por uma reação

de quimiluminescência (Luminata – Merk do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do *software Image J*.

4.9 Análise por imagem de cortes cervicais pelas técnicas de histopatológicas

A caracterização morfológica foi realizada por meio da histopatologia do coxim plantar e do nervo ciático de camundongos alimentados por dieta padrão e hiperlipídica. Foram realizados cortes cervicais e fotomicrografias dos tecidos supracitados. Os cortes foram processados para coloração com hematoxilina e eosina.

As alterações fisiopatológicas e gravidade das degenerações nos coxins e fibras do nervo ciático, bem como: degeneração hidrópica no epitélio, exocitose epitelial ou leucócitos na derme, Desorganização do tecido conjuntivo do epineuro/perineuro, axonopatia e mielinopatia foram classificados nos seguintes graus: grau (0): sem alteração; grau (1): leve; grau (2): moderado; grau (3): grave, como sugerido por (Tawfik *et al.*, 2018).

Foi quantificada a expressão dos canais para potássio sensíveis ao ATP, pela técnica de Imunohistoquímica em coxim plantar com marcação de Anti-Potassium Channel Kir6.2 Antibody (Sigma-Aldrich), as diluições foram feitas com BSA (1-3%) e análise quantitativa da área para imunocoloração do coxim plantar. Os cortes cervicais dos coxins plantar foram dissecados e incluídos em parafina.

Em seguida foram cortados sobre uma lâmina de vidro e submetidos à recuperação do antígeno. Os cortes de tecido foram incubados com os anticorpos primários em uma câmara úmida de acordo com as instruções do fabricante. Foram usados anticorpos policlonais de coelho, os métodos foram aplicados de acordo com as instruções do fabricante.

Por seguinte, as lâminas foram examinadas e fotografadas em microscópio de luz e a porcentagem de áreas imunopositivas foram determinadas usando um sistema de análise de imagem [ImageJ 1.45 F], como sugerido por (Tawfik *et al.*, 2018).

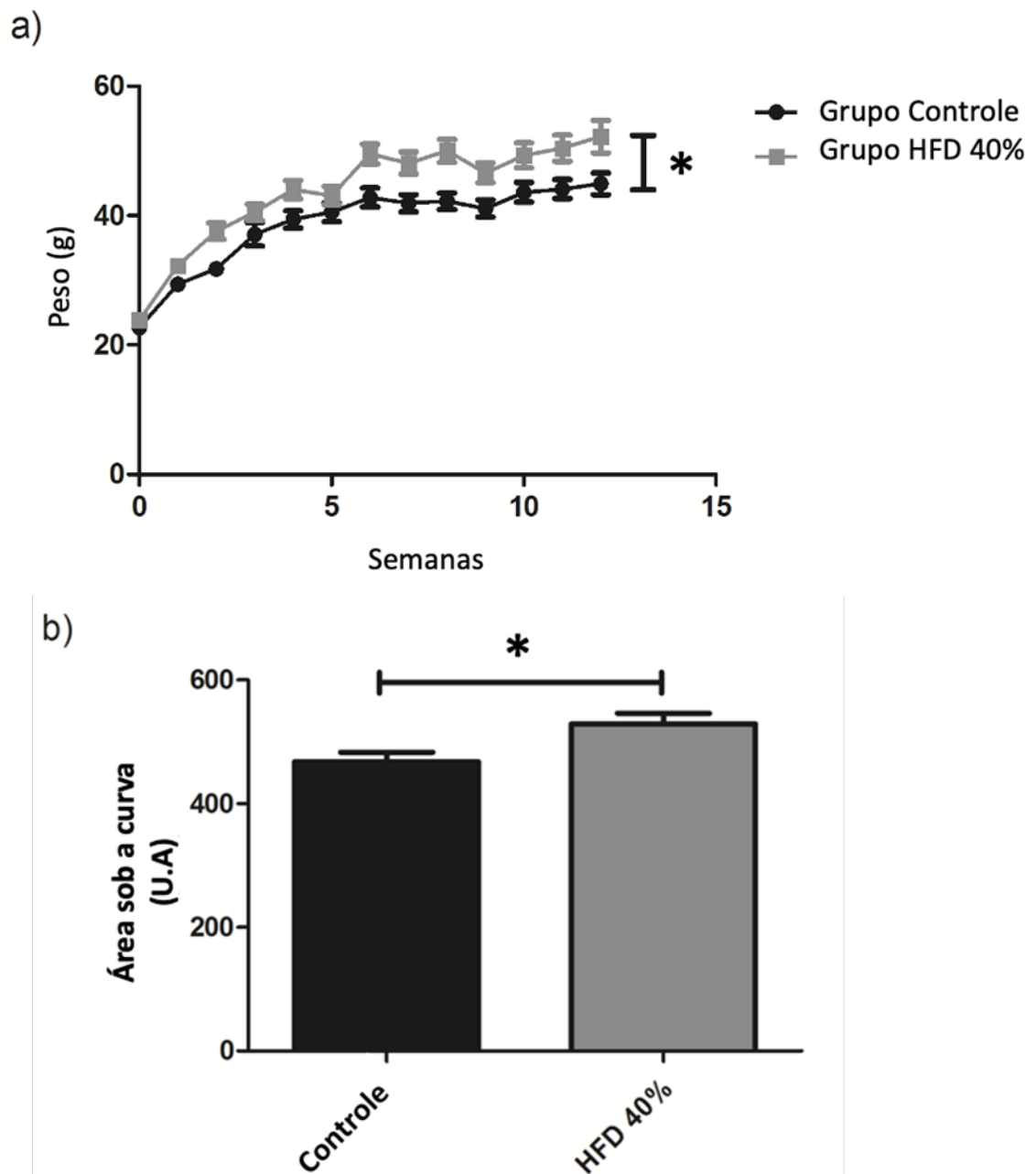
4.10 Análises estatísticas

Os dados estão representados como a média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Para o cálculo estatístico da área sob a curva dos testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, bem como para o cálculo da adiposidade, foi usado o teste t pareado. Para o cálculo estatístico das curvas de tolerância à glicose e resistência à insulina foi usado o Two-Way ANOVA com os pós teste de Bonferroni. Para os testes farmacológicos, as análises estatísticas utilizaram one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni, para a quantificação das alterações morfológicas por análise histopatológica e imunohistoquímica, utilizou-se o teste t pareado. Os resultados foram apresentados como a média $\pm$ EPM das medidas e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni que foi utilizado para verificar a significância das diferenças entre as médias (comparações múltiplas), sendo consideradas significantes quando os valores de p foram menores que 0,05.

5. RESULTADOS

O gráfico 1a apresenta a evolução do peso ao longo de 13 semanas, e demonstra diferença significativa entre grupos HFD e controle em relação ao peso corporal. Tal diferença pode ser observada também na área sob a curva do ganho de peso entre os grupos (gráfico 1b) e na medida de adiposidade (gráfico 1c), que apresentou aumento significativo nos animais HFD.

Gráfico 1



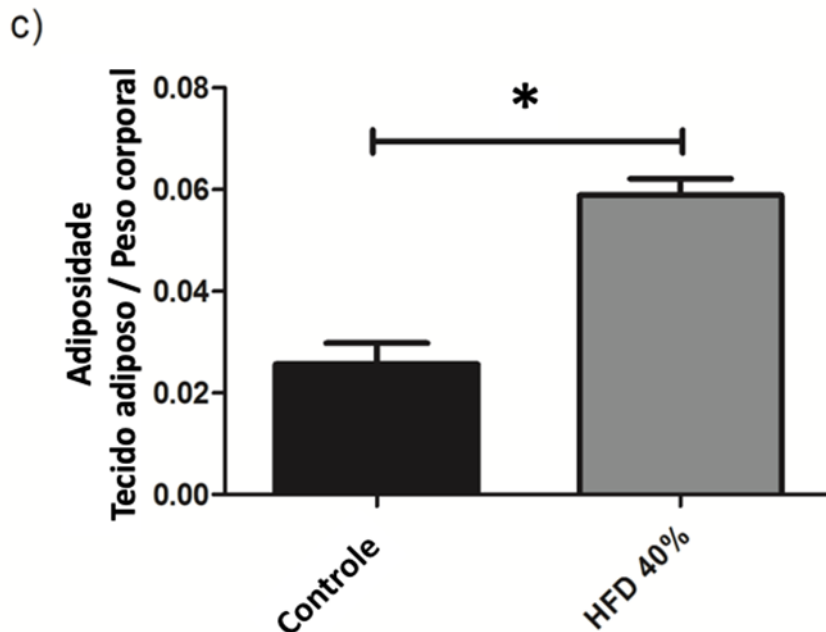


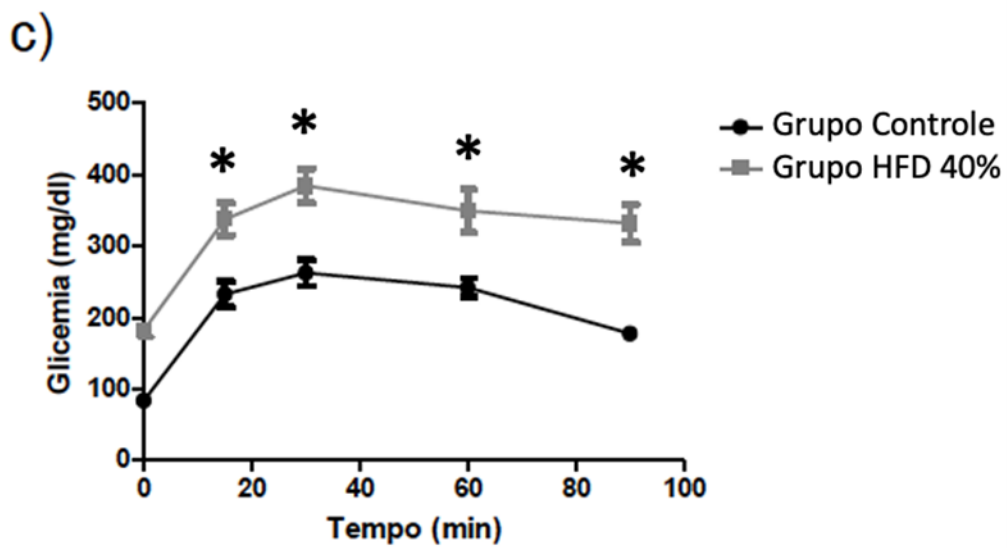
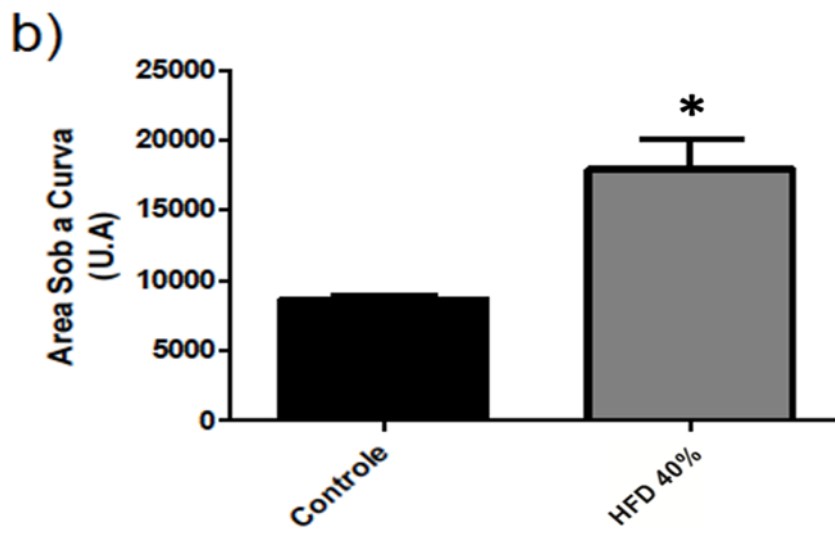
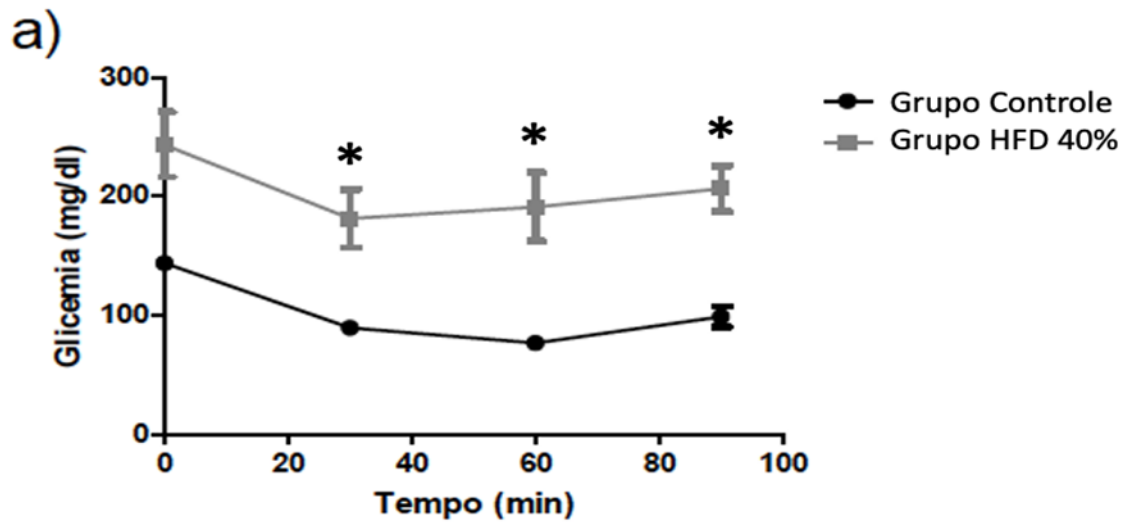
Gráfico 1- Avaliação temporal do peso corporal total ao longo de 13 semanas e adiposidade. (a) Peso corporal de camundongos tratados com dieta HFD 40% e alimentados com dieta padrão, grupo controle. (b) Área sob a curva do ganho de peso relativo. (c) Adiposidade representada pelo peso dos depósitos de tecido adiposo em relação ao peso corporal. Valores representam $\pm$ E.P.M e * Indicam diferença estatística significativa em relação ao grupo HFD 40% e Controle. N=10. ($P < 0,05$, two way ANOVA + pós-teste Bonferroni).

O perfil glicêmico dos animais tratados com a dieta hiperlipídica foi avaliado após 10 semanas pelos testes de sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. O gráfico 2 demonstra que os animais tratados com a dieta hiperlipídica apresentaram resistência à insulina, diferentemente do grupo controle, antes e após a administração intraperitoneal de insulina.

Foi observada queda nos níveis glicêmicos em ambos os grupos, porém, os animais alimentados por dieta hiperglicêmica, apresentaram diferença estatística significativa nos níveis de glicose plasmática ao longo de todo o teste, este resultado foi comprovado no gráfico de área sob a curva (gráfico 2b).

O gráfico 2c apresenta o resultado do teste de tolerância à glicose, demonstrando diferença estatística significativa entre os grupos HFD40% e Controle, confirmando o estado de intolerância à glicose. Este resultado foi comprovado no gráfico de área sob a curva (gráfico 2d).

Gráfico 2



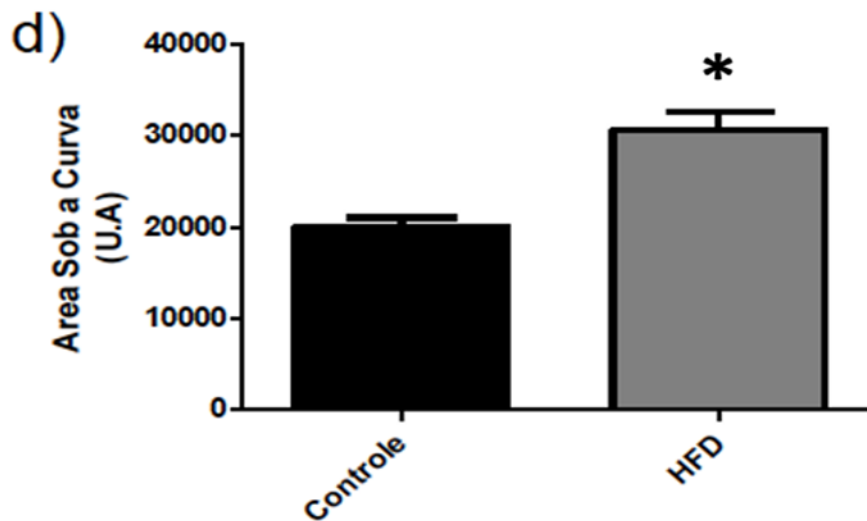


Gráfico 2. Teste de sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. (a) Teste de resistência à insulina: Níveis plasmáticos de glicose 0, 30, 60 e 90 minutos após administração intraperitoneal de insulina. (b) área sob a curva do teste de resistência à insulina. (c) Teste de tolerância à glicose: Níveis plasmáticos de glicose 0, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração intraperitoneal de glicose. (d) área sob a curva do teste de tolerância à glicose. Valores representam média $\pm$ E.P.M e * indicam diferença estatística significativa em relação ao grupo HDF40% e controle, $n=10$. ($P < 0,05$, (a;c) Teste t pareado; (b;d) two way ANOVA + pós-teste Bonferroni).

A caracterização morfológica foi realizada através da histopatologia do coxim plantar e do nervo ciático de camundongos alimentados por dieta padrão (grupo controle) e alimentados por dieta hiperlipídica (grupo HFD 40%).

Como pode ser observado na figura 18, não houve diferença morfológica no tecido do coxim plantar dos animais, quando comparado os grupos supracitados. Ambos os grupos apresentaram alterações degenerativas leves (degeneração hidrópica no epitélio). Alterações como exocitose epitelial ou leucócitos na derme não foram frequentes.

Figura 18. Análise histopatológica do coxim plantar de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperlipídica

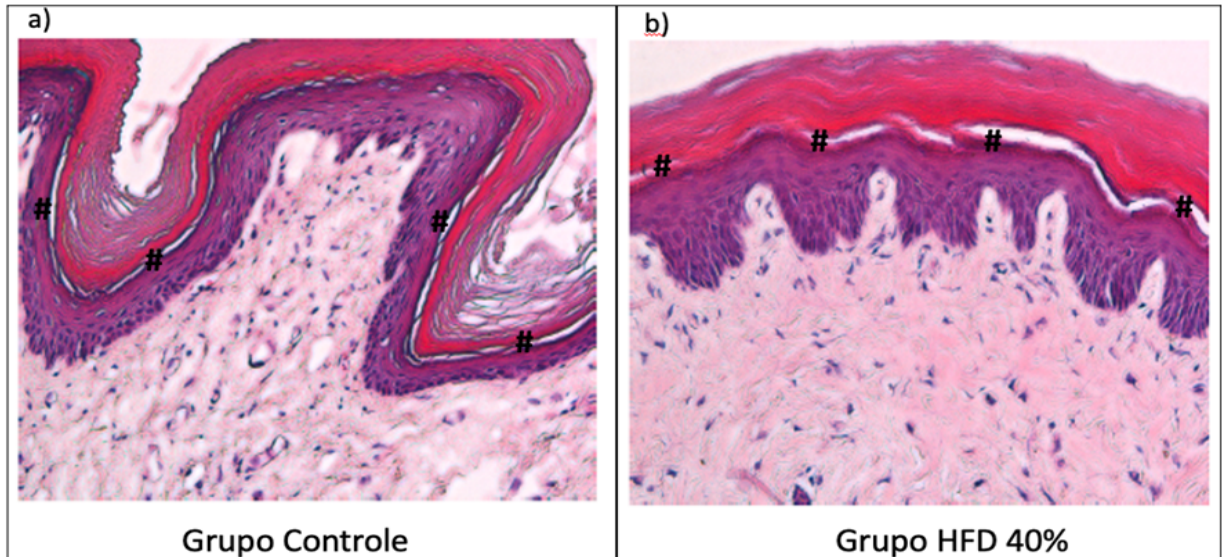


Figura 18. Imagens histopatológicas de cortes cervicais do coxim plantar de camundongos alimentados com dieta padrão (grupo controle) e com dieta hiperlipídica (HFD 40%), corados com hematoxilina e eosina. a) Fotomicrografias de seções cervicais da pata de camundongos não diabéticos. b) Fotomicrografias de seções cervicais da pata de camundongos diabéticos alimentados com dieta hiperlipídica. Ambas as imagens (a; b), apresentaram leve degeneração hidrópica no epitélio (#). Não houve diferença morfológica na pele da pata de camundongos do grupo controle e alimentados por dieta hiperlipídica. Alterações morfológicas como exocitose epitelial ou leucócitos na derme não foram frequentes, n=5. Aumento 200X.

A figura 19 (a; b), demonstra que houve alteração morfológica no tecido do nervo ciático de animais dos grupos controle e alimentados por dieta hiperlipídica. Os animais do grupo controle (17a) apresentam morfologia padrão, caracterizada por: tecido conjuntivo do epineuro/perineuro fisiológicos (*) e fibras nervosas com a presença de axônios centralizados e envolvidos por áreas clara (mielina). Já os animais do grupo alimentado por dieta hiperlipídica (17b), apresentaram a seguinte morfologia: desorganização do tecido conjuntivo do epineuro/perineuro fisiológicos (*), axônios retraídos e posicionados excentricamente (#), aumento do espaço correspondente à mielina, alteração sugestiva de alteração degenerativa e perda axonal (&), confirmando assim a degeneração neuropática.

Figura 19. Análise histopatológica do nervo ciático de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperlipídica

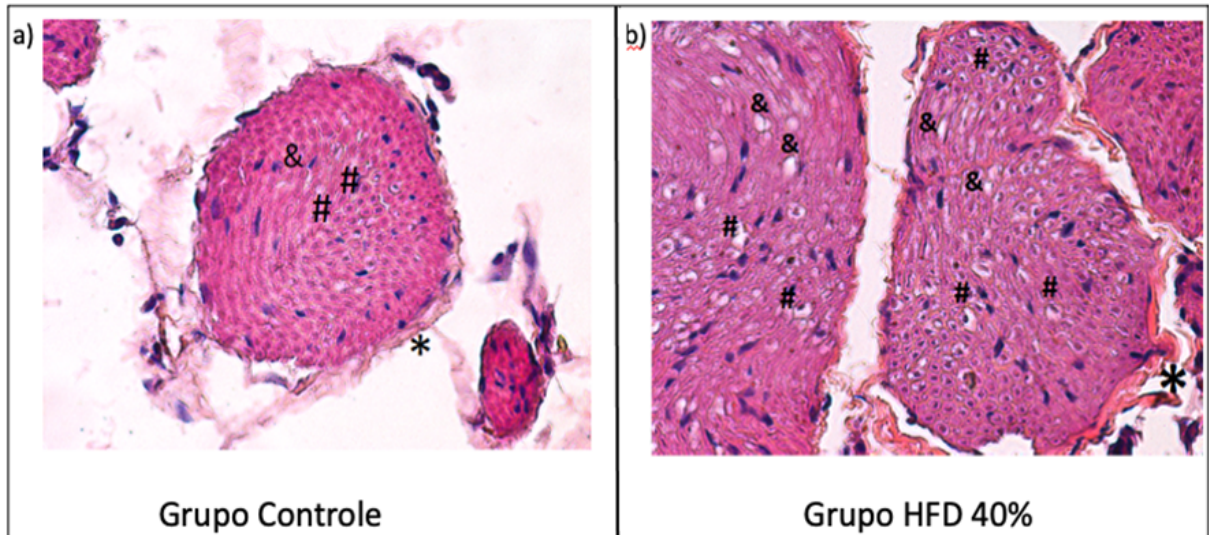


Fig. 19: Imagens Histopatológicas de cortes cervicais de feixes de fibras nervosas do nervo ciático de camundongos alimentados com dieta padrão (grupo controle) e com dieta hiperlipídica (HFD40%). A) Fotomicrografias de seções cervicais de feixes de fibras nervosas do nervo ciático de camundongos não diabéticos (grupo controle): Apresentou morfologia padrão como: Tecido conjuntivo do epineuro/perineuro conservados (*), fibras nervosas caracterizadas pela presença de axônios centralizados e envolvidos por área clara correspondente à mielina (#), núcleo de célula Schwann (&). B) Fotomicrografias de seções cervicais de feixes de fibras nervosas do nervo ciático de camundongos diabéticos alimentados com dieta hiperlipídica (grupo HFD 40%): Apresentou alterações morfológicas sugestivas de neurodegeneração como: Desorganização do tecido conjuntivo do epineuro/perineuro (*), axônios retraídos e posicionados excêntrica e com aumento do espaço correspondente à mielina (#), perda axonal (&), n=5. Aumento 200X.

O gráfico 3 apresenta a quantificação das alterações morfológicas por análise histopatológica entre os grupos controle de HFD 40%. Observou-se diferença significativa entre alterações degenerativas e perda axonal do nervo ciático entre os grupos.

Gráfico 3

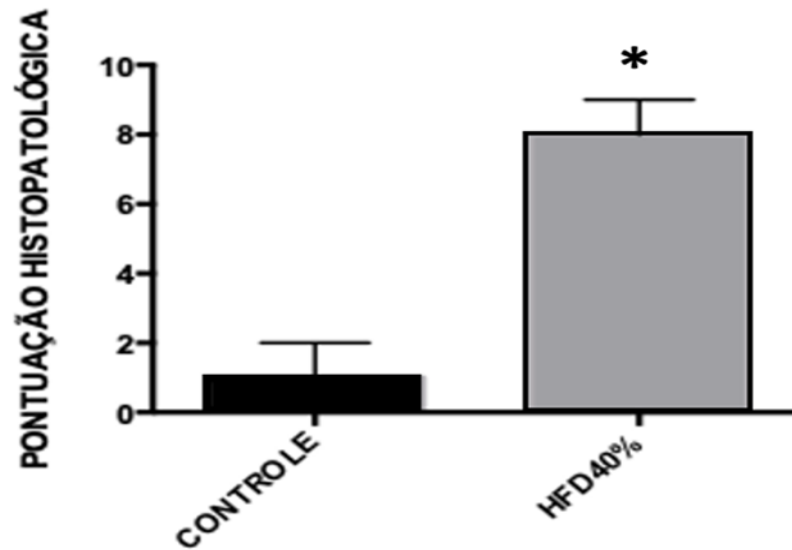


Gráfico 3. Dados da Pontuação das alterações morfológicas dos feixes de fibras nervosas do nervo ciático. Quantificação das alterações degenerativas e perda axonal do nervo ciático. Valores representam média $\pm$ E.P.M e * indicam diferença estatística significativa em relação ao grupo HDF40% e controle, $n=5$. (* $P < 0,05$, teste t pareado).

O gráfico 4 apresenta o teste algésimétrico de mensuração de hiperalgesia na pata que demonstrou diferença significativa de limiar nociceptivo entre os grupos alimentados por dieta hiperlipídica HFD 40% e os grupos alimentados por dieta padrão após a décima primeira semana de dieta, confirmando o estado de hiperalgesia.

Gráfico 4

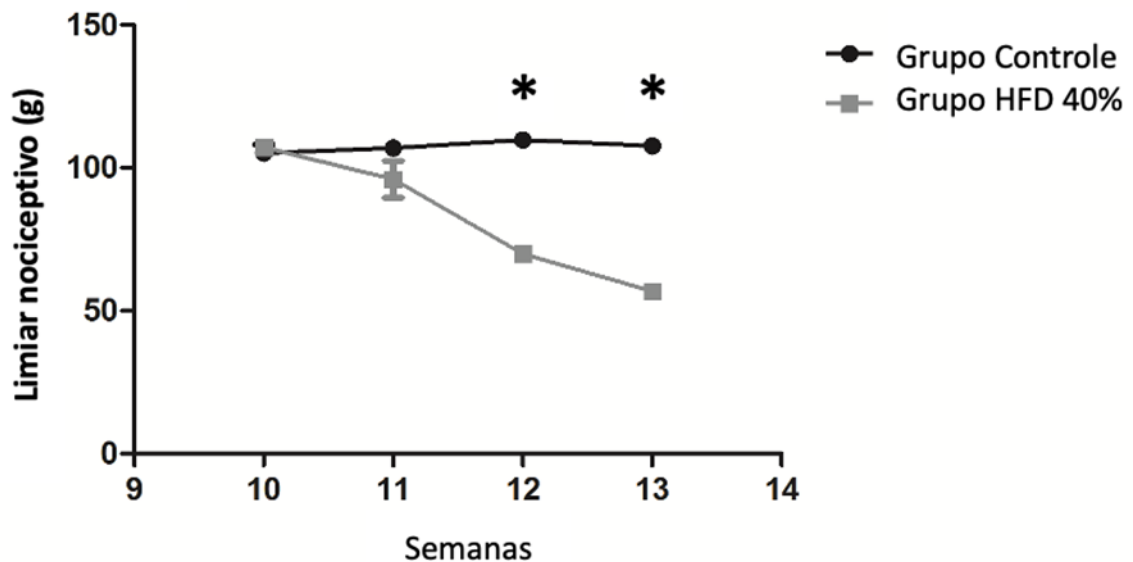


Gráfico 4. Limiar nociceptivo no teste de retirada da pata medido da 10a a 13a semana de camundongos sem diabetes (alimentados por dieta padrão) e camundongos com diabetes (alimentados por dieta hiperlipídica). Avaliado pelo método de compressão de pata, os valores representam média $\pm$ E.P.M e * indicam diferença estatística significativa em relação ao grupo HDF40% e controle, $n=10$. (* $P < 0,05$, Two-way ANOVA + Bonferroni post test).

Para a avaliação da participação da via PI3K γ /AKT foi utilizado o inibidor de PI3K γ , AS 605240 (90 e 180 μ g), e realizada a quantificação de níveis proteicos de p-AKT/AKT total no coxim plantar. Os resultados apresentados no gráfico 5, demonstram que não houve redução do limiar nociceptivo do grupo HFD 40% quando a enzima PI3K γ foi inibida com AS 605240 (90 e 180 μ g) em relação ao grupo controle, sugerindo que esta enzima não participa do processo analgésico na modulação endógena da dor neuropática diabética.

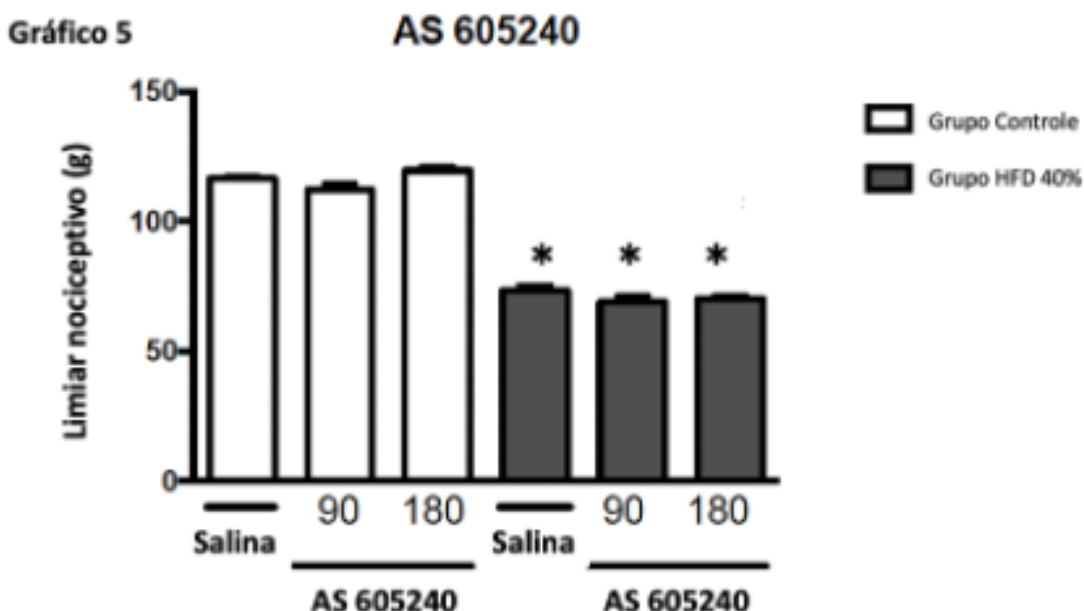


Gráfico 5. Teste farmacológico para análise da participação da via PI3K, análise realizada após administração de AS 605240 por via intraplantar. A AS 605240 foi administrada 30 minutos antes da segunda mensuração (5 μ g/pata). Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. * indicam diferença estatística significativa no limiar nociceptivo basal entre o grupo controle e o grupo alimentado por dieta hiperlipídica. No entanto, não houve diferença estatística significativa no limiar nociceptivo entre os

grupos, quando administrada a AS 605240 ou quando administrada salina, $n=5$. ($P < 0,05$ para grupo controle e HFD 40% basal, $P > 0,05$ para HFD 40% salina e AS 605240 após administração, Two-way ANOVA + Bonferroni post test).

O gráfico 6 representa o resultado da avaliação da atividade de AKT pela técnica de Western Blot e demonstrou que houve alteração significativa nos níveis de AKT fosforilado (p-AKT) em relação ao AKT total entre o grupo controle e o grupo de camundongos tratados com dieta HFD 40%.

Este resultado, sugere que a nível periférico, a AKT fosforilada encontra-se expressa em menor quantidade e pode ter sua participação prejudicada na modulação endógena da dor neuropática diabética em camundongos induzidos por dieta hiperlipídica HFD 40%.

Gráfico 6

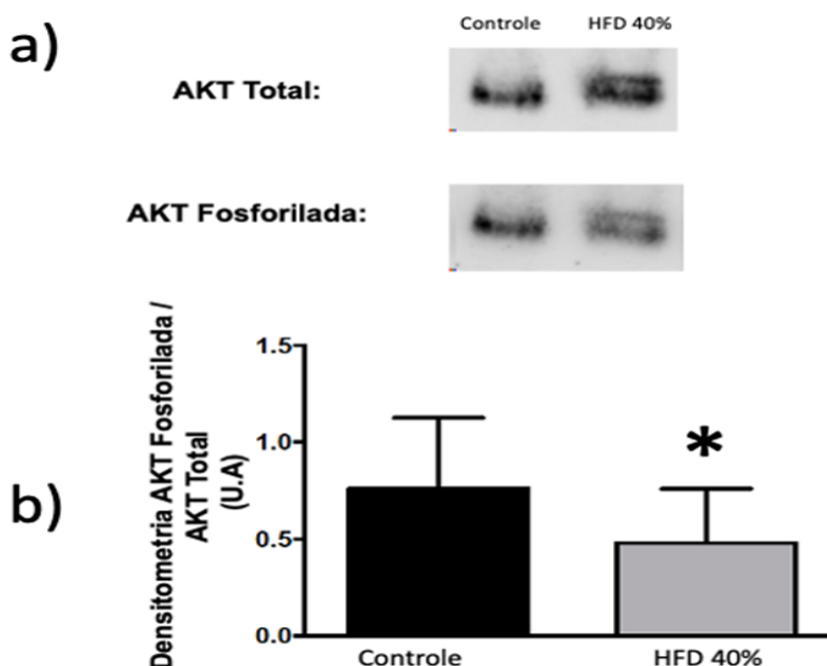


Gráfico 6. Western blot representativo de coxim plantar de camundongos alimentados com dieta padrão e dieta hiperlipídica e Densitometria de AKT fosforilada e AKT total (área sob a curva). a) Bandas de proteínas representativas de experimento com a técnica de Western Blot, níveis proteicos de p-AKT/Total AKT e AKT fosforilada em animais do grupo controle e do grupo tratados com dieta HFD 40%, com anticorpo primário: anti-AKT (policlonalfeito feito em coelho; diluição de 1:1000) e anti-phosphoAKT (policlonal feito em coelho; diluição de 1:1000), foi observado diferença estatística significativa. b) Análise quantitativa densitométrica de Akt fosforilada e AKT total. Os Valores representam média $\pm$ SEM. (a,b) $n=8$. ($P > 0,05$, teste t não pareado com correção de Welch).

Para a avaliação da participação da via NO/GMPc foi utilizado um inibidor não seletivo da enzima Oxido Nítrico Sintase, L-NOarg (24 e 48µg), e o inibidor seletivo da guanilato ciclase, ODQ (100 e 200 µg). O gráfico 7 demonstra que a inibição de NOS com L-NOarg (24 e 48 µg) não intensificou a hiperalgesia no grupo HFD, pois não apresentou redução do limiar nociceptivo entre os grupos L-NOarg veículo e L-NOarg HFD.

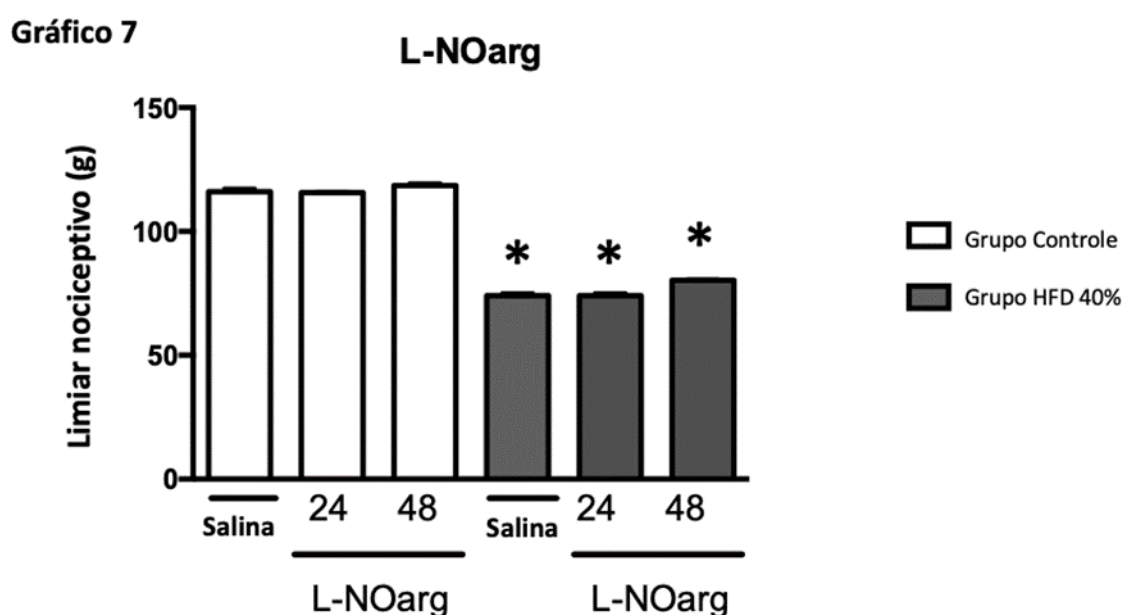


Gráfico 7. Teste farmacológico para análise da participação da via de NO, análise realizada após administração de L-NOARG por via intraplantar. O L-NOARG foi administrado 30 minutos antes da segunda mensuração (5 µg/pata). Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. * indicam diferença estatística significativa no limiar nociceptivo basal entre o grupo controle e o grupo alimentado por dieta hiperlipídica. No entanto, não houve diferença estatística significativa no limiar nociceptivo entre os grupos, quando administrado o L-NOARG ou quando administrada salina, $n=5$. ($P < 0,05$ para grupo controle e HFD 40% basal, $P > 0,05$ para HFD 40% salina e L-NOARG após administração, Two-way ANOVA + Bonferroni post test).

O Gráfico 8 demonstra que a inibição da enzima guanilato ciclase com ODQ (100 e 200 µg), também não intensificou a hiperalgesia no grupo alimentado por dieta hiperlipídica HFD 40%, pois o limiar nociceptivo se manteve inalterado entre os grupos ODQ salina e ODQ HFD 40%.

Gráfico 8

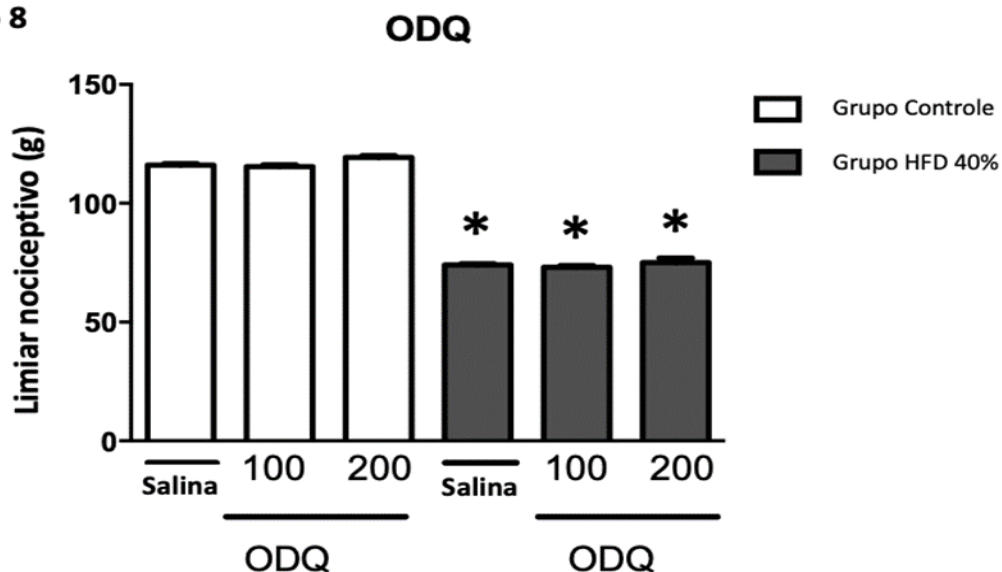


Gráfico 8. Teste farmacológico para análise da participação do GMPc, análise realizada após a administração de ODQ por via intraplantar. O ODQ foi administrado 10 minutos antes da segunda mensuração (5 µg/pata). Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. * indicam diferença estatística significativa no limiar nociceptivo basal entre o grupo controle e o grupo alimentado por dieta hiperlipídica. No entanto, não houve diferença estatística significativa no limiar nociceptivo entre os grupos, quando administrado o ODQ ou quando administrada salina, $n=5$. ($P < 0,05$ para grupo controle e HFD 40% basal, $P > 0,05$ para HFD 40% salina e ODQ após administração, Two-way ANOVA + Bonferroni post test).

Após análise realizada com ODQ, concentrou-se a atenção para a avaliação seletiva dos canais para potássio, sendo assim, foi utilizado um bloqueador seletivo de canais para potássio sensíveis ao ATP (Glibenclamida 80 e 160 µg). O gráfico 9 demonstra que a glibenclamida intensificou a hiperalgesia no grupo HFD 40% (80 e 160 µg), apresentando diferença estatística significativa no limiar nociceptivo entre os grupos Glibenclamida e salina, para o de animais acometidos pela dor neuropática diabética (HFD 40%).

Gráfico 9

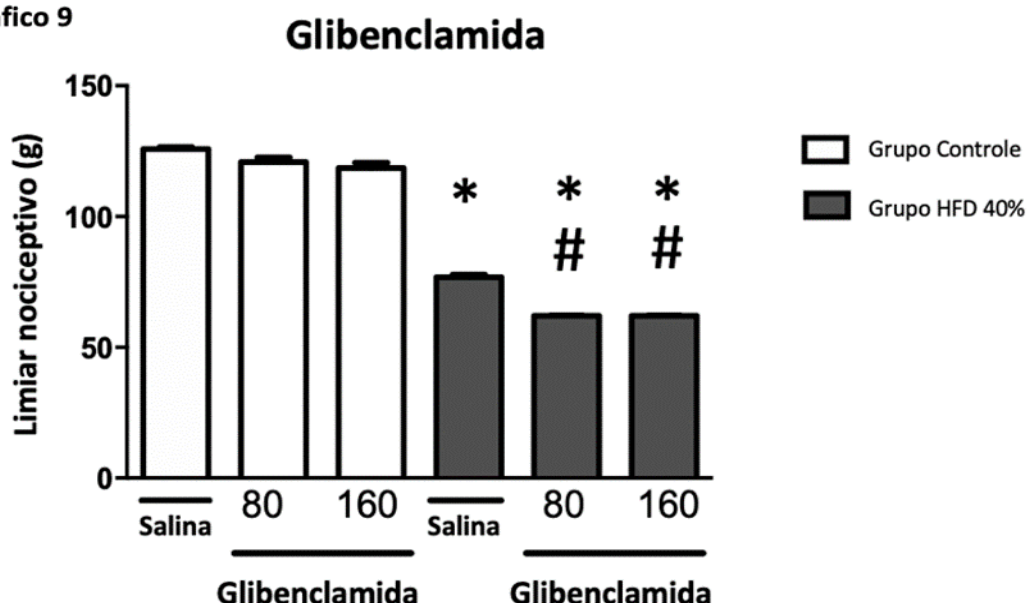


Gráfico 9. Teste farmacológico para avaliação da participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), análise realizada após a administração de Glibenclamida por via intraplantar. A Glibenclamida foi administrada 5 minutos antes da segunda mensuração (5 µg/pata). Cada coluna representa a média ± E.P.M. * indicam diferença estatística significativa no limiar nociceptivo basal entre o grupo controle e o grupo alimentado por dieta hiperlipídica e # indicam diferença estatística significativa no limiar nociceptivo após a administração de Glibenclamida, quando comparado o grupo salina HFD40% e o grupo Glibenclamida HFD 40%, n=5. (P < 0,05 para grupo controle e HFD 40% basal, P < 0,05 para HFD 40% salina e Glibenclamida após administração, Two-way ANOVA + Bonferroni post test).

A figura 20 A, demonstra diferença estatística significativa na expressão de K_{ATP} no coxim plantar quando comparado o grupo controle e o grupo HFD 40%. As imagens representam a derme das patas dos animais do grupo controle e HFD 40% com e sem marcação de Kir 6.2. um marcador de canais para potássio sensíveis ao ATP e sua marcação pode ser vista nas imagens b e d, onde as áreas foram demarcadas por uma tonalidade escura e marrom. Observou-se nas imagens que, quando comparados os grupos controle e alimentados com a dieta HFD 40%, os animais alimentados por dieta hiperlipídica, apresentaram diferença estatística significativa de aumento da expressão de canais para potássio sensíveis ao ATP.

Na figura 20B B, observa-se a análise quantitativa da área para imunocoloração do coxim plantar do grupo alimentado com dieta hiperlipídica e

alimentado com dieta padrão, representada como média $\pm$ E.P.M. para canais para potássio sensíveis ao ATP.

Figura 20. Análise imunohistoquímica do coxim plantar de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperlipídica.

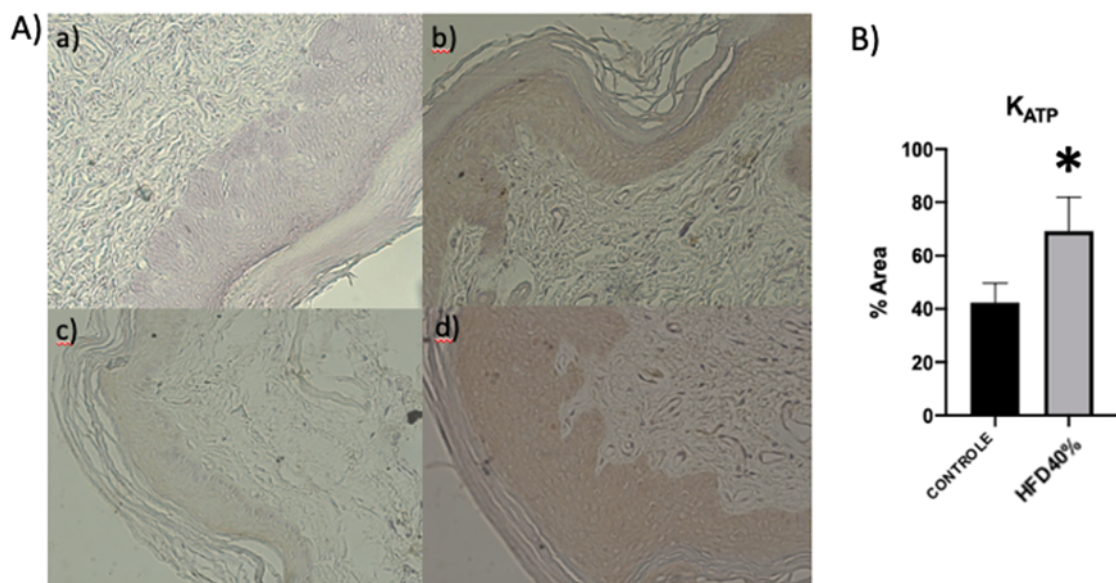


Figura 20. Imagens de cortes cervicais do coxim plantar de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperlipídica para quantificação da expressão dos canais para potássio sensíveis ao ATP, pela técnica de Imunohistoquímica em coxim plantar com marcação de Kir 6.2 e análise quantitativa da área para imunocoloração do coxim plantar, comparação entre os grupos. A) Fotomicrográficas de seções cervicais de coxim plantar de camundongos: a) não diabéticos (grupo controle) sem marcação para Kir 6.2; b) não diabéticos (grupo controle) com marcação para kir 6.2; c) diabéticos (grupo HDF40%) sem marcação para Kir 6.2; d) diabéticos (grupo HDF40%), com marcação para Kir 6.2. B) Área para imunocoloração para Kir 6.2, os valores representam média $\pm$ SEM e * indica diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. n=5, aumento de 200X. (*P<0,05, Two-way ANOVA + Bonferroni post test).

Para a avaliação dos canais para potássio sensíveis a voltagem, utilizou-se o tetraetilamonio (TEA), um bloqueador seletivo de canais KV, na dosagem de 30 μ g. O Gráfico 10 representa o resultado do efeito deste bloqueador no teste de limiar nociceptivo em animais com DNP. Após seu bloqueio, observou-se redução do limiar nociceptivo dos animais acometidos pela dor neuropática diabética, comprovando assim a participação dos canais supracitados, na modulação endógena de controle da dor neuropática diabética.

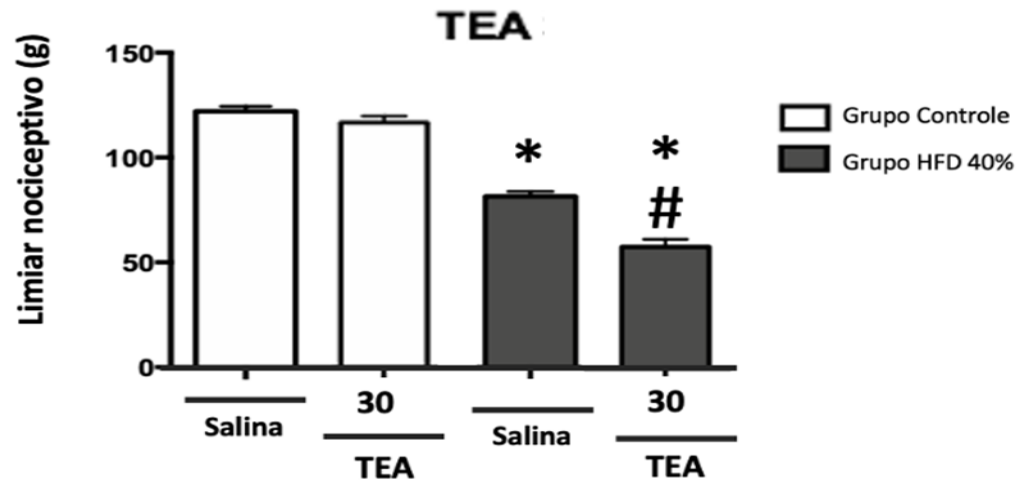
Gráfico 10

Gráfico 10. Teste farmacológico para avaliação da participação dos canais para potássio sensíveis a voltagem (KV), análise realizada após a administração de Tetraetilamonio por via intraplantar. O Tetraetilamonio foi administrado 30 minutos antes da segunda mensuração (5 µg/pata). Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. * indica diferença estatística significativa no limiar nociceptivo basal entre o grupo controle e o grupo alimentado por dieta hiperlipídica e # indica diferença estatística significativa no limiar nociceptivo após a administração de Tetraetilamonio, quando comparado o grupo salina HFD 40% e o grupo TEA HFD 40%, $n=5$ ($P < 0,05$ para grupo controle e HFD 40% basal, $P < 0,05$ para HFD 40% salina e TEA após administração, Two-way ANOVA + Bonferroni post test).

A seguir, investigou-se a participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de baixa e alta condutância, utilizou-se os bloqueadores seletivos Dequalíneo (DQ), na dosagem de 50 µg (baixa condutância), gráfico 11 e Paxilína (PAX), na dosagem de 20 µg (alta condutância), gráfico 12. Observou-se que os canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta e baixa condutância não modulam a dor neuropática diabética, pois não foi observada diferença estatística significativa.

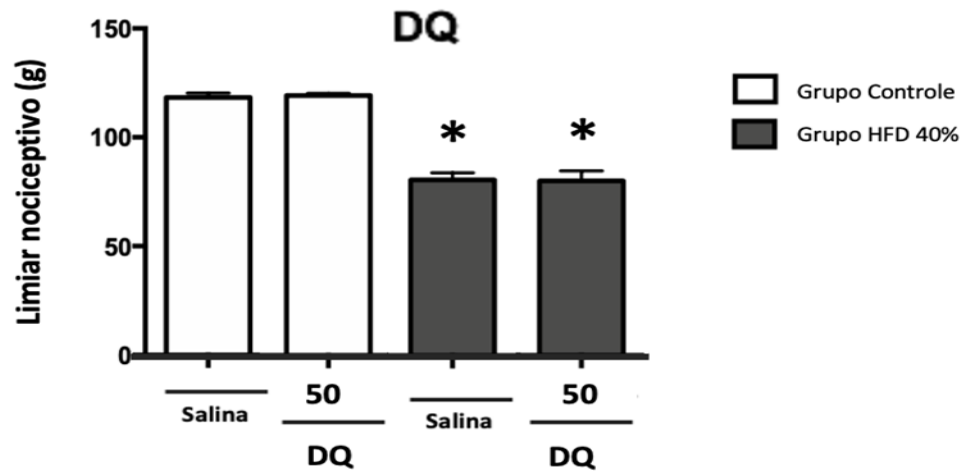
Gráfico 11

Gráfico 11. Teste farmacológico para avaliação da participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de baixa condutância, análise realizada após a administração de Dequalíneo por via intraplantar. O DQ foi administrado 5 minutos antes da segunda mensuração (5 µg/pata). Cada coluna representa a média ± E.P.M. * indicam diferença estatística significativa no limiar nociceptivo basal entre o grupo controle e o grupo alimentado por dieta hiperlipídica. No entanto, não houve diferença estatística significativa no limiar nociceptivo entre os grupos, quando administrado o DQ ou quando administrada salina, n=5. ($P < 0,05$ para grupo controle e HFD 40% basal, $P > 0,05$ para HFD 40% salina e DQ após administração, Two-way ANOVA + Bonferroni post test).

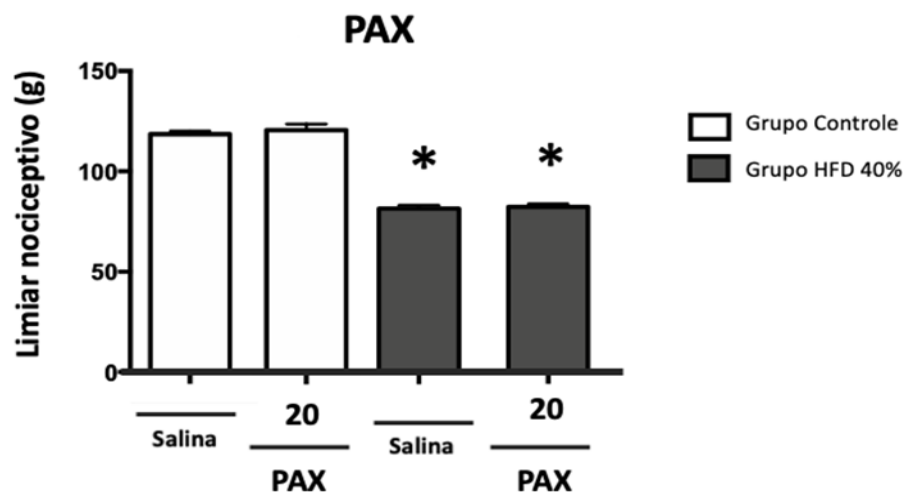
Gráfico 12

Gráfico 12. Teste farmacológico para avaliação da participação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância, análise realizada após a administração de Paxilina por via intraplantar. A Paxilina foi administrada 5 minutos antes da segunda mensuração (5 µg/pata). Cada coluna representa a média ± E.P.M. * indicam diferença estatística significativa no limiar nociceptivo basal entre o grupo

controle e o grupo alimentado por dieta hiperlipídica. No entanto, não houve diferença estatística significativa no limiar nociceptivo entre os grupos, quando administrado a PAX ou quando administrada salina, n=5. ($P < 0,05$ para grupo controle e HFD 40% basal, $P > 0,05$ para HFD 40% salina e PAX após administração, Two-way ANOVA + Bonferroni post test).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi utilizado o modelo de dieta hiperlipídica (high fat diet 40%), para indução da neuropatia diabética associada à obesidade, semelhante à síndrome observada em humanos (Gao e Zheng, 2014). Os efeitos da dieta hiperlipídica foram avaliados em camundongos Swiss através da mensuração da evolução do peso e adiposidade entre os grupos controle (dieta padrão) e High Fat 40% (HFD 40%), onde essa demonstrou-se efetiva na indução da obesidade

Resultados semelhantes foram encontrados em camundongos C57Bl/6J, onde o peso e a mensuração da adiposidade apresentaram diferenças significativas (Wideman, Zautra e Edwards, 2014), confirmando a eficácia da dieta hiperlipídica como método de induzir obesidade. No entanto vale ressaltar que a linhagem utilizada neste experimento normalmente é de maior acesso nos vários biotérios disponíveis e tem o preço mais baixo para aquisição, podendo ser uma alternativa mais barata para futuras pesquisas.

Além do ganho de peso, investigou-se a capacidade da dieta induzir diabetes, e observou-se diferenças estatísticas significativas, quando testada a resistência à insulina e tolerância à glicose. Resultados semelhantes foram apresentados por outro grupo de pesquisadores que analisaram a eficácia desta dieta, não só como um modelo de indução de obesidade e diabetes, mas também uma forma de induzir déficits cognitivos e neuropatia no plexo mioentérico do duodeno (Wideman, Zautra e Edwards, 2014; Zuloaga *et al.*, 2016).

Após a confirmação do estado de diabetes na oitava semana, avaliou-se, após a décima segunda semana, possíveis alterações fisiopatológicas que pudessem confirmar degenerações neuronais e a neuropatia diabética. Após a análise histopatológica dos coxins plantar e de nervos ciáticos (figura 18; 19), foi observado alterações conclusivas de danos neurodegenerativos do nervo ciático dos animais alimentados pela dieta hiperlipídica, como: desorganização do tecido conjuntivo do epineuro/perineuro, axônios retraídos, posicionados excentricamente e com aumento do espaço correspondente à mielina, além de perda axonal.

Alterações morfológicas semelhantes, foram encontradas no nervo ciático em modelos que utilizaram a administração intraperitoneal de estreptozotocina em

ratos (Wistar e Albinos). Estes estudos apresentaram resultados como: edema, degeneração e retração axonal, separação de axônio-mielina e espessamento do epineuro bem como edema subepineural (Farshid e Tamaddonfard, 2015; Mohamed ,Mostafa, Abdullah H. Altemani e Ashraf M. F. Kamel, 2018).

Os modelos animais são ferramentas essenciais na descoberta científica, sobretudo para entender os mecanismos celulares de progressão da diabetes e novas estratégias farmacológicas envolvidas nesse cenário, seja relacionado ao controle glicêmico, seja relacionado ao controle das complicações macrovasculares e microvasculares, assim como no manejo e controle da dor neuropática diabética.

Torna-se necessário ressaltar que, além do estudo de DM2 e suas complicações em modelo animal, induzido exclusivamente por dieta ser uma opção pouco frequente pelos pesquisadores, devido ao tempo de indução, a pesquisa atual demonstrou que essa indução é efetiva em uma linhagem roedores mais acessível, não encontrada em outras pesquisas. Em uma revisão recentemente publicada, que investigou diversos tipos de indução de diabetes e suas complicações crônicas, como: neuropatia periférica diabética, retinopatia e nefropatia, o tempo de indução de neuropatia diabética e DNP em camundongos Swiss (utilizados nessa pesquisa) foi semelhante ao tempo de indução de neuropatia periférica diabética e outras comorbidades induzidas apenas por dieta HFD, quando utilizadas linhagens como a C57BL/6J, inclusive no surgimento da alodinia mecânica quando adicionadas baixas doses de STZ à administração de dieta HFD (Preguiça *et al.*, 2020). No entanto, não foram encontradas pesquisas anteriores que utilizassem o modelo de dieta optado nessa pesquisa, na linhagem de camundongos Swiss, podendo ser uma alternativa mais viável aos pesquisadores.

Tendo em vista que a dieta hiperlipídica demonstrou-se eficaz em promover alterações morfológicas importantes, que comprovam o estado neuropático, a próxima etapa foi mensurar se este quadro histopatológico era seguido pelo fenômeno de hiperalgesia.

Os resultados obtidos no teste de compressão da pata , sugerem que o achado de hiperalgesia encontrado no teste, são consequentes de alterações morfológicas de natureza neuronal, podendo finalmente ser caracterizando como uma dor neuropática diabética. A hiperalgesia em consonância com os resultados dos

experimentos histológicos realizados, nos permite descrever este método, como possível de mimetizar o quadro de dor neuropática diabética em humanos acometidos por DM2.

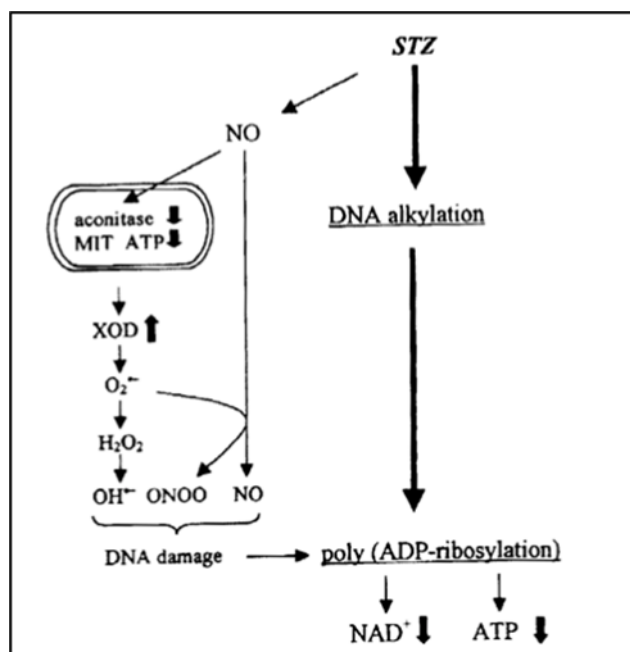
A hiperexcitabilidade neuronal foi descrita como uma atividade espontânea de neurônios sensoriais primários, refletindo os sintomas típicos da dor neuropática, como hiperalgesia e alodinia (Jerry R. Mendell e Sahenk, 2003). Pesquisas do nosso grupo, realizadas por Almeida (2016), constataram que os sistemas opioide e canabinoide são importantes para o controle da dor neuropática diabética, tendo em vista que, o antagonismo dos receptores envolvidos nestes sistemas pioram a dor observada.

Optou-se pela utilização de um modelo de intervenção exclusiva por dieta, na tentativa de buscar o máximo de similaridade ao cenário sindrômico humano para DM2, uma vez que a utilização de drogas como Aloxana e estreptozotocina, apesar de anteciparem o surgimento da dor, poderiam levar à sintomas mais agudos, típicos de indivíduos com DM1.

Tais drogas possuem alta toxicidade às células β do pâncreas, em especial, a estreptozotocina age através de um transportador de glicose (GLUT2) e causa destruição do DNA e induz a ativação da poli-ADP-ribosilação, processo mais importante para o surgimento da Diabetes do que o próprio dano ao DNA (Lenzen, 2008).

O aprimoramento da desfosforilação do ATP após o tratamento com estreptozotocina fornece um substrato para a xantina oxidase, resultando na formação de radicais superóxido e consequentemente, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, induzindo à um modelo de DM1 semelhante ao de humanos (Lenzen, 2008).

Figura 21. Mecanismos Diabetogênicos envolvidos na administração de estreptozotocina.



Fonte: Adaptado de Lenzen e colaboradores, 2008. (Lenzen, 2008)

Além disso, a estreptozotocina libera quantidades tóxicas de NO que inibe a atividade da aconitase e participa de danos no DNA. Como resultado da ação da estreptozotocina, as células β sofrem destruição por necrose (Szkudelski, 2001). Apesar de tais drogas estarem envolvidas em modelos animais de DM1, a maioria das pesquisas sobre o assunto, opta por utilizá-las, isoladas ou adicionadas às dietas ricas em gordura ou carboidratos (Calcutt, 2004).

Os mecanismos de controle endógeno da dor, poderiam sofrer modulações devido ao alto padrão tóxico e inflamatório destas drogas, por exemplo, poderia estimular a participação de vias como a do NO na modulação endógena na dor neuropática diabética, via que se verificou não participar no auxílio endógeno do controle da DNP, obtida com o modelo aqui investigado. A literatura reconhece a participação de diferentes isoformas de PI3K na modulação da dor inflamatória induzida por carragenina (Pritchard et al., 2016) e ainda que a ativação da via PI3K γ /AKT/NOSn/NO/KATP desempenha um papel chave no mecanismo de analgesia periférica induzido pela morfina na dor inflamatória (Cunha et al., 2010).

Na pesquisa em discussão, avaliou-se a participação da via PI3K γ /AKT através da inibição de PI3K γ , como a administração intraplantar de AS 605240 (gráfico 5) e através da quantificação da expressão proteica de p-AKT pela técnica de Western blot (gráfico 6). Além de AS 605240 não reduzir o limiar nociceptivo dos animais

acometidos pela DNP, observou-se ainda redução na forma ativa da proteína, p-AKT, no grupo acometido por ela.

Apesar da via PI3K γ /AKT, ser considerada por alguns autores, um alvo terapêutico no tratamento de dores crônicas, devido à sua participação na analgesia (Ye *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018), aparentemente, a neuropatia provinda de um cenário de obesidade e diabetes gera uma sinalização anormal desta via (Huang *et al.*, 2018).

Dados semelhantes aos obtidos aqui, foram observados por um grupo de pesquisadores que induziram a dor neuropática diabética em ratos, através da administração de estreptozotocina, estes observaram diminuição da atividade de PI3K e Akt no nervo vago de ratos, bem como a redução na expressão da p-AKT de ratos acometidos pela DNP (Cai e Helke, 2003).

A avaliação da atividade de AKT pela técnica de Western Blot, sugere que os níveis de AKT fosforilado (p-AKT) em relação ao AKT total nos camundongos tratados com dieta HFD encontram-se reduzidos. Estes dados, juntamente com os obtidos com a administração de AS 605240, sugerem que a nível periférico, PI3K γ /AKT não está envolvida ativamente na modulação endógena da dor neuropática diabética em camundongos obesos, diabéticos e acometidos pela dor neuropática.

Descarta-se, portanto, a hipótese inicial de que a ativação da via do Óxido nítrico, caso estivesse participando na modulação endógena da dor, ocorresse pela ativação da cascata PI3K/Akt, como apresentada na dor inflamatória.

A literatura apresenta ações distintas do NO em diferentes modelos de dor: em modelos de dor inflamatória pode induzir antinocicepção (Alves *et al.*, 2013); já em modelos de dor neuropática pode induzir a hipernocicepção devido à capacidade de induzir o neurônio pré-sináptico a aumentar a liberação de substância P e outros neuropeptídeos excitatórios (Mergia *et al.*, 2018).

Essa ação dúbia, parece estar relacionada à isoforma da guanilatociclase (NO-GC1 ou NO-GC2) que está sendo ativada. Aparentemente, o GMPc derivado da NO-GC1 presente em interneurônios inibitórios do corno dorsal da medula apresenta efeito hiperalgésico na dor neuropática, enquanto o GMPc derivado da NO-GC2 presente em células satélites do gânglio da raiz dorsal apresenta efeito analgésico em modelos de dor inflamatória (Mergia *et al.*, 2018).

Níveis elevados de NO, produzidos pela NOSi exercem papel importante em doenças humanas neurodegenerativas. As elevadas expressões de NOSi apresentam características neurotóxicas devido à formação de peroxinitrito no tecido neuronal local, acarretando minimização da circulação local e inibição das funções mitocondriais axoniais (modificações oxidativas de proteínas mitocondriais). Além disso, a exposição prolongada de axônios ao NO promove bloqueio da condução neuronal aguda e desencadeia degeneração (Ahlawat e Sharma, 2018).

Como dito anteriormente, a maioria dos modelos de neuropatia apresentado na literatura, utiliza a estreptozotocina. A administração de estreptozotocina tem como característica grande perfil tóxico, inflamatório (Szkudelski, 2001) e acredita-se ser capaz de estimular a participação da via nitrérgica. Cogitamos a hipótese de que o modelo de indução de diabetes utilizado aqui, aparenta ser um modelo mais semelhante com o cenário sindrômico de humanos com DM2, podendo justificar resultados divergentes com os obtidos em outros modelos de indução, inclusive a não participação da via NO/GMPc.

No presente estudo, após a administração de L-NOARG e ODQ, não foi observado redução do limiar nociceptivo, sugerindo assim que a via nitrérgica não participa ativamente na tentativa de controle endógeno da DNP.

Hamza *et al.* (2010), demonstraram que, na dor inflamatória, em especial no momento da lesão, são encontrados níveis baixos de NO, no entanto, após a dor evocada, concentrações mais altas de NO são observados, sugerindo que estes apresentam efeitos pró-nociceptivos, em decorrência da regulação aumentada da isoforma da NOSi.

Apesar da via nitrérgica participar ativamente durante a regeneração em alguns modelos de dor que envolvem danos neuronais, em especial a NOSi, que parece ter influência com a capacidade de remodelamento de neurônios (Levy, Kubes e Zochodne, 2001), no modelo aqui estudado, não foi observado participação desta via na tentativa de controle endógeno da DNP.

Pesquisas realizadas em humanos e em camundongos C57Bl/6J (animais monogênicos) demonstraram, utilizando técnicas de imagem, que a neuropatia diabética apresenta níveis reduzidos de NOSe. Estes achados sugerem que a via nitrérgica realmente não auxilia na modulação endógena da neuropatia diabética

dolorosa Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores, os quais demonstraram níveis reduzidos de NO em modelos animais acometidos pela DNP (Li *et al.*, 2005; Walton, Minton e Cook, 2018), corroborando assim os resultados desta pesquisa.

No entanto, os resultados do envolvimento de NO na modulação endógena da DNP aqui apresentados, contrapõe o entendimento do envolvimento de NOSn, hiperexcitabilidade neuronal e morte neuronal. Ahlawat *et al.* (2014) sugerem que o aumento da expressão de NOSn está envolvida a vias distintas que modulariam tipos diversos de dor, incluindo a neuropática.

A excitabilidade elétrica neuronal periférica desregulada dos nervos sensoriais, está envolvida em estados patológicos de dor aguda e crônica e podem ter como causa alterações de canais iônicos (Du e Gamper, 2013).

Estudos investigaram a participação das famílias de canais para potássio e sua abertura, na antinocicepção em diversos modelos de dor. Ao longo das últimas décadas, observou-se que a abertura de algum destes canais nos neurônios, possuem importância fisiológica na modulação da dor, em especial na antinocicepção (Ocaña *et al.*, 2004; De Carvalho Veloso *et al.*, 2015).

A abertura destes canais foi mediada muitas vezes por agonistas de receptores acoplados à proteína G, como: receptores canabinoides, opióides, GABA, muscarínico M2, adenosina A1 e alguns produtos naturais como por exemplo o resveratrol. Este fenômeno pode ser regulado por diversos estímulos, como: alteração de voltagem de membrana, níveis iônicos intracelulares, organelas, proteínas ou mesmo pequenas moléculas (Granados-Soto, Argüelles e Ortiz, 2002; Ocaña *et al.*, 2004).

Portanto, sugere-se que bloqueadores específicos de canais para potássio, possam ser uma estratégia para avaliar a participação desses canais na modulação da dor em diversos modelos de indução. Após a utilização de bloqueadores específicos de canais para potássio, possíveis respostas podem ser observadas, como por exemplo: a redução do limiar nociceptivo, demonstrando assim que os canais bloqueados participam ativamente na tentativa de controle endógeno da dor, ou a não alteração deste limiar, o que sugere a não participação ativa, ou mesmo o aumento do limiar, o que significaria que os canais estariam participando de

forma ativa da hiperalgesia. Além disso, o bloqueio seletivo de canais, pode ser alvo para possíveis tratamentos para controle da dor.

Os resultados obtidos nesta pesquisa, sugerem que KATP e Kv, estão envolvidos no controle endógeno da dor neuropática diabética,

Os KATP são inibidos pelo ATP intracelular, servindo assim como identificadores metabólicos celulares, sendo sugerido que estes possuem ação protetora neuronal (Du e Gamper, 2013). Além da participação ativa dos KATP observada no modelo testado, investigamos se houve alguma tentativa fisiológica de aumento dessa participação, como por exemplo, modulação na expressão desta família de canais, em neurônios periféricos, especificamente nos coxins plantares.

Para concluir essa investigação aplicou-se a técnica de imunohistoquímica com marcador para a subunidade α Kir 6.2, este e outros produtos da família de Katp, como por exemplo: Kir 6.1, SUR1 e SUR2 RNAm, foram encontrados em lisados de DRG, e a expressão destas proteínas foram anteriormente confirmadas pelas técnicas de Western Blot e imunohistoquímica em ratos, com exceção de Kir 6.1.

Quadro 4. Subunidades α da família de canais para potássio sensíveis ao ATP e ensaios possíveis em ratos

Família de canal	Subunidade α	Espécie	Ensaio	Comentário
KATP	Kir6.1, Kir6.2, SUR1, SUR2	Rato	RT-PCR, Imunohistoquímica, Western Blot	Kir 6.1, Kir6.2, SUR1 e SUR2 mRNA são produtos encontrados em lisados de DRG; a expressão de proteínas foram confirmadas pela técnica de Western Blot e Imunohistoquímica em subpopulações de neurônios de vários tamanhos (Kir6.2, SUR1 e SUR2 mRNA).

Fonte: Adaptado de Du e Gamper, 2013. (Du and Gamper, 2013)

A análise imunohistológica mostrou aumento da expressão de canais KATP, sugerindo que além da participação ativa anteriormente comprovada, estes canais encontram-se expressos em maior número. Esse aumento pode ser por tentativa do sistema somatossensorial periférico de tentar controlar a dor neuropática diabética, no entanto, precisa ser melhor investigado.

Resultados divergentes quanto à expressão de canais KATP, foram observados por Wu *et al.*, (2011), que verificaram redução na expressão da proteína

para as subunidades SUR1, SUR2 e Kir6.1 do canal KATP, quando associadas com hiperalgesia térmica e alodinia mecânica, no entanto, este estudo não avaliou a expressão de Kir 6.2.

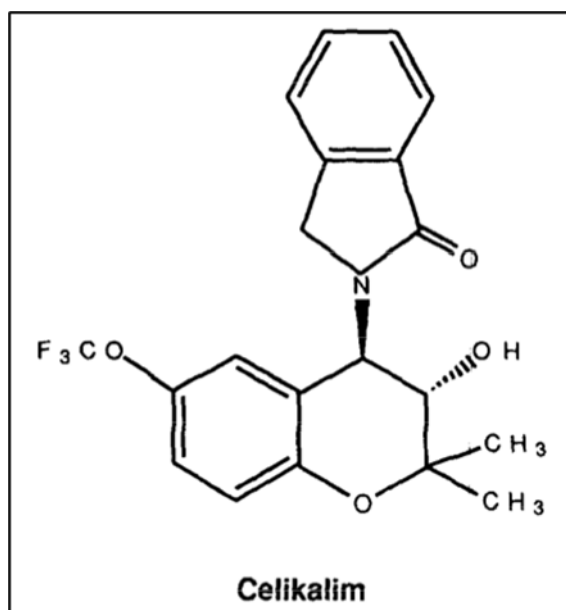
Apesar de resultados aparentemente divergentes, não é possível extrapolar tais resultados para a presente pesquisa, pois trata-se de modelos de indução de diabetes diferentes. Wu *et al.* (2011) usaram um modelo de indução de DM1 a partir da utilização de estreptozotocina em ratos.

Semelhantemente ao presente estudo, Cunha e Ferreira (2010) demonstraram a participação dos KATP no controle endógeno da dor, porém em modelos de indução aguda de dor inflamatória.

Patelunas-Hoffman *et al.* (1994) avaliaram o efeito de ativadores de KATP, em modelo de ratos diabéticos e perceberam que a celikalim, agente anti-hipertensivo, que atua por meio da abertura de canais para potássio e possui capacidade antitrombótica (), foi capaz de recuperar o fluxo sanguíneo e a velocidade de condução nervosa do nervo ciático, destes animais após duas semanas de tratamento.

Estudo mostrou que a celikalim apresenta efeitos benéficos na função nervosa na neuropatia diabética experimental induzida por estreptocotocina, (Hohman, Cotter e Cameron, 2000). Não encontrou-se estudos, que avaliaram a modulação do limiar nociceptivo, na dor neuropática diabética induzida por dieta hiperlipídica HFD 40% e a participação de canais KATP.

Figura 22. Estrutura química da substância Celikalim.



Fonte: Patelunas-Hoffman *et al.*, 1994. (Patelunas-Hoffman *et al.*, 1994)

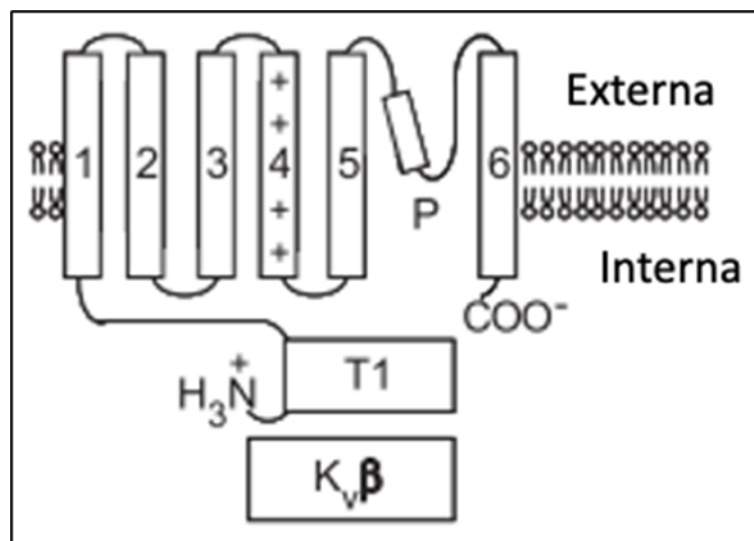
Entretanto, Kv são canais transmembranares que possuem sensibilidade à mudança de voltagem ocorrida no potencial de membrana de neurônio.

Durante a variação de voltagem, estes canais ficam encarregados de restabelecer a célula despolarizada para seu estado de repouso. Estes canais são muito numerosos, catalogadas 12 famílias diferentes, denominadas Kv1 a Kv12, algumas com mais de um canal, como é o exemplo a família Kv1 que compreende oito canais diferentes (Kv1.1 a Kv1.8) (Ocaña *et al.*, 2004; Kubo *et al.*, 2005).

Toda a família de canais para potássio sensíveis à tensão possui estrutura semelhante, formando tetrâmeros de uma subunidade, são caracterizadas por proteínas transmembranas de seis domínios e terminais intracelulares N e C, sendo que o quinto e sexto domínio formam a região porosa do canal, região P (Ocaña *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que o carregamento do quarto domínio, permite a abertura do canal, quando a célula é depolarizada, no esquema abaixo, este carregamento foi esquematizado com o sinal positivo (++++). (Figura 22). No meio intracelular, o domínio T1 está incumbido na montagem das subunidades e na interação da sensibilidade do canal com elas.

Figura 23. Representação esquemática da estrutura de canais para potássio sensíveis à voltagem (Kv)



Fonte: Adaptado de Ocaña *et al.*, (2004) (Ocaña *et al.*, 2004)

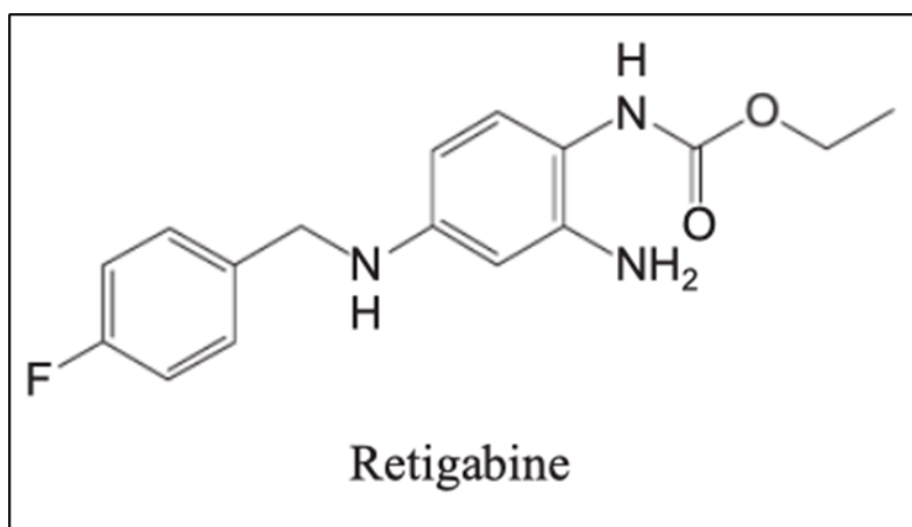
Diversas drogas são utilizadas para investigar a participação destes canais na antinocicepção, normalmente, drogas sintéticas, bloqueadores destes canais. Toxinas de aranha e escorpiões, são descritas como bloqueadores mais seletivos destes canais, são exemplos dessas toxinas: hanatoxinas (bloqueador preferencial de canal Kv2) (Shiau *et al.*, 2003), heteropodatoxinas (bloqueador seletivo de canais Kv4.2) (Sanguinetti *et al.*, 1997), calitoxina, margatoxina ou agitoxina (bloqueadores de canais Kv1) (Kaczorowski Garcia, 1999), no entanto, drogas sintéticas também são comumente utilizadas para esse tipo de pesquisa, como por exemplo a 4-aminopiridina e o tetraetilamonio (TEA), bloqueadores não seletivos de Kv.

No presente estudo, utilizou-se o TEA para análise do envolvimento dos canais Kv na modulação da dor neuropática diabética e observou-se redução do limiar nociceptivo dos animais diabéticos acometidos pela dor neuropática. Bloqueadores de canais Kv tem sido foco de investigação para o desenvolvimento ou envolvimento de fármacos que auxiliem no controle da dor neuropática diabética.

Estudos demonstraram reduções significativas na expressão de subunidades e correntes de K⁺ dependentes de voltagem em modelos animais de dor neuropática (Rasband *et al.*, 2001).

Assim como os ativadores de KATP, os Kv também são alvo de pesquisa. Um grupo de pesquisadores, avaliou a ação da retigabina, um anticonvulsivante usado como tratamento adjuvante para epilepsias e tratamento de outras condições neurológicas, como enxaqueca e dor neuropática (Rundfeldt, 1997).

Figura 24. Estrutura química da substância retigabina.



Fonte: Rundfelt *et al.* 1997. (Rundfeldt, 1997)

Recentemente, observou-se que a etigabina é capaz de reduzir a excitabilidade neuronal por aumentar a estabilidade potencial de estado aberto em repouso dos canais KV7.2 / KV7 (Corbin-Leftwich *et al.*, 2016). Um estudo recente demonstrou, que a retigabina foi capaz de atenuar significativamente a hipersensibilidade mecânica em ratos com dor neuropática diabética, induzida por estreptozotocina. Esse efeito foi completamente revertido quando os canais KV7 foram bloqueados. O efeito da retigabina foi semelhante ao da gabapentina (Djouhri *et al.*, 2019). A gabapentina é um fármaco utilizado na clínica médica, indicada para o tratamento de várias formas de epilepsia e alívio da dor prolongada causada por lesões nos nervos em casos, por exemplo, de diabetes, herpes zóster ou esclerose lateral amiotrófica.

No presente estudo observou-se, que os KATP e Kv possuem grande importância na modulação endógena da dor neuropática diabética induzida por dieta hiperlipídica, abrindo perspectivas para investigações futuras. Os KATP e Kv, podem

ser alvos para uma farmacoterapia mais efetiva no controle da DNP e melhora da qualidade de vida dos pacientes acometidos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que o modelo de indução de DM 2 por dieta hiperlipídica (HFD 40%) em camundongos *swiss* foi capaz de gerar alterações fisiopatológicas no nervo ciático, que induziram à hiperalgesia mecânica, sendo um modelo eficaz para a indução de DNP.

Nossos resultados também demonstram não haver participação da via PI3Ky/Akt/NO/GMPc no controle endógeno deste modelo de dor, demonstrando inclusive a redução na expressão da p-AKT, o que aparentemente é decorrente do cenário sindrômico de obesidade e diabetes. Por outro lado, os KATP e Kv parecem ter importante papel fisiológico na tentativa de controle endógeno da dor neuropática diabética, sendo observado inclusive o aumento da expressão de KATP no coxim plantar, o que acredita-se ser uma reação fisiológica de potencialização destes canais, durante a tentativa de controle da dor.

Acredita-se que drogas que atuem como ativadores dos canais iônicos supracitados ou mesmo que ativem responsáveis fisiológicos pelo aumento da quantidade destes canais, podem representar alvos terapêuticos promissores e quem sabe, atuar no alívio efetivo dos sintomas doloroso de pacientes diabéticos acometidos pela DNP.

Mais investigações são necessárias para que possam-se desvendar os componentes de vias analgésicas que auxiliarão de forma efetiva os sintomas dolorosos dos pacientes com dor neuropática diabética.

REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, A. *et al.* (2014) 'Potential role of nitric oxide synthase isoforms in pathophysiology of neuropathic pain', *Inflammopharmacology*, 22(5), pp. 269–278. doi: 10.1007/s10787-014-0213-0.
- AHLAWAT, A. AND SHARMA, S. (2018) 'A new promising simultaneous approach for attenuating type II diabetes mellitus induced neuropathic pain in rats: iNOS inhibition and neuroregeneration', *European Journal of Pharmacology*, 818(March), pp. 419–428. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.11.010.
- AL-AWAR, A. *et al.* (2016) 'Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models', *Journal of Diabetes Research*, 2016. doi: 10.1155/2016/9051426.
- ALMEIDA, D. L. D. E. (2016) 'Sistemas Canabinoide e Opióide modulam neuropatia diabética em camundongos obesos Sistemas Canabinoide e Opióide modulam neuropatia diabética em camundongos obesos'.
- ALVES, D. P. *et al.* (2013) 'NO/cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation', *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 28, pp. 8–13. doi: 10.1016/j.niox.2012.09.001.
- AUSTIN, P. J. and MOALEM-TAYLOR, G. (2010) 'The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines', *Journal of Neuroimmunology*. Elsevier B.V., 229(1–2), pp. 26–50. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.08.013.
- BANDEIRA, S. de M. *et al.* (2013) 'Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), pp. 3265–3284. doi: 10.3390/ijms14023265.
- BARKE, A. (2019) 'Chronic Pain has arrived in the ICD-11', *ISAP - International Association for the Study of Pain*, pp. 5–6. Available at: <https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/NewsDetail.aspx?ItemNumber=8340&navItemNumber=643>.
- BASBAUM, A. I. *et al.* (2009) 'Cellular and Molecular Mechanisms of Pain', *Cell*, 139(2), pp. 267–284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.
- BRØNS, C. and GRUNNET, L. G. (2017) 'Skeletal muscle lipotoxicity in insulin resistance and type 2 diabetes: A causal mechanism or an innocent bystander?', *European Journal of Endocrinology*, 176(2), pp. R67–R78. doi: 10.1530/EJE-16-0488.
- CAI, F. and HELKE, C. J. (2003) 'Abnormal PI3 kinase/Akt signal pathway in vagal afferent neurons and vagus nerve of streptozotocin-diabetic rats', *Molecular Brain Research*, 110(2), pp. 234–244. doi: 10.1016/S0169-328X(02)00652-6.
- CALCUTT, N. A. (2004) 'Experimental models of painful diabetic neuropathy.', *Journal of the neurological sciences*, 220(1–2), pp. 137–9. doi: 10.1016/j.jns.2004.03.015.

CARDOSO, T. *et al.* (2020) 'Obesity and Inflammatory Profile: Is Physical Exercise Able to Reverse This Process? A Mini Review', 4(2), pp. 1–7.

CARE, D. and SUPPL, S. S. (2018) 'Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetesd 2018', *Diabetes Care*, 41(January), pp. S13–S27. doi: 10.2337/dc18-S002.

DE CARVALHO VELOSO, C., RODRIGUES, Vanessa Gregório, *et al.* (2015) 'Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K⁺ channels pathway activation in mice', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 755, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.02.038.

DE CARVALHO VELOSO, C., RODRIGUES, Vanessa Gregório, *et al.* (2015) 'Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K⁺ channels pathway activation in mice', *European Journal of Pharmacology*, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.02.038.

CHACUR, M. *et al.* (2001) 'A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): Induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral perisciatic immune activation in rats', *Pain*, 94(3), pp. 231–244. doi: 10.1016/S0304-3959(01)00354-2.

CHANGE, L. (2003) 'Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system'.

CHEN, S.-P. *et al.* (2017) 'PI3K/Akt Pathway: A Potential Therapeutic Target for Chronic Pain', *Current Pharmaceutical Design*, 23(12), pp. 1860–1868. doi: 10.2174/1381612823666170210150147.

CHO, N. H. *et al.* (2018) 'IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045', *Diabetes Research and Clinical Practice*. Elsevier B.V., 138, pp. 271–281. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.023.

COMELLI, F. *et al.* (2010) 'Rimonabant, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, attenuates mechanical allodynia and counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in diabetic mice', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V., 637(1–3), pp. 62–69. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.03.061.

CORBIN-LEFTWICH, A. *et al.* (2016) 'Retigabine holds KV7 channels open and stabilizes the resting potential', *Journal of General Physiology*, 147(3), pp. 229–241. doi: 10.1085/jgp.201511517.

COSTA, A. *et al.* (2014) 'Ang-(1-7) activates the NO/cGMP and ATP-sensitive K⁺ channels pathway to induce peripheral antinociception in rats', *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. Elsevier Inc., 37(1), pp. 11–16. doi: 10.1016/j.niox.2013.12.007.

CUNHA, T. M. *et al.* (2010) 'Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Ky/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), pp. 4442–4447. doi: 10.1073/pnas.0914733107.

- CUNHA, T. M. and FERREIRA, S. H. (2010) 'Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), pp. 4442–4447. doi: 10.1073/pnas.0914733107.
- DARYABOR, G. *et al.* (2020) 'The Effects of Type 2 Diabetes Mellitus on Organ Metabolism and the Immune System', *Frontiers in Immunology*, 11(July). doi: 10.3389/fimmu.2020.01582.
- DJOUHRI, L. *et al.* (2019) 'Activation of Kv7 channels with the anticonvulsant retigabine alleviates neuropathic pain behaviour in the streptozotocin rat model of diabetic neuropathy', *Journal of Drug Targeting*, 27(10), pp. 1118–1126. doi: 10.1080/1061186X.2019.1608552.
- DU, X. and GAMPER, N. (2013) 'Potassium Channels in Peripheral Pain Pathways: Expression, Function and Therapeutic Potential', *Current Neuropharmacology*, pp. 621–640. doi: 10.2174/1570159x113119990042.
- DUBY, J. J. *et al.* (2004) 'Diabetic neuropathy: An intensive review', *American Journal of Health-System Pharmacy*, 61, pp. 160–176.
- E.A., M. *et al.* (2018) 'CAN CLEOME VISCOSA PROTECT AGAINST DIABETIC SCIATIC NEUROPATHY IN ALBINO RATS ' (1), pp. 274–280.
- ECKEL, R. H. *et al.* (2005) 'The metabolic syndrome.', *Lancet*, 365(9468), pp. 1415–28. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61794-3.
- ECKEL, R. H. *et al.* (2010) 'The metabolic syndrome.', *Lancet*, 375, pp. 181–183. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61794-3.
- EDWARDS, J. L. *et al.* (2008) 'Diabetic neuropathy: mechanisms to management.', *Pharmacology & therapeutics*, 120(1), pp. 1–34. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.05.005.
- ELHADY, M. *et al.* (2019) 'Fatty pancreas in relation to insulin resistance and metabolic syndrome in children with obesity', *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 32(1), pp. 19–26. doi: 10.1515/jpem-2018-0315.
- ELIAS, I. *et al.* (2012) 'Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance.', *Diabetes*, pp. 1–13. doi: 10.2337/db11-0832.
- EMANUELA, F. *et al.* (2012) 'Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome', *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012. doi: 10.1155/2012/476380.
- FELDMAN, E. L. *et al.* (2019) 'Diabetic neuropathy'.
- FINKELSTEIN, E. A. *et al.* (2012) 'Obesity and Severe Obesity Forecasts Through 2030', *American Journal of Preventive Medicine*, 42(6), p. A3. doi: 10.1016/s0749-3797(12)00266-8.

- FINNERUP, N. B. and JENSEN, T. S. (2006) 'Mechanisms of disease: mechanism-based classification of neuropathic pain-a critical analysis.', *Nature clinical practice. Neurology*, 2(2), pp. 107–15. doi: 10.1038/ncpneuro0118.
- FOX, P. W., HERSHBERGER, S. L., & BOUCHARD, T. J. (1996). Genetic and enviromental contributions to the acquisition of a motor skill. *Nature*, 384(28), 356-358. (1996) 'Inflammatory pain hypersensitivity', *Nature*, 384, pp. 356–358.
- GAO, F. and ZHENG, Z. M. (2014) 'Animal Models of Diabetic Neuropathic Pain', pp. 100–106.
- GOMES, F. I. F., CUNHA, F. Q. and CUNHA, T. M. (2020) 'Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier, 176(November 2019), p. 113862. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113862.
- GONZÁLEZ-MUNIESA, P. *et al.* (2017) 'Obesity', *Nature Reviews Disease Primers*, 3. doi: 10.1038/nrdp.2017.34.
- GRANADOS-SOTO, V., ARGÜELLES, C. F. and ORTIZ, M. I. (2002) 'The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels', *Neuropharmacology*, 43(5), pp. 917–923. doi: 10.1016/S0028-3908(02)00130-2.
- GREGORY, E. N. *et al.* (2011) 'mTOR in spinal cord neurons mediates hypersensitivity induced by peripheral inflammation', *Neuroscience*, 169(3), pp. 1392–1402. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.067.mTOR.
- HAMZA, M. *et al.* (2010) 'Nitric oxide is negatively correlated to pain during acute inflammation', *Molecular Pain*, 6, pp. 1–10. doi: 10.1186/1744-8069-6-55.
- HICKS, C. W. *et al.* (2020) 'Peripheral Neuropathy and All-Cause and Cardiovascular Mortality in U.S. Adults'. doi: 10.7326/M20-1340.
- HOHMAN, T. C., COTTER, M. A. and CAMERON, N. E. (2000) 'ATP-sensitive K⁺ channel effects on nerve function, Na⁺, K⁺ ATPase, and glutathione in diabetic rats', *European Journal of Pharmacology*, 397(2–3), pp. 335–341. doi: 10.1016/S0014-2999(00)00227-2.
- HUANG, X. *et al.* (2018) 'The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes', *International Journal of Biological Sciences*, 14(11), pp. 1483–1496. doi: 10.7150/ijbs.27173.
- II, M. *et al.* (2005) 'Neuronal nitric oxide synthase mediates statin-induced restoration of vasa nervorum and reversal of diabetic neuropathy', *Circulation*, 112(1), pp. 93–102. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.511964.
- JANG, M. H. *et al.* (2008) 'Inhibition of cholinesterase and amyloid- β ; aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*', *Phytotherapy Research*, 22(4), pp. 544–549. doi: 10.1002/ptr.

- JENSEN, T. S. *et al.* (2011) 'A new definition of neuropathic pain', *Pain. International Association for the Study of Pain*, 152(10), pp. 2204–2205. doi: 10.1016/j.pain.2011.06.017.
- KACZOROWSKI, G. J., & GARCIA, M. L. (1999) 'Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels', *Current Opinion the Chemical Biology*.
- KAHN, B. B. and FLIER, J. S. (2000) 'Obesity and insulin resistance', *The Journal of Clinical Investigation*, 106(4), pp. 473–481. doi: 10.1172/JCI10842.
- KAPUR, D. (2001) 'Neuropathic pain and diabetes.', *Diabetes/metabolism research and reviews*, 19 Suppl 1, pp. S9-15. doi: 10.1002/dmrr.359.
- KITADE, H. *et al.* (2017) 'Nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: New insights and potential new treatments', *Nutrients*, 9(4), pp. 1–13. doi: 10.3390/nu9040387.
- KUBO, Y. *et al.* (2005) 'International union of pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels', *Pharmacological Reviews*, 57(4), pp. 509–526. doi: 10.1124/pr.57.4.11.
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203-210.
- LATREMOLIERE, A. and WOOLF, C. J. (2010) 'Central Sensitization: A generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity', *J Pain*, 10(9), pp. 895–926. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.Central.
- LENZEN, S. (2008) 'The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes', *Diabetologia*, 51(2), pp. 216–226. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7.
- LEVY, D., KUBES, P. and ZOCHODNE, D. W. (2001) 'Delayed peripheral nerve degeneration, regeneration, and pain in mice lacking inducible nitric oxide synthase', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(5), pp. 411–421. doi: 10.1093/jnen/60.5.411.
- LI, J. *et al.* (2018) 'Beneficial Effects of Electroacupuncture on Neuropathic Pain Evoked by Spinal Cord Injury and Involvement of PI3K-mTOR Mechanisms', *Biological Research For Nursing*, 21(1), pp. 5–13. doi: 10.1177/1099800418804896.
- LIU, H. *et al.* (2012) 'Angiogenesis Impairment in Diabetes: Role of Methylglyoxal-Induced Receptor for Advanced Glycation Endproducts, Autophagy and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2', *PLoS ONE*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0046720.
- LOESER, J. D. and MELZACK, R. (1999) 'Pain: An overview', *Lancet*, 353(9164), pp. 1607–1609. doi: 10.1016/S0140-6736(99)01311-2.

DE LUCA, C. and OLEFSKY, J. M. (2006) 'Stressed out about obesity and insulin resistance.', *Nature medicine*, 12(1), pp. 41–42; discussion 42. doi: 10.1038/nm0106-41.

MATHIE, A., WOOLTORTON, J. R. A. and WATKINS, C. S. (1998) 'Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents', *General Pharmacology*, 30(1), pp. 13–24. doi: 10.1016/S0306-3623(97)00034-7.

MATSUDA, A. *et al.* (2014) 'Pancreatic fat accumulation, fibrosis, and acinar cell injury in the zucker diabetic fatty rat fed a chronic high-fat diet', *Pancreas*, 43(5), pp. 735–743. doi: 10.1097/MPA.000000000000129.

MCQUAY, H. J. *et al.* (1996) 'A systematic review of antidepressants in neuropathic pain.', *Pain*, 68(2–3), pp. 217–27.

MENDELL, Jerry R. and SAHENK, Z. (2003) 'Painful sensory neuropathy.', *The New England journal of medicine*, 349(3), pp. 306–307; author reply 306-307. doi: 10.1056/NEJMcp022282.

MENDELL, J R and SAHENK, Z. (2003) 'Painful sensory neuropathy', *N Engl J Med*, 348(1533-4406 (Electronic)), pp. 1243–1255. doi: 10.1056/NEJMcp022282.

MERGIA, E. *et al.* (2018) 'Distinct functions of soluble guanylyl cyclase isoforms NO-GC1 and NO-GC2 in inflammatory and neuropathic pain processing', *Pain*, 160(3), p. 1. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001440.

Millan, M. J. (2002) 'Descending control of pain', *Progress in Neurobiology*, 66(6), pp. 355–474.

MOHAMED E.A. MOSTAFA, Abdullah H. Altemani and ASHRAF M. F. Kamel (2018) 'Can Cleome Viscosa Protect Against Diabetic Sciatic Neuropathy in Albino Rats?', (1), pp. 274–280.

MORALES-VIDAL, S. *et al.* (2012) 'Diabetic peripheral neuropathy and the management of diabetic peripheral neuropathic pain', *Postgrad Med*, 124(4), pp. 145–153. doi: 10.3810/pgm.2012.07.2576.

NERRY, C. and CUNHA, T. (2020) 'Peripheral dipyrone analgesia depends on PI3Ky/AKT', *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2.

NGUYEN, D. V., SHAW, L. C. and GRANT, M. B. (2012) 'Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes', *Frontiers in Endocrinology*, 3(DEC), pp. 1–7. doi: 10.3389/fendo.2012.00170.

OBROSOVA, I. G. *et al.* (2010) 'High-fat diet-induced neuropathy of prediabetes and obesity: Effect of PMI-5011, an ethanolic extract of artemisia dracunculus L.', *Mediators of Inflammation*, 2010, pp. 19–23. doi: 10.1155/2010/268547.

OCAÑA, M. *et al.* (2004) 'Potassium channels and pain: Present realities and future opportunities', *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3 SPEC. ISS.), pp. 203–219. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.026.

OLIVEIRA ANDRADE, J. M. *et al.* (2014) 'Cross talk between angiotensin-(1-7)/Mas axis and sirtuins in adipose tissue and metabolism of high-fat feed mice.', *Peptides*. Elsevier Inc., 55, pp. 158–65. doi: 10.1016/j.peptides.2014.03.006.

OLIVEIRA, J. E. P. de, JÚNIOR, R. M. M. and VENCIO, S. (2018) Diretrizes 2017-2018. Available at: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>.

OUCHI, N. *et al.* (2011) 'Adipokines in inflammation and metabolic disease', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 11(2), pp. 85–97. doi: 10.1038/nri2921.

PATELUNAS-HOFFMAN, D. M. *et al.* (1994) 'Analysis of the potassium channel openers celikalim, pinacidil and cromakalim in platelet models of thrombosis', *Thrombosis Research*, 74(5), pp. 441–452. doi: 10.1016/0049-3848(94)90265-8.

PATIL, P. R. *et al.* (2015) 'Opioid Use in the Management of Diabetic Peripheral Neuropathy (DPN) in a Large Commercially Insured Population', *Clinical Journal of Pain*, 31(5), pp. 414–424. doi: 10.1097/AJP.000000000000124.

PEREIRA VALADARES, W. *et al.* (2017) 'Acute Physical Exercise Promotes Peripheral Analgesia by Activation of the Opioidergic System in Mice with Diabetic Peripheral Neuropathy (DPN)'. doi: 10.2174/2212707005666180130153444.

PETERSEN, M. C. and SHULMAN, G. I. (2018) 'Mechanisms of insulin action and insulin resistance', *Physiological Reviews*, 98(4), pp. 2133–2223. doi: 10.1152/physrev.00063.2017.

POP-BUSUI, R. *et al.* (2016) 'Inflammation as a Therapeutic Target for Diabetic Neuropathies', *Current Diabetes Reports*, 16(3), pp. 1–10. doi: 10.1007/s11892-016-0727-5.

POP-BUSUI, R. *et al.* (2017) 'Diabetic neuropathy: A position statement by the American diabetes association', *Diabetes Care*, 40(1), pp. 136–154. doi: 10.2337/dc16-2042.

PREGUIÇA, I. *et al.* (2020) 'Diet-induced rodent models of diabetic peripheral neuropathy, retinopathy and nephropathy', *Nutrients*, 12(1). Available at: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L2003575450%0Ahttp://dx.doi.org/10.3390/nu12010250>.

PRITCHARD, R. A. *et al.* (2016) 'Different phosphoinositide 3-kinase isoforms mediate carrageenan nociception and inflammation', 157(1).

RASBAND, M. N. *et al.* (2001) 'Distinct potassium channels on pain-sensing neurons', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), pp. 13373–13378. doi: 10.1073/pnas.231376298.

REIS, G. M. L. *et al.* (2009) 'Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide', *Life Sciences*. Elsevier Inc., 85(9–10), pp. 351–356. doi: 10.1016/j.lfs.2009.06.012.

ROMERO, T. R. L. and DUARTE, I. D. G. (2012) 'N-Palmitoyl-ethanolamine (PEA) induces Peripheral Antinociceptive Effect by ATP-sensitive K⁺ Channel activation', *Journal of Pharmacological Sciences*, 8, pp. 6–10.

RUNDFELDT, C. (1997) 'The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K⁺ channels in neuronal cells', *European Journal of Pharmacology*, 336(2–3), pp. 243–249. doi: 10.1016/S0014-2999(97)01249-1.

SAAD, S. S. T. *et al.* (2016) 'Nitric oxide is involved in ibuprofen preemptive analgesic effect in the plantar incisional model of postsurgical pain in mice.', *Neuroscience letters*, 614, pp. 33–8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.12.034.

SAHOO, K. *et al.* (2015) 'Childhood obesity: causes and consequences.', *Journal of family medicine and primary care*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 4(2), pp. 187–92. doi: 10.4103/2249-4863.154628.

SANGUINETTI, M. C. *et al.* (1997) 'Heteropodatoxins: Peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels', *Molecular Pharmacology*, 51(3), pp. 491–498.

SBD (2020) 'Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2020', p. 489. Schestatsky, P. (2008) 'Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática', *Revista HCPA*, 28(3), pp. 178–187.

SHIAU, Y. S. *et al.* (2003) 'Structural Basis of Binding and Inhibition of Novel Tarantula Toxins in Mammalian Voltage-Dependent Potassium Channels', *Chemical Research in Toxicology*, 16(10), pp. 1217–1225. doi: 10.1021/tx0341097.

SINDRUP, S. H. and JENSEN, T. S. (2000) 'Pharmacologic treatment of pain in polyneuropathy.', *Neurology*, 55(7), pp. 915–920. doi: 10.1212/WNL.55.7.915.

SOUSA, E. M. De (2009) 'Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage Michael', *Annu Rev Neurosci*, 32, pp. 1–32. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135531.Neuropathic.

STEIN, C. and MACHELSKA, H. (2011) 'Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: Implications for pain therapy', *Pharmacological Reviews*, 63(4), pp. 860–881. doi: 10.1124/pr.110.003145.

SYTZE VAN DAM, P. *et al.* (2013) 'Pathogenesis of diabetic neuropathy: Focus on neurovascular mechanisms', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, 719(1–3), pp. 180–186. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.07.017.

SZKUDELSKI, T. (2001) 'Mechanism of Streptozotocin'. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x.

TANG, Q. *et al.* (2007) 'Inhibition of spinal constitutive NOS-2 by 1400W attenuates tissue injury and inflammation-induced hyperalgesia and spinal p38 activation', *European Journal of Neuroscience*, 25(10), pp. 2964–2972. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05576.x.

TAWFIK, M. K. *et al.* (2018) 'Neuroprotective effect of duloxetine in a mouse model of diabetic neuropathy: Role of glia suppressing mechanisms', *Life Sciences*, 205(May), pp. 113–124. doi: 10.1016/j.lfs.2018.05.025.

TAYLOR, S. I. (1999) 'Deconstructing Type 2 Diabetes Minireview', *Cell*, 97(April), pp. 9–12.

TOKUYAMA, Y. *et al.* (1995) 'Evolution of β -cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat', *Diabetes*, 44(12), pp. 1447–1457. doi: 10.2337/diab.44.12.1447.

Vanderah, T. W. (2007) 'Pathophysiology of Pain', *Medical Clinics of North America*, 91(1), pp. 1–12.

VED, N. *et al.* (2018) 'Diabetes-induced microvascular complications at the level of the spinal cord: a contributing factor in diabetic neuropathic pain', *Journal of Physiology*, 596(16), pp. 3675–3693. doi: 10.1113/JP275067.

WALTON, D. M., MINTON, S. D. and COOK, A. D. (2018) 'Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews The potential of transdermal nitric oxide treatment for diabetic peripheral neuropathy and diabetic foot ulcers', *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, pp. 1–4. doi: 10.1016/j.dsx.2018.07.003.

WIDEMAN, T. H., ZAUTRA, A. J. and EDWARDS, R. R. (2014) 'High-fat diet ingestion correlates with neuropathy in the duodenum myenteric plexus of obese mice with symptoms of type 2 diabetes', 154(11), pp. 2262–2265. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.005.Re-Thinking.

WOOLF, C. J. (1994) 'A New Strategy for the Treatment of Inflammatory Pain: Prevention or Elimination of Central Sensitization', *Drugs*, 47(5), pp. 1–9. doi: 10.2165/00003495-199400475-00003.

WU, K. K. and HUAN, Y. (2007) 'Diabetic atherosclerosis mouse models.', *Atherosclerosis*, 191(2), pp. 241–9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.030.

WU, X. F. *et al.* (2011) 'Reopening of ATP-sensitive potassium channels reduces neuropathic pain and regulates astroglial gap junctions in the rat spinal cord', *Pain*, 152(11), pp. 2605–2615. doi: 10.1016/j.pain.2011.08.003.

XU, Q. *et al.* (2011) 'Spinal phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling cascades in inflammation-induced hyperalgesia.', *The Journal of*

neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 31(6), pp. 2113–24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2139-10.2011.

YE, D.-W. *et al.* (2017) 'PI3K/Akt Pathway: A Potential Therapeutic Target for Chronic Pain', *Current Pharmaceutical Design*, 23(12), pp. 1860–1868. doi: 10.2174/1381612823666170210150147.

YOO, M. *et al.* (2012) 'Painful Diabetic Peripheral Neuropathy: Presentations, Mechanisms, and Exercise Therapy', *Journal of Diabetes Metabolism*, 29(6), pp. 997–1003. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

ZHUANG, Z.-Y. (2004) 'Phosphatidylinositol 3-Kinase Activates ERK in Primary Sensory Neurons and Mediates Inflammatory Heat Hyperalgesia through TRPV1 Sensitization', *Journal of Neuroscience*, 24(38), pp. 8300–8309. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2893-04.2004.

ZULOAGA, K. L. *et al.* (2016) 'High fat diet-induced diabetes in mice exacerbates cognitive deficit due to chronic hypoperfusion', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(7), pp. 1257–1270. doi: 10.1177/0271678X15616400.