



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLÓGIA E FARMACOLOGIA**

FLÁVIO HENRIQUE PEQUENO DE MACEDO

**ELEVAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TNF PELO DIABETES
MELLITUS ALTERA ATIVIDADE DE CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES
DE VOLTAGEM, EFEITO ATENUADO PELO TRATAMENTO COM O
COMPOSTO A**

BELO HORIZONTE – MG

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

FLÁVIO HENRIQUE PEQUENO DE MACEDO

**ELEVAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TNF PELO DIABETES
MELLITUS ALTERA ATIVIDADE DE CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES
DE VOLTAGEM, EFEITO ATENUADO PELO TRATAMENTO COM O
COMPOSTO A**

BELO HORIZONTE – MG

2017

FLÁVIO HENRIQUE PEQUENO DE MACEDO

**ELEVAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TNF PELO DIABETES
MELLITUS ALTERA ATIVIDADE DE CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES
DE VOLTAGEM, EFEITO ATENUADO PELO TRATAMENTO COM O
COMPOSTO A**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia e Farmacologia da
Universidade Federal de Minas Gerais para
a obtenção do título de Doutor em Fisiologia
e Farmacologia

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

BELO HORIZONTE - MG

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Macedo, Flávio Henrique Pequeno de

Elevação da Concentração Plasmática de TNF pelo diabetes mellitus altera a atividade de canais de sódio dependentes de voltagem, efeito atenuado pelo tratamento com o Composto A [manuscrito] / Flávio Henrique Pequeno de Macedo. - 2017.

138 f. : il.

Orientador: Jader dos Santos Cruz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto Ciências Biológicas.

1.Dor neuropática diabética. 2.Fator de necrose tumoral. 3.Neurônios do DRG. 4.Canál de sódio Nav 1.7. I.Cruz, Jader dos Santos . II.Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto Ciências Biológicas. III.Título.

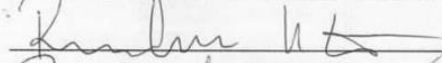
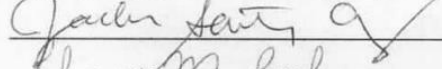
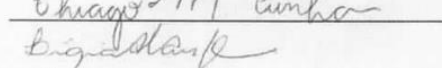
CDU: 612

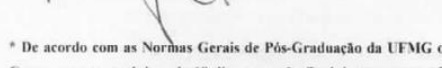
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 283 DE FLÁVIO HENRIQUE PEQUENO DE MACEDO

Às 9:00 horas do dia 31 do mês de agosto de 2017, no Auditório da Bioinformática - Bloco F2 - Sala 254, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Flávio Henrique Pequeno de Macedo**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Richardson Naves Leão**, Instituto do Cérebro/UFRN, **Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha**, FMRP/USP, **Profa. Drª. Lígia Araújo Naves Kushmerick**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "ELEVAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TNF PELO DIABETES MELLITUS ALTERA ATIVIDADE DE CANAIS DE SÓDIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM, EFEITO ATENUADO PELO TRATAMENTO COM O COMPOSTO A". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar aprovado 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, 31 de agosto de 2017.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

 (Via Skype)





* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá certificado de conclusão do doutorado.

Agradecimentos

Aos membros do Laboratório de Membranas Excitáveis que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Jader dos Santos Cruz por ter me aceito como orientando e por sempre ter buscado, através do desenvolvimento desse trabalho, o crescimento e amadurecimento da minha carreira acadêmica e científica.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, pela oportunidade de realização deste trabalho concomitante com meu desenvolvimento científico e acadêmico.

Ao Professor Doutor José Felipe Pinho da Silva por todo o apoio, auxílio e discussões sobre o desenvolvimento deste trabalho correntes mesmo antes do meu ingresso no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia como aluno de Doutorado.

À Professora Doutora Maria Aparecida Ribeiro Vieira e ao Professor Doutor Christopher Kushmerick pelas contribuições com o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Helton José dos Reis e às Professoras Doutoras Janetti Nogueira de Francischi e Lucíola da Silva Barcelos pelas contribuições com o presente trabalho realizadas na minha Qualificação após criteriosa avaliação.

Aos colegas e Professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia pelo convívio e por todas as experiências que envolveram ensinamentos e trocas de conhecimento.

À Professora Doutora Rosária Dias Aires, à Pós-Doutoranda Tatiane de Oliveira Barreto Lopes, aos alunos de Doutorado Renata Cristina Mendes Ferreira e Daniel Portela Dias Machado e ao Mestre Esdras Guedes Fonseca por terem acreditado na ideia do presente trabalho e contribuído com a construção dos resultados.

À Professora Doutora Danielle Oliveira Costa Santos, aos Doutores Humberto Cavalcante Joca e Daniel de Castro Alves Moreira Lobo e ao colega Artur Santos Miranda pelas discussões sobre os experimentos em eletrofisiologia celular que muito adicionaram e contribuíram para a execução deste trabalho.

A Cintya, Nilda e Rodner pela ajuda junto a assuntos da coordenação da Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

Ao Professor Doutor Gerald W. Zamponi e aos integrantes do seu laboratório pela acolhida e auxílio no desenvolvimento de resultados que integram este trabalho. Em especial, agradeço à Lina Chen e Fang-Xiong pelos experimentos envolvendo cultura celular e transfecção.

Ao CNPq e à CAPES pelo financiamento do presente trabalho, em especial ao CNPq pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho em outro país, uma das melhores experiências da minha vida.

Ao meu ex-orientador Professor Doutor José Henrique Leal Cardoso, sem o qual eu sequer iniciaria esta jornada.

Ao técnico do Laboratório de Membranas Excitáveis José Narciso Fernandes, a quem hoje tenho como um grande amigo, pela ajuda neste trabalho.

Aos amigos Adriana Macedo, Adriano Jesus, Aline Campelo, Audrey Rocha, Benjamin Viart, Camila Freire, Carolina Bolaños, Carolina Colares, Daniel Lobo, Danielle Oliveira, Davi Germano, Edgar Gonzalez, Eduardo Teófilo, Eugênio Pacelli, Irene Viart, João Fernandes, Josilene Mercês, Juliana Cerf, Loï Cerf, Lucas Bleicher, Morgana Barroso, Taylena Teófilo e Thiago Coutinho por se fazerem presentes nos momentos difíceis no curso da realização deste trabalho, contribuindo com os momentos de leveza e descontração.

À minha família, que sempre me apoiou e depositou tanta esperança na minha pessoa. Ao meu pai e à minha mãe que, cada qual à sua maneira, me deram o suporte incondicional e indescritível que só os pais conseguem. Ao meu irmão, pelo apoio. À Léa, por todo o carinho e cuidado para comigo. E à minha avó, que padeceu este ano... Sempre mostrando orgulho pelo meu percurso acadêmico a qualquer pessoa com quem conversasse.

À família da minha esposa, hoje também minha, a quem tão bem me acolheu.

À minha esposa pelo seu imensurável suporte, companheirismo, apoio, incentivo e cuidado, fatores indispensáveis à execução deste trabalho.

À Deus, base de tudo o que me ajudou a chegar a este momento.

À minha família, esposa e amigos.

RESUMO

A Neuropatia Diabética Periférica (NDP) é a complicação mais comum do diabetes, atingindo aproximadamente 50% dos pacientes diabéticos e sendo a principal causa de morbidade por ulceração do pé e amputação. Dentre os pacientes que desenvolvem a NDP, entre 20 e 30% sofrem de Dor Neuropática Diabética (DND). Indivíduos afetados pela DND descrevem os episódios de dor como sensações de formigamento, queimação, dormência e/ou perfuração por agulhas eletrizadas. Estudos clínicos e pré-clínicos têm mostrado que pacientes diabéticos com DND apresentam aumento na concentração sérica de TNF, enquanto estudos com animais diabéticos têm mostrado que o TNF induz o aumento da expressão de canais de sódio $\text{Na}_v 1.7$, o que resultaria na sensibilização de terminais periféricos de neurônios nociceptores, fator que contribuiria para o desenvolvimento da DND. Atualmente, os tratamentos disponíveis para a DND resultam em alívio insatisfatório da dor para a maioria destes pacientes. Por isso, o presente trabalho verificou se o tratamento de ratos diabéticos com o Composto A, um agente natural com comprovada atividade anti-inflamatória, é capaz de prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia nestes animais. Para tanto, ratos Wistar com 28 dias de vida foram induzidos ao diabetes via injeção intraperitoneal de estreptozotocina (65 mg/kg). Durante o período de 60 dias, estes ratos tiveram avaliados seu limiar mecânico pelo método de Randall-Selitto. Após coleta de amostras de sangue, a concentração sérica de TNF foi medida nestes ratos no dia anterior à indução ao diabetes e no dia 60 após a indução pelo método de ELISA. No dia 60 após a indução ao diabetes, os ratos foram eutanasiados para obtenção de seus DRGs e dissociação de seus neurônios. Destes neurônios foram aferidas a corrente total de sódio pela técnica de *Patch Clamp*, na modalidade *Whole Cell*. Estes protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – sob o número de protocolo 233/2013. Os ratos do grupo Diabético apresentaram hiperglicemia sustentada em comparação com ratos do grupo Controle ($550,7 \pm 10,6$ mg/dl, $n=22$ e $117,9 \pm 1,7$ mg/dl, $n=24$, respectivamente, dia 60 após a indução ao diabetes). Neste parâmetro, ratos diabéticos tratados com o Composto A (Diabético + CA) apresentaram valores de glicemia similar aos do grupo Diabético ($539,4 \pm 30,1$ mg/dl, $n=7$). O grupo Diabético também mostrou redução do limiar mecânico quando comparado com o grupo Controle ($116,1 \pm 5,8$ g, $n=16$ e $212,1 \pm 5,9$ g, $n=18$, respectivamente, dia 60 após a indução ao diabetes), sendo esta redução do limiar mecânico do grupo Diabético atenuada no grupo Diabético + CA ($143,9 \pm 5,6$ g, $n=11$).

Concomitante com estes dados, os ratos do grupo Diabético exibiram elevada concentração sérica de TNF em comparação com os ratos do grupo Controle ($624,9 \pm 97,8$, $n=7$ e $340,3 \pm 16$, $n=7$, respectivamente), enquanto nos ratos do grupo Diabético + CA os valores verificados foram similares aos do grupo Controle ($320,8 \pm 10$, $n=7$). Em relação aos dados de eletrofisiologia celular, o grupo Diabético apresentou aumento da densidade da corrente total de sódio em comparação com o grupo Controle ($231,4 \pm 25,1$ pA/pF, $n = 10$ e $189,4 \pm 10,7$ pA/pF, $n = 18$, respectivamente). O grupo Diabético + CA, por sua vez, exibiu valores de densidade da corrente total de sódio semelhante aos do grupo Controle ($159,2 \pm 14,7$ pA/pF, $n = 12$). Estes dados indicam que o tratamento com o Composto A foi capaz de atenuar, mas não impedir completamente, o desenvolvimento da hiperalgesia. Esta atenuação resulta, possivelmente, da redução nos níveis de TNF sérico dos ratos do grupo Diabético + CA.

O presente trabalho também verificou os efeitos da exposição de neurônios dissociados do DRG ao TNF na concentração de 700 pg/ml (concentração similar à encontrada no sangue de ratos do grupo Diabéticos) sobre a densidade das correntes de sódio sensível à TTX (TTXs) e resistente à TTX (TTXr) pela técnica de *Patch Clamp*. Com 6 horas de exposição, o TNF induziu o aumento tanto na densidade da corrente de sódio TTXs ($\approx 89\%$) quanto na densidade da corrente de sódio TTXs ($\approx 65\%$). No entanto, se verificou que o TNF sensibiliza tanto a cinética de ativação estacionária rápida quanto a cinética de inativação rápida da corrente de sódio TTXs, apenas, causando hiperpolarização nos valores de $V_{1/2}$ na ordem de ≈ 5 mV e ≈ 3 mV, respectivamente. Com estes dados, nota-se que a concentração sérica de TNF encontrada nos ratos do grupo Diabético é capaz de alterar a corrente de sódio TTXs e TTXr, de forma a contribuir com o aumento da excitabilidade destes neurônios. Desta forma, a redução nos níveis séricos de TNF nos ratos do grupo Diabético + CA atenuaria o desenvolvimento da hiperalgesia nestes ratos.

Palavras-chave: dor neuropática diabética, fator de necrose tumoral, neurônios do DRG, canal de sódio $Na_v 1.7$

ABSTRACT

Peripheral Diabetic Neuropathy (PDN) is the most common complication of diabetes, affecting approximately 50% of diabetic patients and being the main cause of foot ulcer morbidity and amputation. Among patients who develop PDN, between 20 and 30% suffer from Diabetic Neuropathic Pain (DNP). Individuals affected by DNP describe episodes of pain such as tingling sensations, burning, numbness and/or drilling by electrified needles. Clinical and preclinical studies have shown that diabetic patients with DNP show an increase in serum TNF concentration, whereas studies with diabetic animals have shown that TNF induces increased expression of $\text{Na}_v 1.7$ sodium channels, which would result in sensitization of terminals periphery of nociceptive neurons, a factor that would contribute to the development of DNP. Currently, treatments available for DNP result in unsatisfactory pain relief for most of these patients. Therefore, the present study verified whether the treatment of diabetic rats with Compound A, a natural agent with proven anti-inflammatory activity, is able to prevent the development of hyperalgesia in these animals. For this, 28-day-old Wistar rats were induced to diabetes via intraperitoneal injection of streptozotocin (65 mg/kg). During the 60 day period, these rats had their mechanical threshold assessed by the Randall-Selitto method. After collection of blood samples, serum TNF concentration was measured in these rats on the day prior to diabetes induction and at day 60 after induction by the ELISA method. At day 60 after induction to diabetes, the rats were euthanized to obtain their DRGs and dissociate their neurons. From these neurons the total sodium current was measured by the Patch Clamp technique, in Whole Cell mode. These protocols were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) under the protocol number 233/2013. The rats of the Diabetic group had sustained hyperglycemia in comparison to control rats (550.7 ± 10.6 mg/dl, $n=22$ and 117.9 ± 1.7 mg/dl, $n=24$, respectively, day 60 after induction to diabetes). In this parameter, diabetic rats treated with Compound A (Diabetic + CA) showed glycemic values similar to those of the Diabetic group (539.4 ± 30.1 mg/dl, $n=7$). The Diabetic group also showed a reduction of the mechanical threshold when compared to the Control group (116.1 ± 5.8 g, $n=16$ and 212.1 ± 5.9 g, $n=18$, respectively, day 60 after induction to diabetes). This reduction in the mechanical threshold of the diabetic group was attenuated in the Diabetic + CA group (143.9 ± 5.6 g, $n=11$). Concomitant with these data, the rats of the Diabetic group exhibited a high serum TNF concentration compared to the Control group rats (624.9 ± 97.8 , $n=7$ and 340.3 ± 16 , $n=7$,

respectively), while in the Diabetic + CA rats the values verified were similar to those in the Control group (320.8 ± 10 , $n=7$). Regarding to the cellular electrophysiology data, the Diabetic group presented increase of total sodium current density in comparison with the Control group (231.4 ± 25.1 pA/pF, $n=10$ and 189.4 ± 10.7 pA/pF, $n=18$, respectively). The Diabetic + CA group, on the other hand, showed values of total sodium current density similar to those in the Control group (159.2 ± 14.7 pA/pF, $n=12$). These data indicate that treatment with Compound A was able to attenuate, but not completely prevent, the development of hyperalgesia. This attenuation is possibly a result of the reduction in serum TNF levels of the rats from the Diabetic + CA group.

The present work also verified the effects of the exposure of neurons dissociated from DRG to TNF at a concentration of 700 pg/ml (concentration similar to that found in the blood of rats from the Diabetic group) over both TTX-sensitive sodium currents (TTXs) and resistant to TTX (TTXr) by the Patch Clamp technique. After 6 hours exposure, TNF induced the increase in both TTX sodium current density ($\approx 89\%$) and TTXr sodium current density ($\approx 65\%$). However, it was found that TNF sensitizes both the fast stationary activation kinetics and the fast inactivation kinetics of the TTXs sodium current, only, causing hyperpolarization in the $V_{1/2}$ values in the order of ≈ 5 mV and ≈ 3 mV, respectively. With these data, it is noticed that the serum concentration of TNF found in the rats of the Diabetic group is able to induce a change in the sodium current TTXs and TTXr, in order to contribute with the excitability increase of these neurons. Thus, the reduction in serum TNF levels in the Diabetic + CA group rats would attenuate the development of hyperalgesia.

Key words: diabetic neuropathic pain, tumor necrosis factor, DRG neurons, sodium channel Nav 1.7

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Esquema da via de síntese do sorbitol.	3
FIGURA 2- Esquema da via de sinalização do TNF.	7
FIGURA 3- Traçado representativo de um potencial de ação de um neurônio do DRG	9
FIGURA 4- Ilustração da organização secundária do canal de sódio	11
FIGURA 5- Estruturas secundária e terciária detalhadas do canal de sódio	12
FIGURA 6- Ilustração dos estados aberto e fechado do canal de sódio e a posição de aminoácidos com funções específicas no filtro de seletividade	14
FIGURA 7- Ilustração dos diferentes estados visitados pelo canal de sódio	16
FIGURA 8- Ilustração da organização anatômica e funcional dos neurônios do DRG	19
FIGURA 9- Ilustração da extensão dos neurônios nociceptivos.....	20
FIGURA 10- Representação esquemática do curso temporal das medidas e protocolos utilizados	30
FIGURA 11- Representação esquemática do protocolo de pulsos de potencial de membrana utilizado para o registro da corrente total de sódio descrito no item 4.8	35
FIGURA 12- Representação esquemática dos potenciais de membrana estabelecidos para o registro da corrente total de sódio descrito no item 4.10.....	37
FIGURA 13- Representação esquemática dos potenciais de membrana estabelecidos para o registro da corrente total de sódio descrito no item 4.1	38
FIGURA 14- Medida quinzenal da glicemia	41
FIGURA 15- Medida quinzenal da massa corpórea	42
FIGURA 16- Medida quinzenal do consumo de ração no intervalo de tempo de 24 horas	43
FIGURA 17- Medida quinzenal do consumo de água no intervalo de tempo de 24 horas.....	43
FIGURA 18- Medida quinzenal do volume de urina excretado no intervalo de tempo de 24 horas	44
FIGURA 19- Medida quinzenal do fluxo urinário no intervalo de tempo de 24 horas.....	45
FIGURA 20- Avaliação do limiar mecânico pelo teste de Randall-Selitto.....	46
FIGURA 21- Curso temporal do teste de Randall-Selitto.....	47
FIGURA 22- Traçados representativos dos registros da corrente total de sódio	48
FIGURA 23- Comparativo da relação I-V entre os grupos controles e diabéticos estudados.....	49
FIGURA 24- Comparativo do pico da densidade de corrente da relação I-V entre os grupos controles e diabéticos estudados	49
FIGURA 25- Ativação dos canais de sódio no estado estacionário dos grupos controles e diabéticos estudados	50
FIGURA 26- Potencial onde se observa 50% de ativação da corrente total de sódio ($V_{1/2}$) dos grupos controles e diabéticos estudados	51
FIGURA 27- Dosagem de TNF sérico dos diferentes grupos estudados, antes da indução ao diabetes e após 60 dias da indução	51
FIGURA 28- Imagens de microscopia confocal de neurônios isolados do DRG mantidos por duas semanas em cultura	52

FIGURA 29 – Traçados representativos dos registros da corrente total de sódio em neurônios utilizados nos experimentos com a proteína CRMP2	53
FIGURA 30 – Comparativo da relação I-V entre os grupos estudados nos experimentos com a proteína CRMP2.....	54
FIGURA 31 – Comparativo do pico da densidade de corrente da relação I-V entre os grupos estudados nos experimentos com a proteína CRMP2	55
FIGURA 32 – Ativação dos canais de sódio no estado estacionário. Não se observou diferença estatística entre os grupos estudados entre os grupos estudados nos experimentos com a proteína CRMP2.....	55
FIGURA 33 – Traçados representativos dos registros da corrente total de sódio nos experimentos com TNF	56
FIGURA 34 – Comparativo da relação I-V entre os grupos estudado nos experimentos com TNF	57
FIGURA 35 – Comparativo do pico da densidade de corrente da relação I-V entre os grupos estudados nos experimentos com TNF.....	58
FIGURA 36 – Ativação dos canais de sódio no estado estacionário nos experimentos com TNF	59
FIGURA 37 – Potencial onde se observa 50% de ativação da corrente total de sódio nos experimentos com TNF	60
FIGURA 38 – Curva de inativação rápida estacionária dos canais de sódio dependentes de voltagem nos experimentos com TNF	62
FIGURA 39 – Potencial de membrana do estímulo pré-pulso que inativa metade da população e canais disponível nos experimentos com TNF	63
FIGURA 40 – Sobreposição das curvas de ativação dos canais de sódio no estado estacionário e inativação rápida estacionária nos experimentos com TNF	65
FIGURA 41 – Probabilidade da corrente de janela nos experimentos com TNF.	66

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Valores da inclinação das curvas de ativação estacionária da corrente total de sódio nos grupos Controle, Diabético, Controle + CA e Diabético + CA	50
TABELA 2 - Valores da inclinação das curvas de ativação estacionária da corrente total de sódio nos grupos Controle, CRMP2-WT, CRMP2-WT + TNF, CRMP2-K374A e CRMP2-K374A + TN	55
TABELA 3 - Valores da inclinação das curvas de ativação estacionária da corrente de sódio total, sensível e resistente a TTX sem exposição ou após exposição ao TNF.	60
TABELA 4 - Valores da inclinação das curvas de inativação estacionária rápida da corrente de sódio total, sensível e resistente a TTX sem exposição ou após exposição ao TNF	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM-17	Enzima metaloproteinase e desintegrina 17
Controle + CA	Ratos do grupo controle tratado com o Composto A
Diabético + CA	Ratos do grupo diabético tratado com o Composto A
DND	Dor neuropática diabética
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
I-V	Corrente-voltagem
IFMT	Isoleucina, fenilalanina, metionina e treonina
mTNF	Fator de Necrose Tumoral associado a membrana celular
MAPK p38	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
Na _v	Canais de sódio dependente de voltagem
NDP	Neuropatia Diabética Periférica
NF-κB	Fator nuclear-κB
sTNF	Fator de Necrose Tumoral solúvel
S1-S6	Seguimento transmembrana 1 ao 6
TACE	Enzima conversora de TNF
TNFR1	Receptor para TNF do tipo 1
TNFR2	Receptor para TNF do tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral do tipo
TTX	Tetrodotoxina
TTX-R	Resistente à TTX
TTX-S	Sensível à TTX

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Diabetes e Dor Neuropática Diabética	1
1.2 TNF	4
1.3 TNF e Dor Neuropática Diabética	8
1.4 Canais de sódio dependente de voltagem.....	9
1.5 TNF, canais de sódio dependente de voltagem e DND	18
1.6 Composto A	24
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Indução ao diabetes.....	29
4.2 Tratamento com o Composto A	30
4.3 Consumo de água, ração, fluxo urinário, glicemia e massa corpórea	30
4.4 Medida do grau de hiperalgesia pelo método de Randall e Selitto	31
4.5 Quantificação de TNF por ELISA	31
4.6 Dissociação dos neurônios do DRG para estudo da corrente total de sódio dos grupos Controle, Diabético, Controle + CA e Diabético + CA	32
4.7 Dissociação dos neurônios do DRG para estudo do efeito do TNF sobre a corrente total de sódio em neurônios do DRG transfectados com os plasmídeos para CRMP2-WT-GFP e CRMP2-K374A-GFP e para o estudo do efeito do TNF sobre as correntes de sódio TTXs e TTXr	33
4.8 Experimentos de <i>Patch Clamp</i> para estudo da corrente total de sódio em neurônios de ratos dos grupos Controle, Diabético, Controle + CA e Diabético + CA.....	34
4.9 Experimentos de <i>Patch Clamp</i> para estudo da corrente total de sódio em neurônios do DRG transfectados com CRMP2-WT-GFP e CRMP2- K374A-GFP	35
4.10 Experimentos de <i>Patch Clamp</i> para estudo do efeito agudo da exposição ao TNF sobre as correntes de sódio total, TTXs e TTXr nos neurônios dissociados do DRG.....	37
4.11 Produção de vírus para transfecção dos neurônios dissociados do DRG	38
4.12 Transfecção dos neurônios do DRG.....	39
4.13 Análises dos dados	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Efeito do tratamento crônico com o Composto A sobre os parâmetros de consumo de água, ração, volume urinário e fluxo urinário	41
5.1.1 Tratamento crônico com o Composto A não altera glicemia.....	41
5.1.2 Tratamento crônico com o Composto A promove redução da massa corpórea	41
5.1.3 Polifagia é atenuada em animais diabéticos tratados com o Composto A	42
5.1.4 Polidipsia é atenuada em ratos diabéticos tratados com o Composto A	43
5.1.5 Composto A reduz poliúria em ratos diabéticos	44
5.1.6 Fluxo Urinário dos ratos diabéticos é alterado pelo tratamento com o Composto A	44

5.2 Tratamento com o Composto A atenua hiperalgesia dos ratos diabéticos	45
5.3 Tratamento com o Composto A inibe aumento da densidade de corrente total de Na ⁺ observada nos neurônios do DRG dos animais diabéticos sem tratamento	47
5.4 Diabetes desloca para valores mais negativos a curva de ativação estacionária dos canais de Na ⁺ , efeito atenuado pelo tratamento com o Composto A	50
5.5 Composto A previne o aumento da concentração sérica de TNF resultante da hiperglicemia crônica	51
5.6 Proteína CRMP2 não parece constituir a via de sinalização entre a elevação de TNF plasmático e o aumento da densidade de corrente total de sódio.	52
5.6.1 Transfecção de neurônios do DRG pelo uso de adenovírus AVV5 é viável.....	52
5.6.2 Via de sinalização do TNF para aumento da expressão de Nav 1.7 provavelmente independe da proteína CRMP2	53
5.7 Exposição aguda ao TNF altera parâmetros da eletrofisiologia celular na corrente de sódio via canais sensíveis e resistentes à TTX	56
5.7.1 Exposição aguda de TNF aumenta corrente de sódio via canais sensíveis e resistentes à TTX.....	56
5.7.2 TNF altera dependência de voltagem para ativação dos canais de sódio sensíveis à TTX	58
5.7.3 TNF influencia cinética de inativação rápida estacionária dos canais de sódio sensíveis a TTX	60
5.7.4 TNF induz efeitos opostos sobre a probabilidade de ativação das correntes TTXs e TTXr	63
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS	82

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Diabetes e Dor Neuropática Diabética

A Organização Mundial de Saúde (WHO) define diabetes como uma doença crônica que decorre da produção deficiente de insulina ou da incapacidade do organismo de utilizá-la de forma eficiente. Como resultado, a concentração basal de glicose na corrente sanguínea se eleva, resultando em hiperglicemia (WHO, 2015). Segundo estimativas, 9% da população mundial maior de 18 anos é acometida pela diabetes (WHO, 2014a), enquanto cerca de 1,5 milhões de mortes tiveram como causa direta a diabetes (WHO, 2014b). A projeção da WHO aponta que, em 2030, a diabetes será a 7ª maior causa de mortes no mundo (MATHERS; LONCAR, 2006).

Pacientes com diabetes sofrem com complicações macrovasculares, como infarto no miocárdio, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica, e microvasculares, que se manifestam como neuropatia periférica (um de muitos mecanismos), retinopatia e nefropatia (CALLAGHAN *et al.*, 2011).

A neuropatia periférica tem como uma de suas principais causas a diabetes (BOULTON *et al.*, 2005). Dentre os vários tipos de neuropatia diabética, a manifestação clínica mais comum é a polineuropatia simétrica distal, também denominada neuropatia diabética periférica (NDP), que acomete 75% dos pacientes com neuropatia diabética (PEDROSA, 2014; POP-BUSUI *et al.*, 2017). Estimativas de incidência e prevalência da NDP apresentam grande variação (BOULTON *et al.*, 2005; BOULTON; VALENSI; TESFAYE, 2009; ANG *et al.*, 2014), mas grandes grupos de estudo, como o *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)* sugerem que a NDP atinja cerca de 20% das pessoas com diabetes tipo 1 após 20 anos do início da doença (MASER *et al.*, 1989; TESFAYE *et al.*, 1996; ALBERS *et al.*, 2010; MARTIN *et al.*, 2014; POP-BUSUI *et al.*, 2017). A NDP se faz presente em 10-15% dos pacientes recém-diagnosticados com diabetes tipo 2 (YOUNG *et al.*, 1993; UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP, 1998), com taxas que atingem até 50% destes pacientes após 10 anos da doença (POP-BUSUI *et al.*, 2013; ANG *et al.*, 2014).

Geralmente, a NDP afeta regiões mais distais do corpo, como dedos do pé, mas progride lentamente, envolvendo os pés e as pernas em sentido proximal. Dessa forma, é comum a perda de fibras nervosas, tanto autonômicas quanto somáticas, e assim retinopatia diabética e nefropatia também podem ocorrer (TESFAYE; BOULTON; DICKENSON, 2013). Ulceração do pé e dor neuropática são as principais consequências clínicas da NDP, e estão associadas à morbidade e mortalidade do paciente (BOULTON; KIRSNER; VILEIKYTE, 2004).

A etiologia da NDP é complexa; estudos têm mostrado que a alteração de fluxo sanguíneo, hiperglicemia e alterações metabólicas (estresse oxidativo/nitrosativo, produtos finais de glicosilação avançada e resposta pró e anti-inflamatória) estão envolvidas (DOWNS; FAULKNER, 2015). Em modelo animal de diabetes, evidências de redução no fluxo sanguíneo para os nervos periféricos são encontradas no intervalo de tempo de poucos dias após a administração de agentes químicos, como a estreptozotocina (STZ). Essa redução no fluxo sanguíneo sempre precede a redução da velocidade de condução nervosa (CAMERON *et al.*, 1991; WRIGHT; NUKADA, 1994; FLINT; COTTER; CAMERON, 2000). Estas alterações resultam em hipóxia neuronal, incidindo em comprometimento da função nervosa dando início à neurodegeneração (TUCK; SCHMELZER; LOW, 1984). Tal efeito também foi descrito em gânglios autonômicos, gânglios da raiz dorsal e no hipocampo (CAMERON; COTTER, 2001, MANSCHOT *et al.*, 2003). É importante enfatizar, porém, que à hipóxia acima mencionada (normoglicêmica, resultante da redução do fluxo sanguíneo) deve-se somar os efeitos da hipóxia hiperglicêmica, denotada a seguir.

Uma vez que as células do sistema nervoso central e periférico apresentam alta demanda de glicose em seu metabolismo energético (GREENE; WINEGRAD, 1979), a captação da glicose em nervos periféricos é realizada pelos transportadores de glicose GLUT (*Glucose Transporters*) 1 e GLUT3, não dependentes da ação da insulina. Dessa forma, a concentração de glicose extracelular determina sua concentração intracelular (STEWART *et al.*, 1967; GREENE; WINEGRAD, 1979; KASANICKI; PILCH, 1990; MAGNANI *et al.*, 1996), promovendo assim um meio intracelular hiperglicêmico. Esse aumento da concentração de glicose intracelular promove tanto a saturação da atividade da hexoquinase (figura 1) na via glicolítica neuronal quanto aumento da atividade da aldose-redutase, já que esta última possui um K_m elevado (70 mM). Como resultado, mais glicose é deslocada para a via dos polióis (DVORNIK, 1987), o que ocasiona acidificação do meio intracelular neuronal (NYENGAARD *et al.*, 2004).

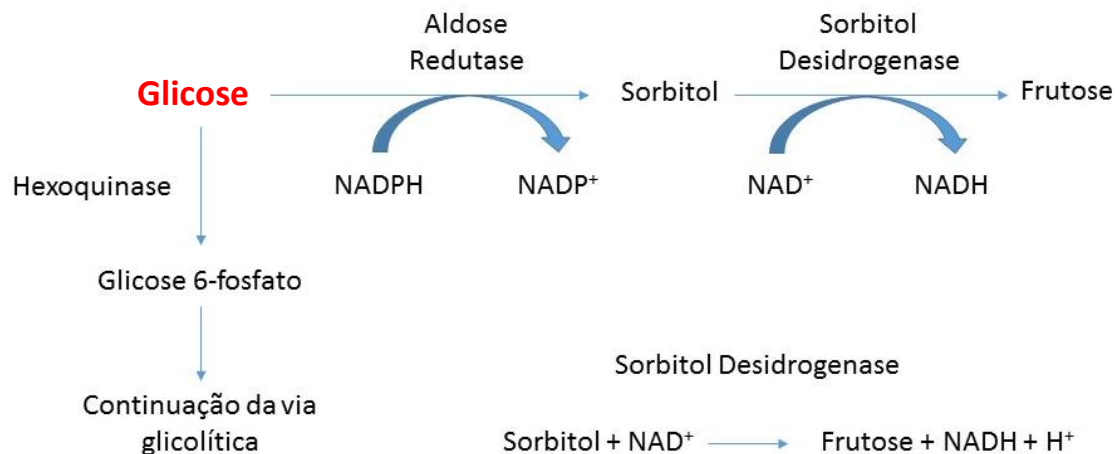


FIGURA 1- Esquema da via de síntese do sorbitol.

Este evento de acidificação intracelular recebe o nome de hipóxia hiperglicêmica, e induz o fechamento de canais para K^+ do tipo retificadores de entrada (K_{ir}) responsáveis pela manutenção do potencial de membrana (GRAFE; BOSTOCK; SCHNEIDER, 1994). A despolarização da membrana promovida pela acidificação intracelular pode, diretamente, bloquear a condução do impulso nervoso e, quando mantida, aumentar a concentração de Ca^{2+} intracelular (WAXMAN; RANSOM; STYS, 1991), que pode acarretar em degeneração estrutural do axônio (SCHLAEPFER; BUNGE, 1991). O fato de este processo ser irreversível sugere que a acidificação intracelular neuronal exerce um papel importante no desenvolvimento da neuropatia diabética (GRAFE; BOSTOCK; SCHNEIDER, 1994).

Além deste mecanismo mencionado acima, a hiperglicemia também contribui com a patogênese da neuropatia diabética por promover redução da velocidade de condução nervosa sensorial (MOORE *et al.*, 1980; WEIS; DIMPFEL; SCHRÖDER, 1995; STEVENS *et al.*, 2004) e motora (FERREIRA *et al.*, 2002; SUGIMOTO *et al.*, 2013), concomitante com hiperalgesia (ZHANG *et al.*, 1997; ROMANOVSKY *et al.*, 2004) e alodinia (LEE; LIN; CHEN, 2014). Mais tardiamente, a hiperglicemia produz axonopatia, desmielinização e degeneração dos nervos dos animais diabéticos (SCHMIDT *et al.*, 2004). Além destas alterações, a hiperglicemia gera alterações metabólicas, às quais se credita um papel central no desenvolvimento da neuropatia diabética. É o caso da via dos polióis, do estresse oxidativo, da formação de produtos finais de glicação avançada e da resposta pró-inflamatória persistente decorrente da ativação do Fator Nuclear κB (NF- κB) e sinalização da Proteína Quinase Ativada por Mitógeno p38 (MAPK p38) (BROWNLEE, 2001; PURVES *et al.*, 2001; HUIZINGA *et*

al., 2007). Somam-se a estes fatores a dislipidemia e o comprometimento da sinalização da insulina. O primeiro fator induz respostas pró-inflamatórias via adipocinas (PHILLIPS; PRINS, 2008), enquanto o segundo conduz o neurônio à disfunção mitocondrial e estresse oxidativo (VELOSO *et al.*, 2011; CALLAGHAN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012).

Usualmente, os pacientes acometidos pela NDP procuram ajuda médica somente quando a dor surge (TESFAYE *et al.*, 2005), um sintoma que pode afetar até 25% dos indivíduos com NDP (DAOUSI *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2006; ZIEGLER *et al.*, 2009; ABBOTT *et al.*, 2011). A Dor Neuropática Diabética (DND) é caracterizada por formigamento, queimação, dormência e sensação de perfuração por agulhas eletrizadas (BANSAL; KALITA; MISRA, 2006; TEFAYE; BOULTON; DICKENSON, 2013). Normalmente é considerada entre moderada e severa e, frequentemente, piora à noite, causando distúrbios de sono. A dor pode ser constante e acompanhada de uma resposta exacerbada a estímulos dolorosos (hiperalgesia). Também pode ser evocada por simples contato, como ao se calçar uma meia, sapatos ou mesmo o uso de cobertores (alodinia). Estes sintomas podem afetar consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes, impactando diretamente na sua capacidade de realização de atividades diárias e podendo influenciar negativamente o seu humor. Além disso, pode levar o indivíduo a se isolar do convívio social, o que pode incidir em depressão (QUATTRINI; TEFAYE, 2003; GORE *et al.*, 2005; TEFAYE; BOULTON; DICKENSON, 2013).

Estudos clínicos e pré-clínicos têm indicado que o desequilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e as anti-inflamatórias pode ser um fator de desenvolvimento da DND (UÇEYLER; SCHÄFERS; SOMMER, 2009). De fato, estes estudos mostraram especificamente o papel do TNF como um agente patogênico adicional no desenvolvimento da DND.

1.2 TNF

A descrição do fenômeno de necrose hemorrágica de tumores em humanos induzido por endotoxinas derivadas de bactérias remonta à 1891. Na ocasião, o cirurgião Dr. William Coley utilizou o que batizou de “toxinas de Coley”, um extrato do sobrenadante de bactérias *Streptococcus pyogenes* e *Serratia marcescens* mortas por

calor, para induzir a regressão de tumores em pacientes com neoplasias inoperáveis (WIEMANN; STARNES, 1994; BICKELS *et al.*, 2002). Apesar da constatação de remissão do tumor em alguns casos, esta prática foi abolida devido aos efeitos colaterais. Porém, apenas em 1962, pelo trabalho de O'Malley *et al.*, foi demonstrado pela primeira vez que o efeito de regressão tumoral promovido pela endotoxina é indireto. Os autores mostraram que o soro de animais tratados com lipopolissacarídeos poderia desencadear a necrose hemorrágica de tumores em animais não expostos ao lipopolissacarídeos, propondo que este efeito seria mediado por um “fator necrosante tumoral”. Já em 1972, Carswell *et al.* mostraram que o soro de camundongos infectados com o bacilo Calmette-Guérin e tratados com endotoxina continha uma substância, a qual chamaram “fator de necrose tumoral” (TNF), que atuava na necrose de tumores de forma similar a endotoxina em si. Eles demonstraram que o soro TNF-positivo era igualmente eficaz a endotoxina como promotora de necrose hemorrágica em fibrossarcoma induzido por metilcolantreno (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010).

No início da década de 1980, uma pesquisa paralela mostrou a função do TNF sob uma perspectiva diferente. Denominada caquetina, a molécula aparentemente não-relacionada com o TNF mediava a atividade enzimática da lipoproteína lipase, característica encontrada em doenças crônicas (KAWAKAMI; CERAMI, 1981; BEUTLER *et al.*, 1985a). Com estudos posteriores demonstrando que estas moléculas eram idênticas, notou-se que o TNF é um mediador biológico central cuja regulação deve ser bem controlada (BEUTLER *et al.*, 1985b; PENNICA *et al.*, 1985).

O TNF é uma citocina produzida por muitos diferentes tipos de células. Entretanto, células da linhagem monocítica – como macrófagos, astróglia, micróglia, células de Langerhans, células Kupffer e macrófagos alveolares – são as principais produtoras de TNF (PFEFFER *et al.*, 1993; FLYNN *et al.*, 1995). Grandes quantidades de TNF podem ser geradas em resposta a presença de proteínas de bactérias ou de parasitas, mas todo estímulo potencialmente nocivo, desde físico e químico a imunológico, pode rapidamente induzir a produção e liberação de TNF (COWARD *et al.*, 2002; RUSSO; POLOSA, 2005). É traduzido como uma proteína de 26 kDa, sendo expresso na membrana celular (mTNF). Posteriormente pode ser clivado no domínio extracelular por uma enzima metaloproteinase e desintegrina 17 (ADAM-17), também conhecida como enzima conversora de TNF (TACE), para liberação da sua forma solúvel (sTNF) de 17 kDa (BLACK *et al.*, 1997; MOSS *et al.*, 1997). Para apresentarem atividade biológica, tanto a mTNF quanto a sTNF requerem a trimerização, e as duas formas são

biologicamente ativas (PALLADINO *et al.*, 2003). Acredita-se que a sinalização por mTNF ocorre por comunicação justácrina, secundária ao contato direto entre células (KRIEGLER *et al.*, 1998).

Na busca de antagonistas fisiológicos para o TNF, três grupos de pesquisa conduziram experimentos que levaram a descoberta de duas proteínas que inibiam a citotoxicidade do TNF *in vitro* (OLSSON *et al.*, 1989; SECKINGER; ISAAZ; DAYER, 1989; ENGELMANN *et al.*, 1989; ENGELMANN; NOVIC; WALLACH; 1990). Essas proteínas, encontradas em pequena quantidade em urina humana, exerciam seu efeito devido a sua ligação de alta afinidade com o TNF e, por isso, receberam os nomes proteínas ligantes ao TNF I e II (TBP I e TBP II, respectivamente) (WALLACH *et al.*, 1991). Apenas após estudos demonstrando a relação imunológica entre o TNF e seus ligantes (ENGELMANN; NOVIC; WALLACH; 1990) e a clonagem molecular de dois cDNAs que codificam os receptores de TNF tipo 1 e 2 (TNFR1, também conhecido como p60, p55, CD120a e TNFR2, ou p80, p75, CD120b, respectivamente) foi possível confirmar que as TBP I e II eram, de fato, as formas solúveis do TNFR1 e TNFR2 (SCHALL *et al.*, 1990; NOPHAR *et al.*, 1990; KOHNO *et al.*, 1990). De fato, ambos podem ser clivados da membrana celular, pelas já mencionadas metaloproteinases, em resposta a inflamação. Essa porção extracelular do receptor clivada retém a habilidade de se ligar ao TNF, agindo assim como inibidor endógeno de TNF (VAN ZEE *et al.*, 1992).

Ambos os receptores são glicoproteínas transmembrana com cisteínas múltiplas repetidas no domínio N-terminal extracelular. Porém, ainda que seus domínios extracelulares partilhem da mesma homologia funcional e estrutural, seus domínios intracelulares são distintos e traduzem seus sinais tanto por vias distintas quanto sobrepostas (figura 2) (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001).

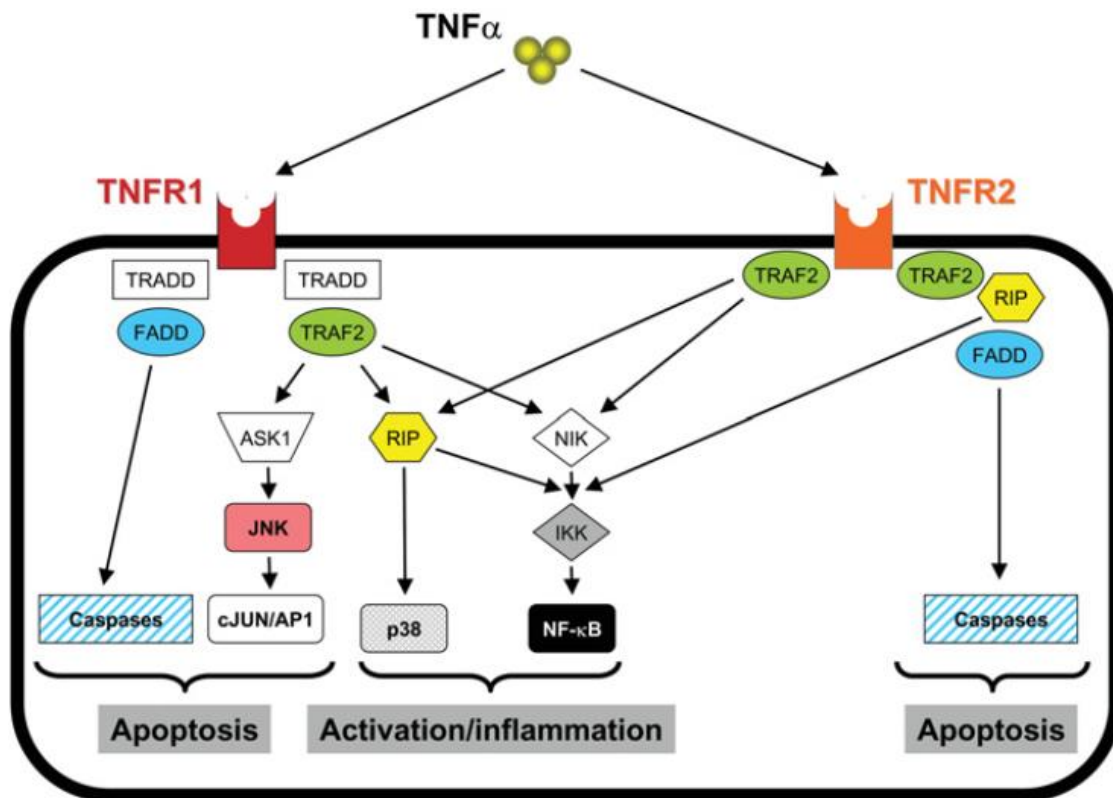


FIGURA 2- Esquema da via de sinalização do TNF. A ligação do TNF ao receptor TNFR1 resulta na configuração de TRADD (domínio da morte associado ao TNFR) e FADD (domínio da morte associado ao Fas). O complexo do TRADD recruta a proteína adaptadora TRAF-2 (fator 2 associado ao TNFR), enquanto o FADD estimula a cascata de caspase. NIK [quinase indutora de NF- κ B (fator nuclear κ B)], RIP (proteína que interage com o receptor) e ASK I (quinase reguladora do sinal de apoptose I) são moléculas sinalizadoras que interagem com TRAF-2 na sequência da cascata de sinalização, sendo capazes de canalizar a sinais que levam a inflamação e morte celular. A ligação de TNF ao receptor TNFR2 recruta a proteína adaptadora TRAF-2, que ativa diretamente a cascata de inflamação, via geração de NF- κ B ou MAPK p38 (proteína quinase ativada por mitógeno p38) e ativa a morte celular mediada por caspase via recrutamento de FADD e RIP. Adaptado de RUSSO; POLOSA, 2005.

A característica primária que distingue o domínio intracelular dos dois receptores é a presença do “domínio da morte” no receptor TNFR1, ausente no TNFR2. Este domínio de aproximadamente 70 aminoácidos permite ao TNFR1 induzir a morte celular programada diretamente. Outra diferença entre os dois receptores reside no modo como são ativados. Enquanto o TNFR1 pode ser ativado tanto pelo mTNF quanto pelo sTNF, acredita-se que o TNFR2 é primariamente ativado pelo mTNF (GRELL *et al.*, 1995). Além disso, enquanto o TNFR1 é expresso constitutivamente em praticamente todo tipo celular, o TNFR2 é restrito a tipos específicos de células, como neurônios, células do sistema imune e células endoteliais (VANDENABEELE *et al.*, 1995; KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016).

A ligação do TNF aos seus receptores resulta em ativação do processo de sinalização intracelular que culmina em enorme diversidade de resposta celular, incluindo

diferenciação, ativação celular, liberação de mediadores pró-inflamatórios e apoptóticos (WAJANT; HENKLER; SCHEURICH, 2001).

1.3 TNF e Dor Neuropática Diabética

Como mencionado anteriormente, dada a importância do TNF como mediador biológico, sua regulação deve ser bem controlada. Entretanto, a literatura tem apontado um cenário em que esta regulação fina tem se desestabilizado. No trabalho de Esposito *et al.* (2002), os autores mostraram que a elevação da glicemia basal de maneira sustentada é capaz de promover um aumento na concentração plasmática de TNF, mesmo em indivíduos não diabéticos saudáveis. Em experimentos realizados com cultura celular se verificou que o meio hiperglicêmico estimula a sinalização inflamatória que ativa o fator nuclear- κ B (NF- κ B) (YERNENI *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2003; RAMANA *et al.*, 2003), o qual pode vir a promover a transcrição de TNF e inserção deste no ciclo de sinalização endócrino/parácrina ligada a liberação de TNF, ao que se segue nova ativação de NF- κ B (REDDY *et al.*, 2009). Há ainda o trabalho recente de Li *et al.*, (2015), também utilizando cultura celular, mostrando que o meio hiperglicêmico induz o aumento da expressão da metaloproteinase ADAM-17, achado que ajuda a correlacionar o estabelecimento da hiperglicemia em indivíduos diabéticos e a conseguinte elevação de TNF plasmático. Somam-se a estes trabalhos os achados clínicos que associam à elevação de citocinas pró- e anti-inflamatórias um papel crítico na indução e persistência da DND (GONZÁLEZ-CLEMENTE *et al.*, 2005; CALVO, DAWES, BENNETT, 2012; UÇEYLER, SOMMER, 2008), as quais se encontram aumentadas no soro do sangue de pacientes diabéticos que apresentam neuropatia com dor (UÇEYLER *et al.*, 2007). É o caso do trabalho de Ortmann e Chattopadhyay (2014), no qual os autores puderam destacar a importância do papel do TNF como um agente patogênico adicional no desenvolvimento da neuropatia diabética. Neste trabalho os autores mostram aumento da imunorreatividade para TNF em cortes histológicos do gânglio da raiz dorsal (DRG), do corno dorsal da medula espinal, do nervo ciático e da pele da pata de ratos que desenvolveram neuropatia diabética dolorosa. Diversos trabalhos na literatura têm correlacionado esta elevação na concentração plasmática de TNF com a alteração da expressão e/ou função de canais de sódio voltagem dependentes, elementos críticos no estabelecimento da excitabilidade

neuronal. Isto reflete, ao menos em parte, na redução do limiar para ativação dos nervos periféricos, promovendo assim o estabelecimento da dor neuropática crônica (TANAKA *et al.*, 2004; JOSHI *et al.*, 2006; DONG *et al.*, 2007; JEON; LEE; CHO, 2009; CHENG *et al.*, 2012).

1.4 Canais de sódio dependente de voltagem

Não por coincidência, a motilidade outrora emergente em organismos multicelulares ocorreu concomitantemente ao desenvolvimento do sistema nervoso, uma rede elétrica especializada requerida para coordenar a resposta de células distintas separadas por longas distâncias (LIEBESKIND, 2011; LIEBESKIND *et al.*, 2016; MARLOW; ARENDT, 2014). Esta comunicação se estabelece pela geração e propagação sustentada de um sinal elétrico em forma de onda bem definida e padronizada, o potencial de ação (figura 3). A geração do potencial de ação requer a ação coordenada de proteínas específicas, residentes na membrana de células excitáveis, capazes de converter estímulos químicos e elétricos em influxos e efluxos iônicos (HILLE, 2001a).

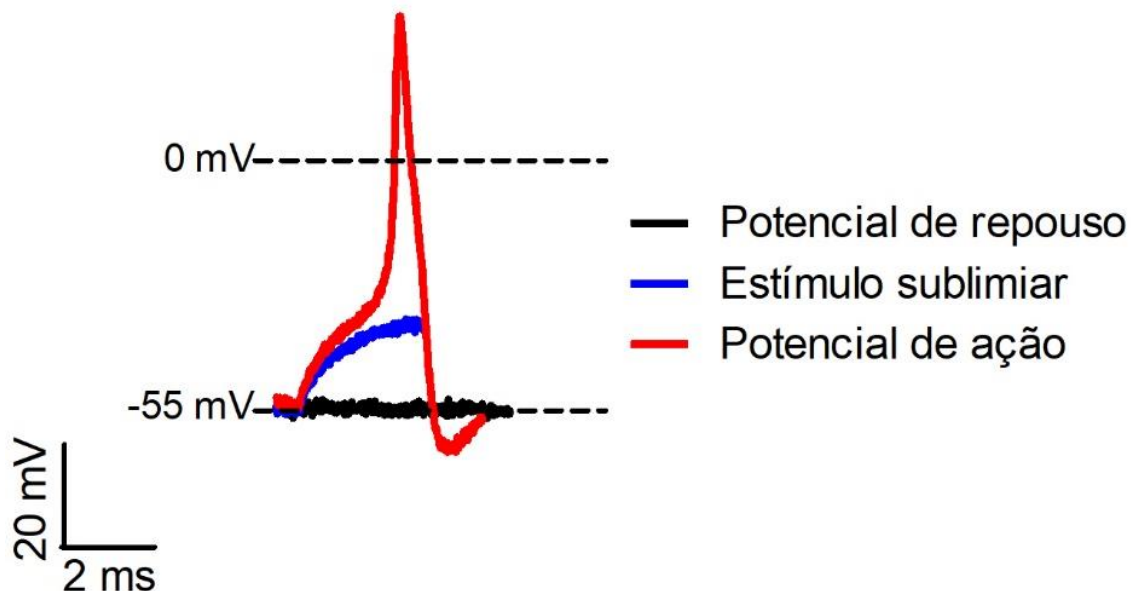


FIGURA 3– Traçado representativo de um potencial de ação de um neurônio do DRG. Pode-se notar o potencial de repouso em torno de -55 mV (traçado preto), a resposta passiva de membrana ante um estímulo sublimiar (traçado azul) e o potencial de ação deflagrado em resposta a um estímulo capaz de atingir o limiar. Traçado real obtido no Laboratório de Membranas Excitáveis - UFMG. MACEDO, 2015.

Em 1952, Alan Hodgkin e Andrew Huxley utilizaram dados experimentais de uma sequência de publicações sobre condutâncias dependentes de voltagem em axônio gigante de lula (HODGKIN; HUXLEY; KATZ, 1952; HODGKIN; HUXLEY, 1952a-c) para propor um modelo matemático e físico que, acuradamente, previu a forma do potencial de ação (HODGKIN; HUXLEY, 1952d). Com base neste modelo, Hodgkin e Huxley puderam descrever as propriedades funcionais e estruturais das proteínas de membrana, os canais iônicos, que delineiam a formação do potencial de ação, incluindo seus mecanismos de permeabilidade iônica, seletividade e *gating*. A nível celular, o modelo ainda previu as condições que controlam o intervalo de tempo entre o estímulo e a deflagração do potencial de ação, incluindo o limiar e o período refratário (CATTERALL *et al.*, 2012).

Conforme descoberto por Hodgkin e Huxley, os canais de sódio dependentes de voltagem (Na_v) iniciam o potencial de ação em nervos, músculos e outras células excitáveis. Sua ativação despolariza a membrana, determinando a fase ascendente do potencial de ação. Seu papel como iniciadores dos sinais elétricos os tornam, assim, componentes cruciais do sistema nervoso (HODGKIN; HUXLEY, 1952d, GUY; SEETHARAMULU, 1986; CATTERALL *et al.*, 2000; CATTERALL *et al.*, 2012).

Apesar de terem sido os primeiros da superfamília de canais iônicos a serem descobertos [família que inclui canais de potássio dependentes de voltagem, canais de cálcio dependentes de voltagem, canais do tipo TRP (receptores de potencial transiente) e canais HCN (ativados por hiperpolarização e nucleotídeos cíclicos)], a família dos Na_v é a mais recente na escala evolutiva, tendo evoluído dos canais de cálcio, similarmente estruturados por conterem quatro domínios homólogos (ANDERSON; GREENBERG, 2001; HILLE, 2001). Os Na_v são constituídos por um complexo contendo uma subunidade α de 260 kDa associado a uma ou mais subunidades β auxiliares (β_1 , β_2 e/ou β_3) de 33-36 kDa. A subunidade α resulta de uma única sequência de aproximadamente 2000 resíduos de aminoácidos que se inserem 24 vezes na membrana celular. Estas inserções, ou seguimentos transmembrana, se dividem em quatro regiões homólogas, denominados domínios I-IV, com cada domínio contendo seis segmentos transmembrana (S1-S6) (figura 4) (AHMED *et al.*, 1992).

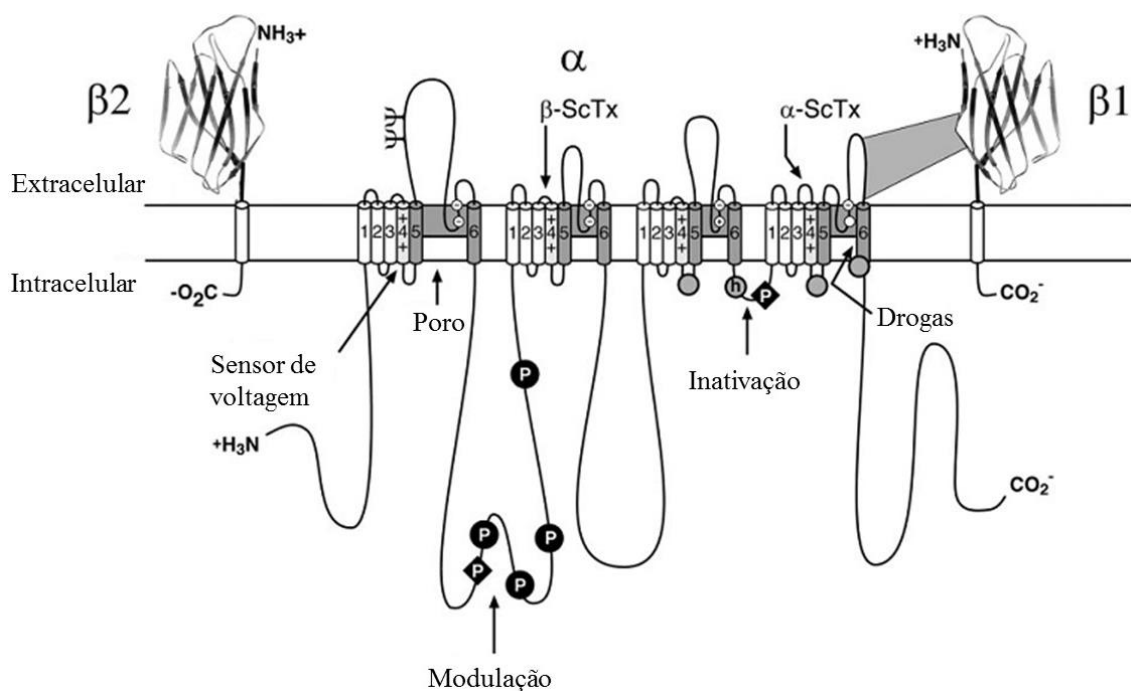


FIGURA 4– Organização do canal de sódio. Cilindros representam os elementos α helicoidais; linhas curvilíneas representam a cadeia polipeptídica de cada subunidade, com comprimento aproximadamente proporcional ao número de resíduos de aminoácidos presentes no subtipo de canal de sódio presente no cérebro de rato; Ψ representa sítio de N-glicosilação; sítios comprovados de fosforilação pela proteína quinase A (círculos) e C (losangos); h no círculo cinza representa a alça de inativação; círculos de cor cinza representam a região receptora da alça de inativação; α e β -ScTx representam sítios de ligação para toxinas de escorpião. Adaptado de CATTERALL, GOLDIN, WAXMAN, 2005.

Em cada domínio dos Na_v se encontram o módulo sensor de voltagem, formados pelos segmentos S1-S4, e o módulo formador do poro do canal, composto pelos seguimentos S5 e S6, bem como pelas alças P1 e P2 (figura 5A) (PAYANDEH *et al.*, 2011). O estudo de canais de sódio de bactérias pelo uso da técnica de cristalografia mostrou que os quatro módulos sensores de voltagem (S1-S4) estão organizados no entorno de um poro aquoso central constituído pelos módulos formadores do poro do canal de sódio, os seguimentos S5-S6 (figura 5B) (MCCUSKER *et al.*, 2012; PAYANDEH *et al.*, 2012).

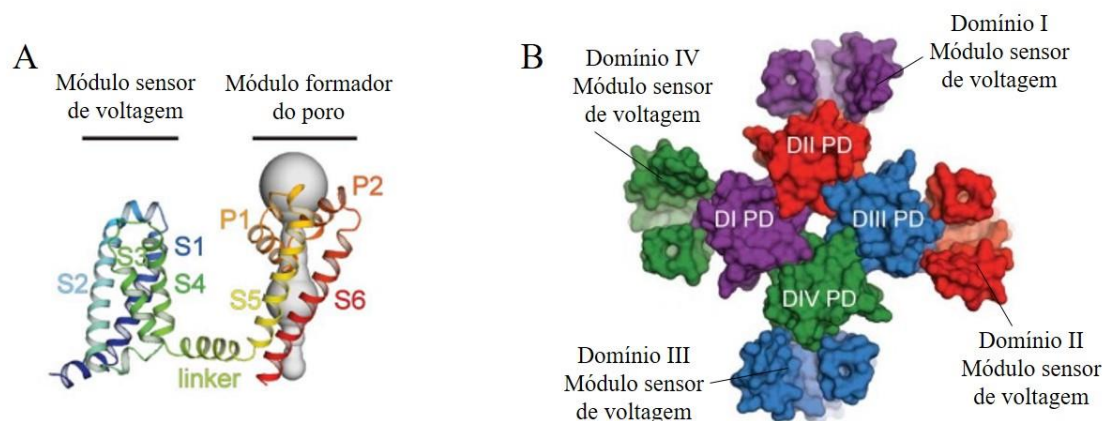


FIGURA 5– A. Visualização lateral da estrutura terciária um domínio do canal de sódio de bactéria (Na_vAb) mostrando os segmentos S1 ao S6, além da alça que liga os segmentos S4 e S5 (linker) e das alças que ligam os segmentos S5 e S6 (P1 e P2). Em cinza, o volume do poro aquoso formado pelos segmentos S5 e S6 e alças P1 e P2. B. Visualização superior da estrutura do canal Na_vAb colorido de acordo com a organização pseudotetramérica esperado para o canal de sódio eucariótico. Nota-se aqui o arranjo estrutural de forma que os módulos sensores de voltagem cercam os módulos formadores do poro do canal. DI-IV – Domínios I-IV; PD – Módulo formador do poro. Adaptado de AHERN et al., 2016.

Os canais de sódio são altamente seletivos à entrada do sódio no meio intracelular, com a razão entre a permeabilidade do canal ao potássio e ao sódio sendo menor que 0,1 (FAVRE; MOCZYDLOWSKI; SCHILD, 1996; LIPKIND; FOZZARD, 2008). O filtro de seletividade do canal é formado nos segmentos P1 e P2 pelos resíduos aspartato no domínio I, ácido glutâmico no domínio II, lisina no domínio III e alanina no domínio IV. Estes quatro aminoácidos são denominados resíduos DEKA (HEINEMANN *et al.*, 1992; LIPKIND; FOZZARD, 2008). A primeira interação dos cátions no filtro de seletividade ocorre com os dois grupos de oxigênio do glutamato (domínio II), este formando ponte de hidrogênio com a cadeia lateral da lisina (domínio III) que bloqueia o filtro. Apenas metais fortemente alcalinos (Li⁺, Na⁺) podem competir com o grupamento amino da lisina pelo grupamento carboxilato, deslocando a lisina lateralmente em direção a alanina (domínio IV). Íons maiores (K⁺, Rb⁺) não conseguem competir com a lisina pela carboxila, sofrendo assim repulsão pela lisina à permeação do poro (LIPKIND; FOZZARD, 2008).

De modo similar aos demais canais dependentes de voltagem, a ativação do canal de sódio decorre do movimento das chamadas cargas de *gating* (termo que designa a transição entre os estados condutor e não condutor do canal), presentes nos segmentos S4, em resposta a alterações no potencial elétrico transmembrana (CATTERALL, 2000). As cargas de *gating* são constituídas por argininas (figura 6A, esferas azuis; B, segmentos azuis), dispostas em 4 sítios repetidos (nomeados R1-R4, figura 6B),

seguidos por dois resíduos aminoácidos hidrofóbicos, combinação que resulta em uma espiral transmembrana de cargas positivas. Enquanto o canal está em estado de repouso, o efeito do campo elétrico transmembrana sobre a carga residual destas argininas é neutralizado por resíduos aminoácidos negativos presentes nos segmentos S1 a S3 (figura 6A, esferas vermelhas; 6B, seguimentos vermelhos, com destaque para interação eletrostática estabilizando a arginina R2) separados em dois grupos, um na região intracelular e outro na região extracelular (figura 6B). Este equilíbrio é interrompido ante a despolarização da membrana, que modifica o campo elétrico transmembrana que atua sobre as cargas de *gating*. Uma vez que esta despolarização seja suficiente para sobrepujar as interações eletrostáticas entre as cargas negativas dos seguimentos S1 a S3 com as cargas positivas do seguimento S4, uma força elétrica resultante com sentido para o meio extracelular é exercida sobre as cargas de *gating*, forçando o segmento S4 a se mover no sentido do meio extracelular e rotacionar. Esta combinação de movimentos no módulo sensor de voltagem culmina em uma tensão transferida ao módulo formador do poro através do seguimento *linker* (figura 6A, seguimento destacado em róseo entre o S4 e o S5), propiciando assim a abertura, ou ativação, do canal (CATTERALL, 1986; GUY; SEETHARAMULU, 1986; YAROV-YAROVOY; BAKER; CATTERALL, 2006). Notar que o canal ainda conta com um grupamento de cargas neutras nos seguimentos S1, S2 e S3 (figura 6A, esferas cinzas; 6B, seguimentos verdes) para prevenção de fluxo aquoso através do módulo sensor de voltagem.

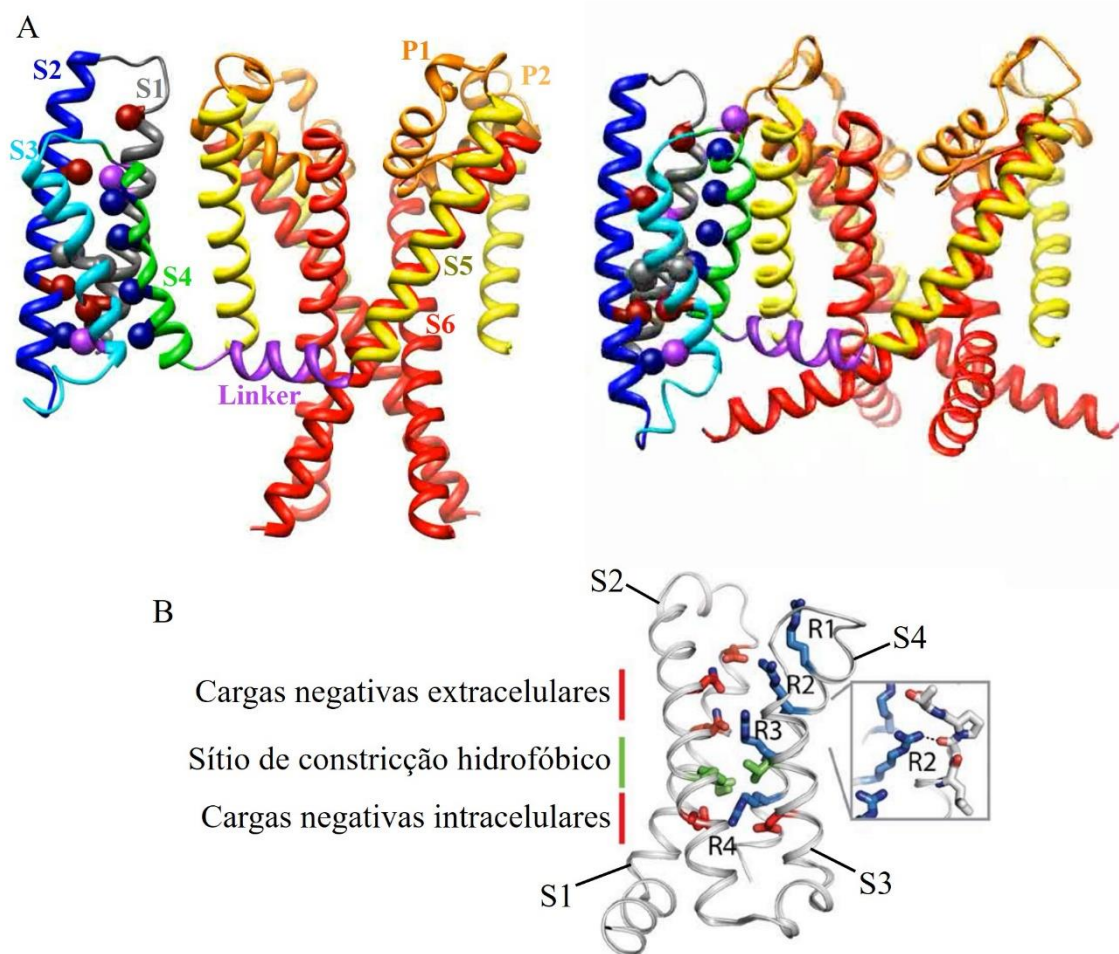


FIGURA 6– A. Visualização da mudança conformacional do estado de repouso (esquerda) ao estado ativado (direita) do canal Na_vAb. Apenas um módulo sensor de voltagem (S1-S4) ligado ao módulo formador do poro (S5-S6) está representado. A região do poro do canal contém os módulos dos quatro domínios, para efeito de representação da formação do poro. As esferas representam resíduos aminoácidos chave para a ativação do canal de sódio. Vermelho no S1: glutamato; vermelho superior no S2: aspartato; vermelho inferior no S2: glutamato; vermelho no S3: aspartato; róseo no S3: asparagina; róseo no S4: treonina; azuis no S4: arginina. Adaptado de YAROV-YAROVY et al, 2012. B. Módulo sensor de voltagem do canal Na_vAb, com destaque para os grupamentos de cargas negativas extracelulares, intracelulares e o sítio de constricção hidrofóbico. A figura destaca ainda a ponte de hidrogênio formada entre o resíduo de arginina R2 no S4 e o aspartato no S3. Adaptado de AHERN, C. A. et al, 2016.

Como descrito por Hodgkin e Huxley (1952c), os canais de sódio abrem em resposta a despolarização e, após um intervalo de tempo de 1-2 ms, se tornam impermeáveis. Este processo, crucial para disparos sequenciados de potencial de ação nos circuitos neurais e para o controle da excitabilidade em nervos e células musculares, recebe o nome de inativação rápida (figura 7), em que o canal cessa a condutância ao sódio ainda estando na sua conformação ativa. A região do canal de sódio responsável por este mecanismo é a curta alça intracelular que conecta os domínios homólogos III e IV na subunidade α (figura 4) (VASSILEV; SCHEUER; CATTERALL, 1988). O segmento central da chamada comporta de inativação rápida é formado pelos resíduos

aminoácidos hidrofóbicos isoleucina, fenilalanina e metionina, com uma treonina adjacente (IFMT), também importante neste processo (WEST *et al*, 1992, HAYWARD; BROWN; CANNON, 1996). Um par de resíduos aminoácidos glicina permite o dobramento da alça entre os domínios III e IV em direção à região intracelular do poro do canal, possibilitando ao seguimento IFM formar múltiplas interações com resíduos aminoácidos no entorno da região intracelular do poro do canal. Acredita-se que esta região seja constituída pela alça intracelular entre os seguimentos S5 e S6 no domínio III e IV e no terminal do segmento S6 (MCPHEE *et al*, 1995; SMITH, M. R.; GOLDIN, 1997; MCPHEE *et al*, 1998). Após a repolarização da célula, o desacoplamento do seguimento IFMT remove a inativação rápida do canal de sódio (ARMSTRONG; BEZANILLA, 1977).

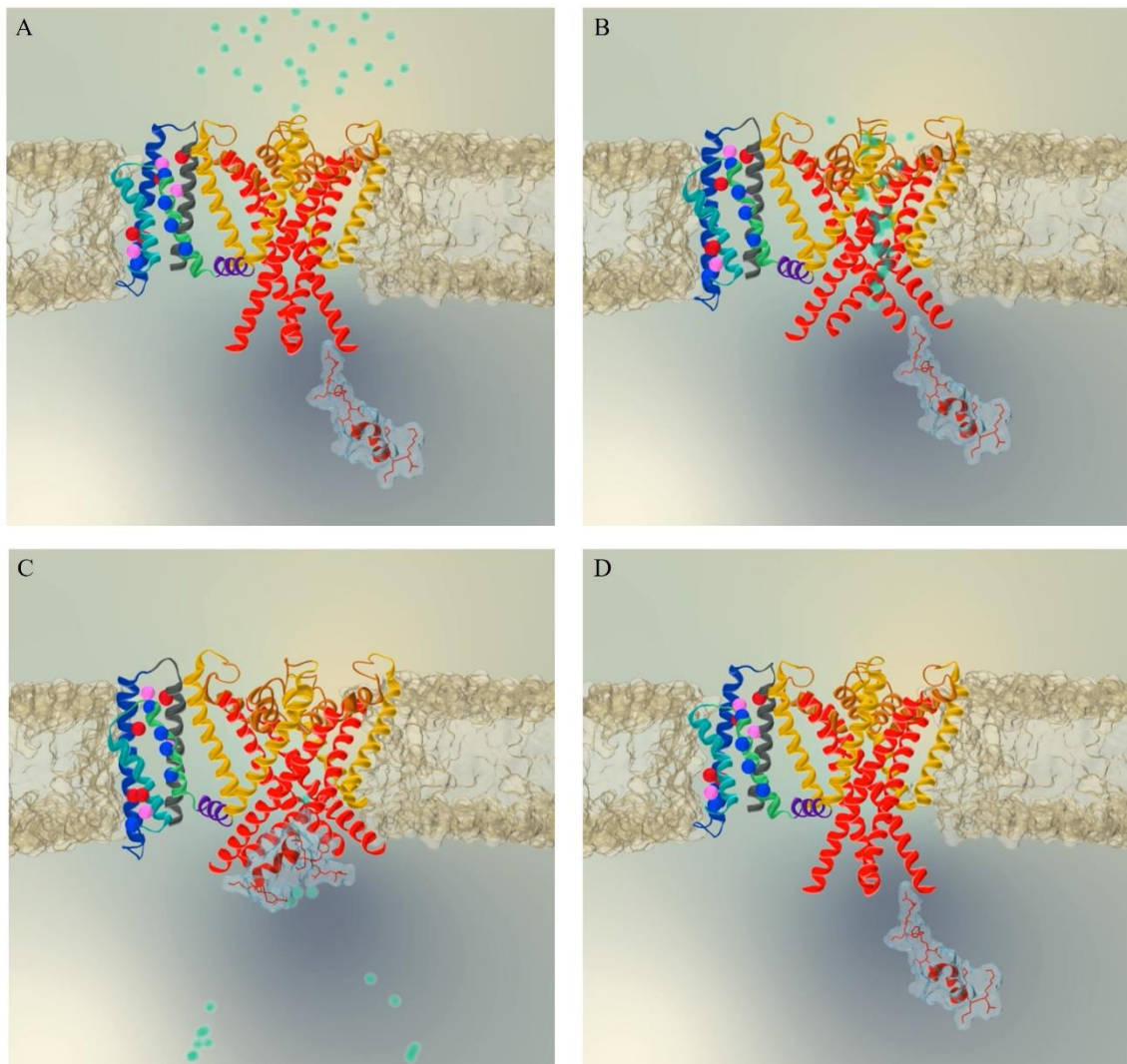


FIGURA 7– Visualização lateral do modelo em estrutura secundária do canal de sódio de mamífero com a estrutura da comporta de inativação. A. Canal de sódio no estado de repouso, com íon sódio permeando o canal. B. Canal de sódio ativado. C. Acoplamento da comporta de inativação na região intracelular do poro do canal de sódio cerca de 1 a 2 ms após a ativação do canal de sódio, o mecanismo de ativação rápida. O canal de sódio ainda se encontra na sua configuração ativada. D. Canal de sódio no estado de repouso após a repolarização da membrana. Adaptado de CATTERALL, 2014.

A inativação rápida não é o único processo que cessa a condutância nos canais de sódio. Eles também podem ser inativados pelo processo chamado inativação lenta (RICHMOND *et al*, 1998). Enquanto a inativação rápida ocorre no espaço de tempo de milissegundos, a escala de tempo para inativação lenta é de segundos. Fisiologicamente, a inativação lenta ocorre durante despolarizações prolongadas e repetidas, limitando assim a viabilidade do canal de sódio por um longo período de tempo (RICHMOND *et al*, 1998). Ainda que não completamente elucidado, estudo com cristalografia sugerem que a inativação lenta resulta de rearranjos continuados do canal durante despolarizações prolongadas (PAYANDEH *et al*, 2012).

Nove subunidades α (Na_v1.1 a Na_v1.9) têm sido caracterizadas funcionalmente, enquanto uma décima isoforma (Na_x) possivelmente funcione como um canal de sódio (YU; CATTERALL, 2003). De acordo com a convenção da União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR), a nomenclatura dos canais de sódio (por exemplo, Na_v1.1) consiste do símbolo químico do principal íon permeante (Na⁺) e do regulador fisiológico principal (voltagem, subscrito), seguido por um número indicando a subfamília genética e um número decimal que especifica a isoforma do canal (GOLDIN *et al.*, 2000).

Mais de 20 exons compreendem cada um dos nove genes da subunidade α dos canais de sódio. Os genes que codificam as isoformas Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3 e Na_v1.7 estão localizados no cromossomo 2 em humanos e camundongos. Estas isoformas partilham similaridades na sequência de aminoácidos, nas características biofísicas, no fato de serem bloqueadas por concentrações nano molares da neurotoxina tetrodotoxina (TTX) e por serem amplamente expressas em neurônios. Um segundo grupo de genes que codifica os canais Na_v1.5, Na_v1.8 e Na_v1.9 está localizado no cromossomo humano 3p21-24 e em região ortóloga no cromossomo 3 em camundongo (GOLDIN *et al.*, 2000). Apesar de suas sequências de aminoácidos serem 75% idênticas ao do grupo de canais no cromossomo 2, há diferenças específicas nestas sequências que conferem variabilidades ao grau de sensibilidade à TTX. No Na_v1.5, a isoforma cardíaca principal, uma única mudança do aminoácido fenilalanina para cisteína na região do poro do domínio I torna este canal 200 vezes menos sensível à TTX, quando comparado os canais codificados no cromossomo 2 (SATIN *et al.*, 1992). Na posição correspondente nos canais Na_v1.8 e Na_v1.9, o resíduo aminoácido é a serina, resultando em resistência ainda maior à TTX (SIVILOTTI *et al.*, 1997). Estes canais, Na_v1.8 e Na_v1.9, são expressos principalmente em neurônios sensoriais periféricos (AKOPIAN *et al.*, 1999; DIB-HAJJ *et al.*, 2001). As outras duas isoformas, Na_v1.4 (expresso em músculo esquelético) e Na_v1.6 (abundante no sistema nervoso central) partilham de mais de 85% de similaridade com os canais codificados pelo cromossomo 2, tanto na sequência de aminoácidos quanto nas propriedades funcionais, incluindo a sensibilidade ao bloqueio por TTX na concentração de nano molar.

1.5 TNF, canais de sódio dependente de voltagem e DND

Neurônios periféricos exercem um papel essencial na detecção de estímulos externos e transmissão desta informação com discernimento quanto à modalidade, localização e intensidade do estímulo para o sistema nervoso central. Os corpos celulares destas fibras nervosas aferentes estão localizados fora do sistema nervoso central, no gânglio da raiz dorsal (DRG) (figura 8) (CHAHINE; O'LEARY, 2014).

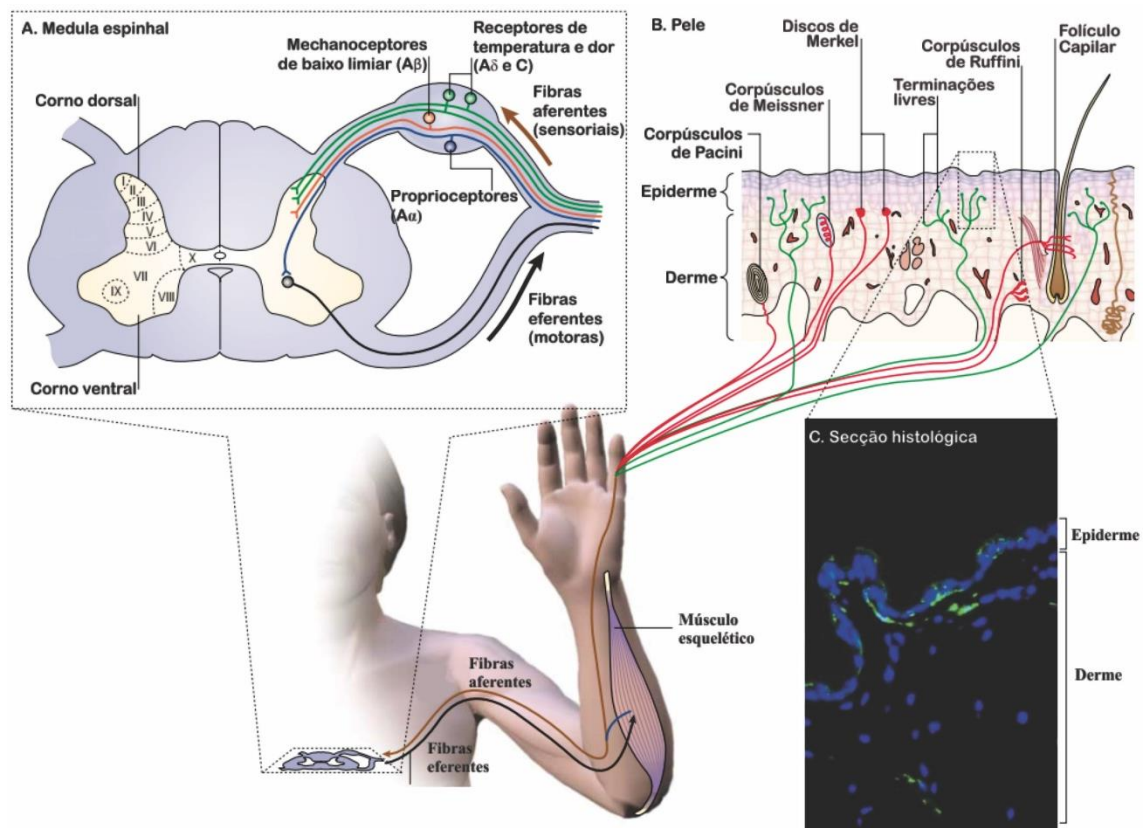


FIGURA 8– A. Os nervos espinhais formados pela união de fibras nervosas aferentes (sensoriais) e eferentes (motoras) proporcionam inervação periférica à pele, músculo esquelético, vísceras e glândulas. As setas indicam o sentido da entrada dos impulsos sensoriais e saída dos impulsos motores. Os corpos celulares dos neurônios motores (preto) estão localizados dentro do corno ventral (lâmina VII-IX) da medula espinhal. Os corpos celulares dos neurônios sensoriais estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG). Dentro do DRG encontram-se neurônios proprioceptivos (azul), mecanoreceptores de baixo limiar (vermelhos) e neurônios sensíveis à temperatura e à dor (verde). Estes neurônios se projetam centralmente para interneurônios nos cornos dorsais (lâmina I-VI da medula espinhal) e periféricamente aos tecidos alvo. Neurônios proprioceptivos projetam-se para estruturas especializadas dentro dos tecidos alvo, como músculo e alongamento muscular sensorial. B. Neurônios mecanoreceptores de baixo limiar (fibras vermelhas) projetam-se para estruturas acessórias (corpúsculos de Meissner, Pacini, Ruffini e os discos de Merkel) associadas a transdução sensorial dos estímulos mecânicos. C. Seção de pele mostrando terminações nervosas livres (fibras verdes) coradas com o marcador pan-neuronal PGP9.5. Os núcleos das células da pele estão corados em azul com 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI). As terminações nervosas livres são encontradas nas camadas epidérmicas e dérmicas. Adaptado de PATAPOUTIAN *et al.*, 2003.

A ramificação destes neurônios sensoriais pseudounipolares inerva a periferia e tecidos viscerais e possuem os chamados canais transdutores sensoriais. Tratam-se de canais especializados em converter estímulos térmicos, mecânicos, químicos e inflamatórios em potenciais receptores eletrotônicos via atuação direta ou indireta sobre canais iônicos, modificando a permeabilidade destes canais a íons e gerando despolarizações de membrana graduais, ou seja, sinais elétricos. Potenciais receptores são despolarizações transientes e graduais que, quando suficientes para atingirem o limiar do neurônio, desencadeiam o disparo de potenciais de ação. Assim, receptores presentes nos

terminais que inervam a periferia, como proteínas G específicas acopladas a receptores ou canais iônicos ativados por ácido ou ligantes, geram potenciais receptores que podem culminar em potenciais de ação. Estes potenciais, suscitados nos ramos periféricos, são transmitidos através do DRG para o processamento central, repassados via sinapse com neurônios sensoriais de segunda ordem localizados no corno dorsal da medula espinal (figura 9) (HILLE, 2001b; CHAHINE; O'LEARY, 2014).

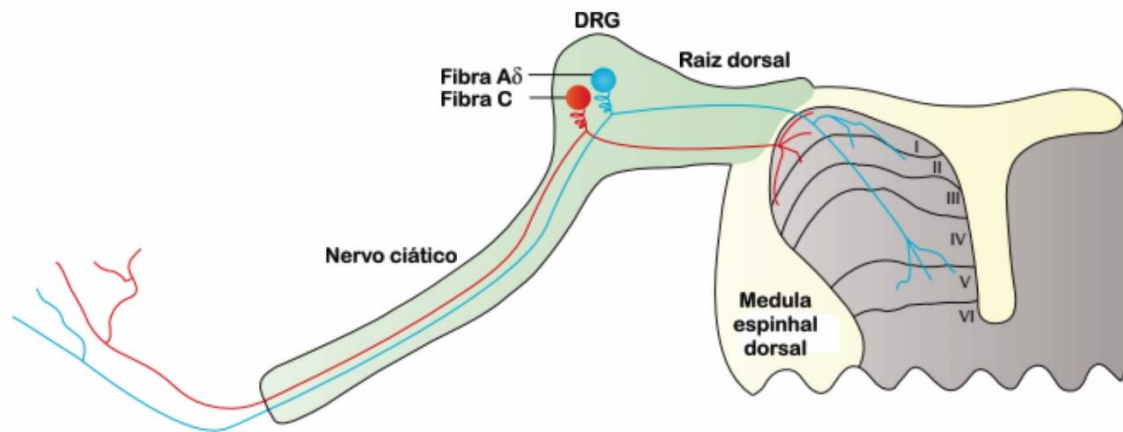


FIGURA 9– Estímulos nocivos mecânicos, térmicos, químicos e inflamatórios periféricos originam sinais que são transduzidos por proteínas G específicas acopladas a receptores ou por canais iônicos ativados por ácido ou ligantes. As despolarizações de membrana evocadas por potenciais receptores são integradas por canais de sódio ativados por voltagem. Atingido o limiar, um potencial de ação é gerado nestes terminais e propagado para o sistema nervoso central. Adaptado de DIB-HAJJ et al, 2013.

Fibras nervosas aferentes têm sido classificadas com base na morfologia, modalidade sensorial, limiar e velocidade de condução (YOSHIDA; MATSUDA, 1979; HARPER; LAWSON, 1985a; LEE *et al.*, 1986; GOLDSTEIN; HOUSE; GAINER, 1991; LAWSON *et al.*, 1993; LAWSON *et al.*, 2002; FORNARO *et al.*, 2008). Fibras mielinizadas de grande e médio diâmetro, A α aferentes e A β , possuem axônios com diâmetro de 12-20 μ m e 6-12 μ m e velocidade de condução de 252-432 km/h e 130-252 km/h, respectivamente. Seus ramos periféricos cutâneos são encapsulados por estruturas acessórias responsáveis pela transdução sensorial, como os corpúsculos de Meissner, os corpúsculos de Pacini, os corpúsculos de Ruffini e os discos de Merkel. Estes mecanorreceptores de baixo limiar são ajustados de forma a responderem a estímulos táteis não nocivos e a vibrações (GARDNER; JOHNSON, 2013; CHAHINE; O'LEARY, 2014). Já os axônios das fibras A δ , levemente mielinizadas, e as fibras C, não mielinizadas, por sua vez, têm diâmetro de 1-6 μ m e 0,2-1,5 μ m e velocidade de condução de 14-130 km/h e 1,5-7 km/h, respectivamente. Seus ramos periféricos culminam em terminações livres em músculos, pele e vísceras (KRUGER; LIGHT; SCHWEIZER,

2003). Majoritariamente, respondem a estímulos nocivos ($\approx 90\%$), e proveem informações sobre condições potencialmente danosas aos tecidos (BURGESS; PERL, 1967). E são essas fibras nervosas as primeiras afetadas pela diabetes (ZOCHODNE; RAMJI; TOTH, 2008).

Estudos realizados em ratos com diabetes induzida por STZ mostram que o desenvolvimento da DND apresentada por estes animais tem associação com a expressão aumentada de canais de sódio dependentes de voltagem (CRANER *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2004). Além disso, registros de eletrofisiologia celular pela técnica de *patch clamp* no modo *Whole Cell* indicam aumento da densidade de corrente de sódio do tipo sensível à TTX consistente com o aumento da expressão das isoformas Na_v 1.3, 1.6 e 1.7 (CUMMINS, HOWE, WAXMAN, 1998; CUMMINS *et al.*, 2001; HERZOG *et al.*, 2003). Dentre estas, a isoforma Na_v 1.7 tem sido diretamente correlacionada com neuropatia diabética e citocinas pró-inflamatórias (HONG *et al.*, 2004; GALLOWAY; CHATTOPADHYAY, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; TAMURA *et al.*, 2014).

Evidências têm sido acumuladas indicando que mudanças nas propriedades eletrofisiológicas do canal Na_v 1.7 causam sensação anormal a dor. Em 2004 foi descoberto, em humanos, mutações nestes canais que resultam em ganho ou perda de função. Uma das mutações para ganho de função do Na_v 1.7 foi responsável por uma forma herdada de eritromelalgia, uma síndrome de dor de queimadura intermitente que afeta extremidades do corpo (WAXMAN; DIB-HAJJ, 2005). Por outro lado, a “canalopatia associada à insensibilidade a dor” resulta da perda de função do Na_v 1.7, em que os pacientes jamais sentiram dor, apesar da sensação inalterada a outras sensações (como frio ou calor, por exemplo) (COX *et al.*, 2006). Neste sentido, o canal Na_v 1.7 tem destacado interesse da ciência, uma vez que são os primeiros canais a embasar que mutações em canais iônicos estão envolvidas em síndromes de dores excruciantes ou à insensibilidade a dor. Isto reforça que o canal Na_v 1.7 pode desempenhar papel crucial na nocicepção (TAMURA *et al.*, 2014).

Estes canais, ainda que expressos em fibras neuronais de grande calibre, $\text{A}\alpha$ e $\text{A}\beta$, são majoritariamente expressos em neurônios de pequeno calibre, $\text{A}\delta$ e C (DIB-HAJJ *et al.*, 2010). De fato, estão expressos em 85% dos nociceptores identificados funcionalmente (DJOUHRI *et al.*, 2010). E sua expressão é aumentada em neurônios do DRG de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ), uma mudança que contribui para a hipersensibilidade associada à dor (HONG *et al.*, 2004; CHATTOPADHYAY; MATA; FINK, 2008, 2011; TAMURA *et al.*, 2014).

O estudo de HUANG e colaboradores (2014) mostrou o curso temporal da expressão dos canais de sódio Nav 1.7 em neurônios do DRG de ratos diabéticos induzidos por STZ. Os autores constataram que a expressão dos canais de sódio Nav 1.7 nestes animais se encontrava elevada a partir da 4ª semana após a indução ao diabetes, atingia seu máximo na 6ª semana e mantinha-se constante até a 12ª semana. Este fato está fortemente associado com alodinia mecânica e hiperalgesia térmica, medida através de testes de comportamento. Os autores também encontraram, usando a técnica de Western Blot, que a expressão de TNF estava aumentada no DRG de ratos diabéticos. Esta relação entre TNF e o canal Nav 1.7 se torna mais evidente pelo fato das propriedades biofísicas deste canal, descritas a seguir, o tornarem determinante no estabelecimento do limiar do potencial de ação (RUSH; CUMMINS; WAXMAN, 2007; DIB-HAJJ *et al.*, 2007).

O canal Nav 1.7, bem como a corrente de sódio sensível à TTX (TTXs), gera uma corrente de entrada rápida e contribui de modo predominante com a corrente de sódio TTXs nos nociceptores (BLACK *et al.*, 1996; SANGAMESWARAN *et al.*, 1997; TOLEDO-ARAL *et al.*, 1997; HO *et al.*, 2012). É a isoforma de canal de sódio TTXs mais expressa no corpo celular dos neurônios pequenos associados à termocепção e dor (HO; O'LEARY, 2011), ou seja, neurônios levemente mielinizados Aδ e neurônios não mielinizados do tipo C (HARPER; LAWSON, 1985a). Possui limiar de ativação (≈ -40 mV) próximo ao da corrente TTXs (≈ -50 mV) nestes neurônios, além de apresentar cinética de ativação e inativação rápida em comparação com as isoformas que conduzem a corrente de sódio resistente à TTX (TTXr) (Nav 1.8 e Nav 1.9) co-expressas (CAFFREY *et al.*, 1992; ROY; NARAHASHI, 1992; ELLIOTT; ELLIOTT, 1993; KLUGBAUER *et al.*, 1995; CUMMINS; WAXMAN, 1997; CUMMINS; HOWE; WAXMAN, 1998; VIJAYARAGAVAN; O'LEARY; CHAHINE, 2001; HO; O'LEARY, 2011).

O potencial de repouso de um neurônio típico do DRG, ≈ -65 mV, é próximo do $V_{1/2}$ para inativação estacionária do canal Nav 1.7 ($V_{1/2} = -67$ mV), ou seja, o potencial de membrana para o qual metade da população de canais Nav 1.7 que contribui para a corrente de sódio se encontra inativada (CHEVRIER; VIJAYARAGAVAN; CHAHINE, 2004; VIJAYARAGAVAN; BOUTJDIR; CHAHINE, 2004). Por isso, no potencial de repouso do neurônio, cerca de 50% dos canais Nav 1.7 estarão inativados e, portanto, indisponíveis para abrir em resposta a despolarização de membrana (OGATA; TATEBAYASHI, 1993). Porém, dado que a faixa de potencial de membrana para o qual este canal se encontra inativado é mais negativo (-68,4 a -61,9 mV), mesmo pequenas despolarizações de membrana podem induzir a transição dos canais Nav 1.7 do estado

inativado para o fechado, aumentando substancialmente o número de canais disponíveis e reduzindo o limiar para a deflagração do potencial de ação (CHEVRIER; VIJAYARAGAVAN; CHAHINE, 2004; VIJAYARAGAVAN; BOUTJDIR; CHAHINE, 2004).

Ainda que apresente ativação e inativação rápida, os canais Nav 1.7 apresentam uma recuperação da inativação incomumente lenta. Sua constante de tempo para recuperação da inativação a um potencial de membrana de -80 mV é $\tau \approx 100$ ms. Isso significa que, apenas após cerca de 100 ms no referido potencial de membrana, 63,7% da população de canais Nav 1.7 que contribuem com a corrente de sódio terão se recuperado da inativação, uma vez que o termo τ indica a medida de tempo necessária para que um evento descrito por uma função exponencial atinja 63,7% da resposta máxima estabilizada (ELLIOTT; ELLIOTT, 1993; CUMMINS; HOWE; WAXMAN, 1998; VIJAYARAGAVAN; O'LEARY; CHAHINE, 2001; HO *et al*, 2012). Essa característica do Nav 1.7 tem sido relacionada a baixa frequência de disparos de PA dos nociceptores (ELLIOTT; ELLIOTT, 1993). Outra propriedade biofísica de grande relevância nos canais Nav 1.7 é a sua constante de tempo para inativação do canal partindo estado fechado. Isso porque os canais de sódio sob potenciais transmembrana hiperpolarizados além de -60 mV passam a transitar do estado fechado para o estado inativado, um processo denominado *closed-state inactivation*. Para efeito de comparação, o canal de sódio expresso no tecido muscular esquelético, Nav 1.4, apresenta como constante de tempo para a *closed-state inactivation* $\tau \approx 27$ ms, enquanto para o canal Nav 1.7 a constante de tempo é $\tau \approx 144$ ms (CUMMINS; HOWE; WAXMAN, 1998). O fato do canal Nav 1.7 permanecer muito mais tempo disponível sob um potencial de membrana de repouso ($V \approx -65$ mV) gera duas implicações: 1) o canal Nav 1.7 eleva a probabilidade de estar disponível para abrir e contribuir com a corrente total de sódio quando o potencial transmembrana atingir o limiar neuronal. 2) enquanto disponível, o canal se ativa de modo transiente ante pequenas e lentas despolarizações de membrana, produzindo as chamadas correntes de rampa no processo. Estes dois fatores combinados tornam o Nav 1.7 apto a amplificar e integrar despolarizações sublimiares que, conseqüentemente, culminam no aumento da probabilidade de os neurônios atingirem seu limiar e deflagrarem o potencial de ação (CUMMINS; SHEETS; WAXMAN, 2007). Tais propriedades biofísicas indicam que o Nav 1.7 possui papel fisiológico crítico de preencher a lacuna existente entre a captação de um potencial despolarizante sublimiar e a ativação do canal de sódio Nav 1.8, de limiar elevado ($V_{1/2} = -15$ mV), que conduzirá a rápida corrente de entrada de sódio

responsável pela fase ascendente do potencial de ação nos neurônios nociceptores (CUMMINS; WAXMAN, 1997; BLAIR; BEAN, 2002).

Recentemente, Dustrude e colaboradores (2013) demonstraram que a expressão de Na_v 1.7 na membrana celular pode ser modulada pela proteína citoplasmática CRMP2 (proteína mediadora de resposta à colapsina 2). Esta proteína é altamente expressa em neurônios e oligodendrócitos do sistema nervoso central. Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, ainda que esteja envolvida principalmente no direcionamento do crescimento neuronal, esta proteína também executa funções regulatórias e estruturais relacionadas a dinâmica do citoesqueleto, tráfego de vesículas e atividade sináptica, enquanto suas funções no cérebro adulto ainda estão sendo elucidadas. Além disto, a CRMP2 tem sido correlacionada a diversas condições neuropatológicas ou psiquiátricas, incluindo doença de Alzheimer e esquizofrenia (HENSLEY *et al.*, 2011).

Alvo de várias modificações pós-translacionais, esta proteína pode ser fosforilada em diversos sítios, SUMOilada, sofrer adição do agrupamento β -N-acetil-D-glucosamina e ser oxidada (KHANNA *et al.*, 2012). A SUMOilação é um processo de ligação covalente reversível entre pequenas proteínas modificadoras semelhantes a ubiquitina (SUMO1, 2 ou 3) e o substrato. Segundo o trabalho de Dustrude e colaboradores, a inibição da SUMOilação da proteína CRMP2 nos neurônios do DRG reduz o tráfego dos canais de sódio Na_v 1.7 do núcleo para a membrana celular. Além disto, mostraram ainda que ao se aumentar a deSUMOilação da CRMP2, a densidade da corrente de sódio via Na_v 1.7 é reduzida. Com base neste achado, o presente estudo explorou a possibilidade da CRMP2 compor o mecanismo de ação pelo qual o TNF induz o aumento da expressão de Na_v 1.7 nos neurônios que originam as fibras A δ e C.

1.6 Composto A

O Composto A é um constituinte majoritário presente em diversos óleos essenciais extraído de plantas do nordeste da caatinga brasileira. Apresenta baixa toxicidade aguda (DL50= 2,1-3,2 g/kg para ratos e 1,82-5,0 g/kg para camundongos), sendo, por isto, utilizado como aromatizante em comidas cozidas, doces, sorvetes, gomas de mascar e bebidas alcoólicas. É muito usado como agente terapêutico na medicina da cultura popular em várias situações, como o alívio a dor e ansiedade e no tratamento de distúrbios

gastrointestinais. Devido à sua utilização generalizada, seu potencial tóxico tem sido estudado *in vitro* e *in vivo*. Com base nos achados de diversos e extensivos estudos, o Composto A é considerado não-genotóxico e não-carcinogênico. É reconhecido como seguro, baseado no conhecido mecanismo de desintoxicação em humanos a baixos níveis de exposição (1mg/kg/dia) e baixos níveis de uso como substâncias aromatizantes (54 µg/kg/dia).

A literatura internacional tem demonstrado que o Composto A possui atividade antioxidante, antigenotóxica, anticancerígena e anti-inflamatória. Seu efeito antioxidante se dá por várias vias: pelo aumento no nível intracelular da glutathione e glutathione-S-transferase, pela inibição da peroxidação lipídica, pela redução de radicais hidroxilas (TAIRA et al., 1992) e, mais recentemente, tem sido proposto possuir ação inibitória sobre a produção e/ou liberação de prostaglandina E2 e óxido nítrico. Também recentemente, o Composto A foi relatado como agente em potencial no combate ao câncer, uma vez que suprime a sobrevivência, induz a apoptose e inibe a transcrição de fatores inflamatórios realizados pela NF-κB de linhagens de células cancerígenas *in vivo*.

Para o presente trabalho, explorou-se a capacidade anti-inflamatória do Composto A, em específico a sua capacidade de reduzir a produção de TNF, fato já descrito pela literatura internacional.

2 JUSTIFICATIVA

Ainda que represente uma abordagem viável de tratamento, a literatura ainda não é consensual com respeito ao uso de bloqueadores para os receptores de TNF. Os relatos favoráveis ao uso de bloqueadores para os receptores de TNF indicam que a administração intratecal (MARCHAND *et al.*, 2009) sistêmica ou local (KATO *et al.*, 2010) de etanercepte (bloqueador da ativação do receptor de TNF), em modelo animal de dor neuropática, foi eficaz na redução da dor e no aumento da regeneração axonal. Um estudo piloto mostrou que a administração do etanercepte em pacientes com dor ciática severa apresentou resultados positivos (GENEVAY; STINGELIN; GABAY, 2004) e YAMAKAWA e colaboradores (2011), utilizando modelo animal de neuropatia diabética, mostrou que uma única injeção de infliximab (anticorpo anti-TNF) inibiu a expressão de RNA mensageiro para TNF em neurônios do DRG.

Os relatos desfavoráveis à aplicação clínica de bloqueadores de TNF apontam que anticorpos neutralizando TNF (infliximab, adalimumab) induzem o desenvolvimento da polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (RICHEZ *et al.*, 2005; ALSHEKHLEE *et al.*, 2010), neuropatia axonal sensorial e motora aguda (FAIVRE *et al.*, 2010) e neuropatia óptica anterior (CHANG, MCCURDY, GORDON, 2007; VON JAGOW, KOHNEN, 2008). Além disso, o tratamento com etanercepte se apresenta como sendo de alto custo e requer um longo prazo para que o paciente atinja o estado de remissão clínica (CÁRDENAS *et al.*, 2015).

Atualmente há apenas três agentes aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para uso no tratamento da DND nos EUA: duloxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina e norepinefrina, pregabalina, um anticonvulsivante, e um agente de efeito dual, o tapendatol, um agonista de receptor opioide e inibidor da recaptação de norepinefrina (FREEMAN, 2013). Porém, como o alívio da dor é insatisfatório para a maioria destes pacientes, as intervenções farmacológicas têm sido aplicadas com base em evidências pré-clínicas e/ou clínicas, bem como por inferência do mecanismo de ação (SCHREIBER *et al.*, 2015).

Haja vista a ausência de tratamentos eficazes da ND, bem como da DND, novas abordagens terapêuticas são claramente necessárias. Neste cenário, compostos de origem natural, que dispõem de um índice terapêutico potencialmente alto, podem compor uma nova via de tratamento. Com base na literatura, um destes compostos que apresenta baixa

toxicidade e atividade anti-inflamatória já descritas na literatura foi testado no Laboratório de Eletrofisiologia, da Universidade Estadual do Ceará. Em ratos diabéticos, o Composto A [atualmente em processo de registro de patente (BR 10 2015 018260 0)] reduziu a hiperalgesia detectada pelo teste de Von Frey e atenuou as alterações observadas nos nervos dos ratos diabéticos. Assim sendo, uma vez que o Composto A possui a capacidade de reduzir a produção de TNF, isto o torna um agente com potencial efeito neuroprotetor frente às alterações patológicas no sistema nervoso periférico advindas do quadro diabético.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o mecanismo de ação do Composto A como potencial agente preventivo do desenvolvimento da dor neuropática diabética.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do tratamento crônico dos ratos diabéticos com o Composto A sobre o desenvolvimento da hiperalgesia advinda do diabetes;
- Avaliar o efeito do tratamento crônico dos ratos diabéticos com o Composto A sobre a concentração plasmática de TNF;
- Comparar as medidas das correntes de Na^+ total nos neurosomas do DRG dos ratos diabéticos e diabéticos tratados com o Composto A;
- Verificar se a proteína CRMP2 compõe o mecanismo de ação entre a elevada concentração plasmática de TNF nos ratos diabéticos e o aumento da corrente total de sódio;
- Verificar o efeito da exposição aguda ao TNF em cultura de neurônios do DRG sobre a corrente de sódio conduzida por canais TTXs e pelo $\text{Na}_v 1.8$.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Indução ao diabetes

Os métodos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – sob o número de protocolo 233/2013. Os experimentos realizados na Universidade de Calgary foram inclusos no protocolo #AC13-0045, aprovado pela Health Sciences Animal Care Committee, da Universidade de Calgary. Os protocolos que foram realizados na Universidade de Calgary são os descritos nos itens 4.7, 4.9, 4.11 e 4.12.

Ratos Wistar com 28 dias de vida, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO), foram aleatoriamente separados em quatro grupos: Controle, Diabético, Controle + CA e Diabético + CA, sendo então submetidos a um jejum de 12 horas (+ CA indica os ratos que receberam, diariamente, Composto A). Em seguida, os ratos dos grupos Diabético e Diabético + CA receberam uma injeção única intraperitoneal de STZ (65 mg/kg) diluída em solução veículo, citrato de sódio a 10 mM, pH 4,5. Os ratos dos grupos Controle e Controle + CA receberam uma injeção da solução veículo. Uma semana após a indução foram aferidas a glicemia, sendo considerados diabéticos os animais com glicemia acima de 300 mg/dL.

O curso temporal para as diferentes medidas realizadas encontra-se ilustrado figura 10. A descrição dos protocolos utilizados para estas medidas encontra-se detalhada posteriormente. O dia em que o protocolo de indução ao diabetes é realizado é referido nos resultados como dia “0”. Os ratos foram eutanasiados por inalação de dióxido de carbono (CO₂) 60 dias após a indução ao diabetes para obtenção de seus DRGs e consequente dissociação dos neurônios, conforme também detalhado posteriormente.

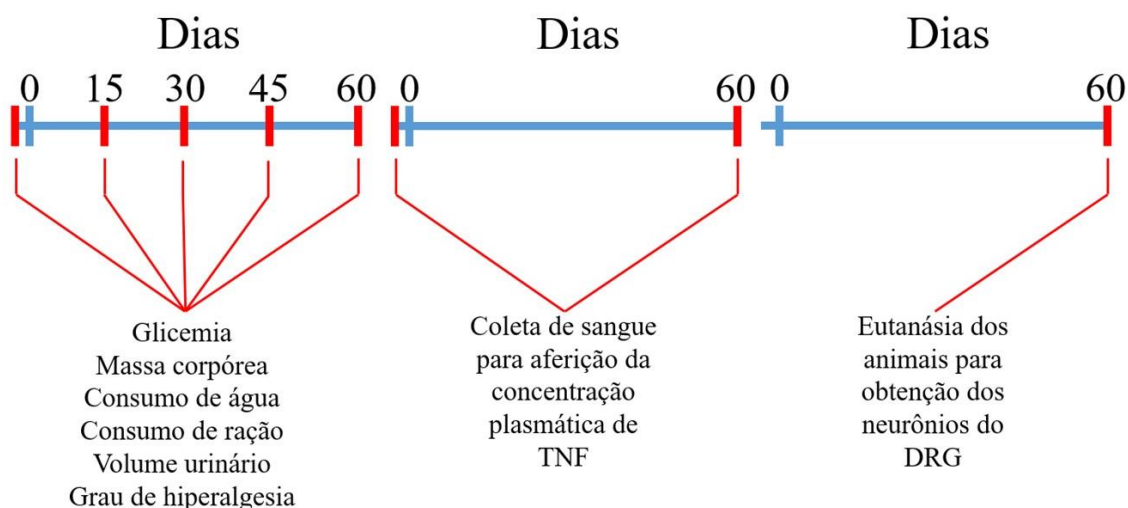


FIGURA 10- Representação esquemática do curso temporal das medidas e protocolos utilizados. Dia “0” indica o dia em que o protocolo de indução ao diabetes foi realizado. Assim, as medidas de glicemia, consumo de água, consumo de ração, volume urinário e grau de hiperalgesia foram realizadas nos dias 15, 30, 45 e 60 após a indução ao diabetes. As coletas de sangue foram realizadas no dia anterior ao dia “0” e no dia 60, enquanto os ratos foram eutanasiados no dia 60.

4.2 Tratamento com o Composto A

Uma semana após a indução os ratos receberam diariamente, via gavagem, o Composto A (Controle + CA e Diabético + CA) na dose de 200 mg/kg, diluída em solução salina (NaCl a 0,9%). Os ratos dos grupos Controle e Diabético receberam apenas salina. O volume administrado na gavagem foi estabelecido para 1 ml/kg para todos os ratos. A gavagem foi realizada por 7 semanas.

4.3 Consumo de água, ração, fluxo urinário, glicemia e massa corpórea

Quinzenalmente, os animais foram acomodados separadamente em gaiolas metabólicas pelo período de 48 horas para o monitoramento do seu consumo de água, de ração e volume urinário. As primeiras 24 horas se destinaram ao período de adaptação do animal ao ambiente, ao isolamento dos demais animais e à gaiola metabólica. Nas 24 horas seguintes o consumo de água, de ração e volume urinário dos animais foi monitorado.

Também foram aferidas quinzenalmente a glicemia e a massa corpórea. Para aferição da glicemia, uma amostra de sangue foi obtida através de um pequeno corte realizado na extremidade da cauda do rato. A glicemia da amostra de sangue foi aferida pelo uso de tiras reagente e glicosímetro do kit Accu-Check Active (Roche®).

4.4 Medida do grau de hiperalgesia pelo método de Randall e Selitto

O método de retirada da pata submetida à compressão, descrito por Randall e Selitto (1957) foi utilizado para a mensuração da hiperalgesia. No teste, o animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata sob teste tem sua plantar exposta à parte compressora do aparelho. Esta consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se coloca a pata do animal, e outra cônica, com uma área de $1,75 \text{ mm}^2$ na extremidade, por meio da qual é exercida uma pressão na superfície plantar da pata do animal. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 32 g/s para ratos, mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador, necessária para induzir uma reação de aversão do animal (reflexo de retirada de pata). Ao observar a resposta nociceptiva do animal, o experimentador interrompe o acionamento do pedal, cessando assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, que corresponde ao limiar nociceptivo, permanece indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g). É importante ressaltar que o animal foi ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento. A pata do animal é submetida ao aparelho repetidas vezes, até não haja mais manifestações da reação de fuga.

4.5 Quantificação de TNF por ELISA

No dia anterior à indução ao diabetes e no dia 60, amostras de sangue foram coletadas dos animais. Para tanto, estes foram acondicionados em um contensor para

ratos, seguido de coleta de 0,5 a 1,5 ml de sangue arterial da cauda através do uso de cateter intravascular periférico (agulha 24 G) perfundido com citrato de sódio (1 mM), a fim de se evitar a coagulação durante a coleta. O sangue retirado foi mantido à temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de refrigeração (4 °C) por 10 min para que se formasse o coágulo para obtenção do soro sanguíneo. Em seguida as amostras foram centrifugadas (1300 RPM, 5 minutos) e o sobrenadante foi coletado. Este foi armazenado à temperatura de -20 °C para posterior análise via ELISA (DuoSet kits; R&D Systems), seguindo instruções do fabricante.

4.6 Dissociação dos neurônios do DRG para estudo da corrente total de sódio dos grupos Controle, Diabético, Controle + CA e Diabético + CA

Os DRGs foram dissecados da região lombar (L4, L5, L6) e dissociados via digestão enzimática. Inicialmente, estes foram lavados em solução salina balanceada de Hank (HBSS) contendo (mM): 0,44 KH_2PO_4 , 5,33 KCl, 4 NaHCO_3 , 137,93 NaCl, 0,3 Na_2HPO_4 , 5,6 Glicose e solução de antibióticos (Penicilina-Estreptomicina) a 1% v/v, pH 7,4 ajustado com NaOH a 1 M. Em seguida, foram mantidos imersos em HBSS contendo colagenase do tipo Ia a 0,1% e mantidos em banho-maria a 37° C por 60 minutos, sendo levemente agitados a cada 10 minutos. O tecido foi, então, lavado por três vezes em HBSS e imerso em HBSS contendo Tripsina-EDTA a 0,25% v/v, onde foi mantida em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Em seguida, para inativar a tripsina, o tecido foi lavado três vezes com solução de meio de cultura (DMEM) contendo 10% v/v de soro fetal bovino e solução de antibióticos (Penicilina-Estreptomicina) a 1% v/v. Os gânglios foram, então, gentilmente desbastados com pipeta Pasteur de vidro. Na sequência, o tecido foi imerso em 1 ml de DMEM e centrifugado por 1 minuto a 1000 RPM, onde o sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspensionado em 200 ml de DMEM. Por fim, o conteúdo foi distribuído em lamínulas contendo Poli-D-lisina (50µg/ml), e acondicionado em estufa de CO_2 (95 % O_2 e 5 % CO_2) a 37° C, por, no mínimo, 12 horas antes de serem utilizadas.

4.7 Dissociação dos neurônios do DRG para estudo do efeito do TNF sobre a corrente total de sódio em neurônios do DRG transfectados com os plasmídeos para CRMP2-WT-GFP e CRMP2-K374A-GFP e para o estudo do efeito do TNF sobre as correntes de sódio TTXs e TTXr

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley com 5-6 semanas de vida, provenientes da companhia Charles River[®]. Estes foram anestesiados com isoflurano e decapitados pelo uso de guilhotina. Após acesso a medula espinhal, foram dissecados entre 40-50 DRGs, os quais foram mantidos em solução salina de PBS (em mM: 137 NaCl₂, 2,7 KCl, 10 Na₂HPO₄ e 2 KH₂PO₄) mantida em gelo. Na sequência, os DRGs foram limpos de tecidos aderentes e submetidos à digestão enzimática. Para tanto, foram expostos a 1 mL de solução de meio de cultura F12 (já contendo 10% v/v de soro fetal bovino e 1% v/v de solução de penicilina-estreptomicina) com a adição de 40 µL de papaína e 4 mg de colagenase tipo Ia por 30 minutos, mantidos em banho-maria a temperatura de 37 °C. Em seguida, o meio foi substituído para adição de 0,4 % de DNase, sendo os DRGs mantidos por mais 10 minutos em banho-maria. Os DRGs foram levemente agitados a cada 5 minutos. Após a digestão, o meio de cultura foi substituído 3 vezes, de modo a eliminar as enzimas digestórias. Os DRGs foram cautelosamente desbastados pelo uso de uma pipeta automática de 1000 µL e os neurônios provenientes do desbastamento foram transferidos para o meio de cultura F12 enriquecido com os suplementos B27 (2%), L-glutamina (1%), N2 (1%) e NGF (0,1%), onde foram distribuídos em uma placa de 24 de poços contendo lamínulas de vidro pré-tratadas com laminina (1%) e Poli-D-lisina (10%). Foram adicionados 600 µL de meio contendo células em cada poço. A placa de 24 poços foi então mantida em estufa (5% CO₂ - 95% O₂, 37 °C) até o momento em que as células foram utilizadas. Para o estudo do efeito do TNF sobre a corrente total de sódio em neurônios do DRG transfectados, as células foram mantidas em cultura pelo período de 2 semanas. Para o estudo do efeito do TNF sobre as correntes de sódio TTXs e TTXr, as células foram utilizadas após o tempo mínimo de 12 horas em cultura.

4.8 Experimentos de *Patch Clamp* para estudo da corrente total de sódio em neurônios de ratos dos grupos Controle, Diabético, Controle + CA e Diabético + CA

Os registros das correntes de Na^+ foram obtidos pelo uso de amplificadores de *Patch Clamp* do tipo EPC-9/EPC-10 (HEKA Instruments, Germany) e do programa de aquisição de dados PULSE/PATCHMASTER (HEKA Instruments, Germany), ajustado na configuração *Whole Cell Voltage Clamp*. As pipetas foram confeccionadas pelo uso de capilares de vidro comum/neutro (Perfecta sem heparina, São Paulo, SP, Brasil) com o auxílio de um estirador de micropipetas (PP-830, Narishige, Japan) ajustado para estirar pipetas com resistência média não-compensada de 2 M Ω . Estas foram preenchidas com solução contendo (em mM): 10 NaCl, 100 CsCl, 5 MgCl₂, 10 HEPES e 11 EGTA e 10 TEA-Cl, pH 7,2 ajustado com CsOH a 1 M. A solução de banho (Tyrode modificado) continha (em mM) 140 NaCl, 5 KCl, 1,8 CaCl₂, 0,5 MgCl₂, 5 Glicose e 5 HEPES, pH 7,4 ajustado com NaOH a 1 M. Ao se estabelecer a configuração *Whole Cell* na célula em estudo, a mesma foi perfundida com solução externa contendo (em mM) 40 NaCl; 3 KCl; 1 CaCl₂; 1 MgCl₂; 20 TEA-Cl; 0,1 CdCl₂; 70 Colina-Cl; 10 HEPES; 10 Glicose, pH 7,4 ajustado com NaOH 1 mM. Um eletrodo de Ag–AgCl foi usado como referência. O valor calculado do potencial de junção foi de 5,8 mV entre a solução de pipeta para medida da corrente de Na^+ e a solução externa. Correntes capacitivas foram compensadas eletronicamente e um protocolo P/4 foi usado para correção da corrente de vazamento linear e para a subtração da capacitância residual (BEZANILLA, ARMSTRONG, 1977). Os registros das correntes foram filtrados com um filtro tipo Bessel passa baixa ajustado em 2,9 kHz e adquiridos a uma taxa de 20 kHz (intervalo de 50 μs). O protocolo dos potenciais de membrana adotado para o registro das correntes está representado na figura 11. Os experimentos foram realizados em placas de Petri de acrílico, de 35 mm de diâmetro, usando-se microscópio invertido (Axiovert 20, Carl Zeiss, Germany ou Nikon TMF-100, Nikon, Japan). Para perfusão das células foram utilizados dois métodos: o sistema automático de perfusão por gravidade (ALA VC3-4PG, ALA INSTRUMENTS) e um sistema adaptado. Este último constitui-se de seringas de 20 ml posicionadas 20 cm acima do nível da preparação, onde as soluções foram acondicionadas. Estas tinham acesso à preparação através de mangueiras de silicone com diâmetros interno e externos 1,5 e 2,42 mm, respectivamente, conectadas a uma pipeta de vidro comum, cuja extremidade em contato com a preparação, apresenta um diâmetro interno de, aproximadamente, 0,75

mm, confeccionada em um microforge (MF 830 – NARISHIGE INSTRUMENTS). O fluxo, decorrente da gravidade, foi controlado através de equipamentos instalados nas mangueiras de silicone.

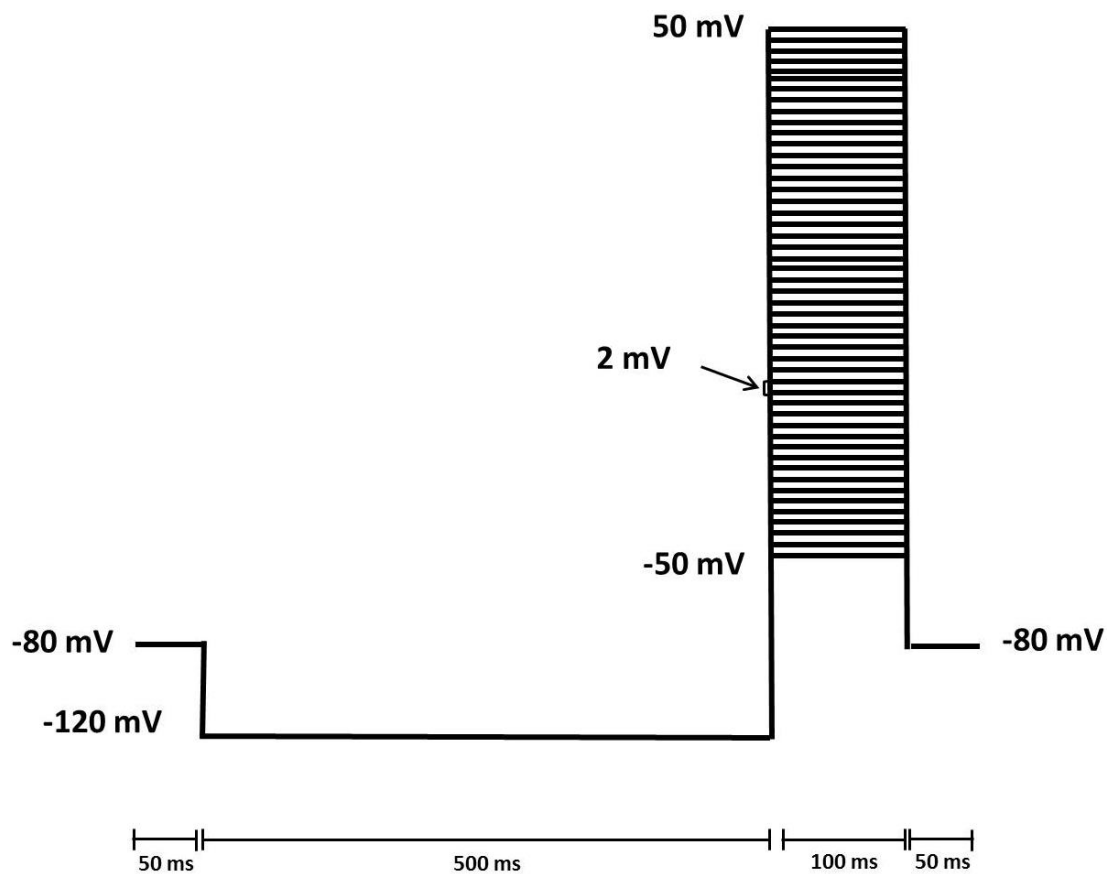


FIGURA 11- Representação esquemática do protocolo de pulsos de potencial de membrana utilizado para o registro da corrente total de sódio descrito no item 4.8.

4.9 Experimentos de *Patch Clamp* para estudo da corrente total de sódio em neurônios do DRG transfectados com CRMP2-WT-GFP e CRMP2- K374A-GFP

Os registros da corrente total de Na^+ foram obtidos pelo uso do amplificador Axoclamp 200B na configuração *Whole Cell Voltage Clamp* em combinação com o software Clampex 9.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Estes registros foram filtrados com um filtro tipo Bessel passa baixa ajustado em 2,9 kHz e digitalizados a uma taxa de 20 kHz (intervalo de 50 μs) através da placa de interface da Digidata 1320A. As pipetas foram obtidas a partir de capilares de borossilicato (diâmetro externo: 1.5mm; diâmetro interno: 0.86mm – item BF150-86-7.5 - Sutter) com o auxílio de um estirador

de micropipetas (P-97 Micropipette Puller, Sutter Instruments Company, Novato, CA) com ajuste para confecção de pipetas com resistência não-compensada de 3-4 M Ω . Estas foram preenchidas com solução contendo (em mM): 10 NaCl, 100 CsCl, 5 MgCl₂, 10 HEPES e 11 EGTA e 10 TEA-Cl, pH 7,2 ajustado com CsOH a 1 M. A solução externa também foi utilizada como solução de banho, contendo (em mM): 50 NaCl, 5 CsCl, 0,1 CdCl₂, 0,5 MgCl₂, 60 Glicose e 5 HEPES, pH 7,4 ajustado com NaOH a 1 M. Um eletrodo de Ag–AgCl foi usado como referência. O valor calculado do potencial de junção foi de -5,6 mV entre a solução de pipeta para medida da corrente de Na⁺ e a solução externa. Correntes capacitivas foram compensadas eletronicamente e um protocolo P/4 foi usado para correção da corrente de vazamento linear e para a subtração da capacitância residual (BEZANILLA, ARMSTRONG, 1977). O protocolo dos potenciais de membrana adotado para o registro das correntes está representado na figura 12. Os experimentos foram realizados em placas de Petri de acrílico, de 35 mm de diâmetro, usando-se microscópio invertido (Nikon TMF-100, Nikon, Japan).

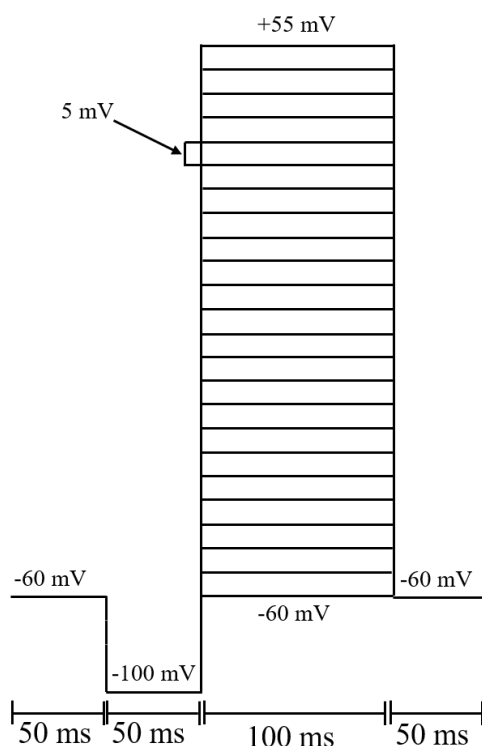


FIGURA 12- Representação esquemática dos potenciais de membrana estabelecidos para o registro da corrente total de sódio descrito no item 4.10.

4.10 Experimentos de *Patch Clamp* para estudo do efeito agudo da exposição ao TNF sobre as correntes de sódio total, TTXs e TTXr nos neurônios dissociados do DRG

Os registros de *Patch Clamp* deste tópico foram adquiridos utilizando-se os mesmos equipamentos e configurações descritos no item 3.8. As pipetas foram preenchidas com solução contendo (em mM): 10 NaCl, 100 CsCl, 5 MgCl₂, 10 HEPES e 11 EGTA e 10 TEA-Cl, pH 7,2 ajustado com CsOH a 1 M. A solução externa também foi utilizada como solução de banho. À placa de Petri foi adicionado o volume de 1,9 ml de solução de banho/externa, esta contendo (em mM): 50 NaCl, 5 CsCl, 0,1 CdCl₂, 0,5 MgCl₂, 60 Glicose e 5 HEPES, pH 7,4 ajustado com NaOH a 1 M. Um eletrodo de Ag–AgCl foi usado como referência. O valor calculado do potencial de junção foi de -5,6 mV entre a solução de pipeta para medida da corrente de Na⁺ e a solução externa. Para a separação da corrente de sódio TTXr, após estabelecida a configuração *Whole Cell* e obtida a corrente total de sódio, 100 µL de solução externa contendo TTX foram adicionados à solução de banho, de forma a se obter uma concentração final de TTX de

300 nM. O registro foi adquirido 20 segundos após a adição do TTX. O protocolo dos potenciais de membrana adotado para o registro das correntes está representado na figura 13.

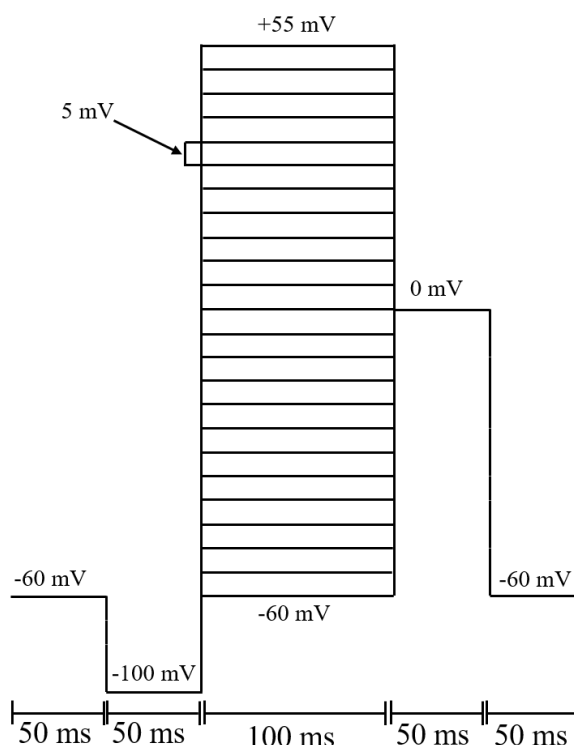


FIGURA 13- Representação esquemática dos potenciais de membrana estabelecidos para o registro da corrente total de sódio descrito no item 4.10.

4.11 Produção de vírus para transfecção dos neurônios dissociados do DRG

Para transfecção dos neurônios dissociados do DRG foi utilizado o kit para produção do adenovírus recombinante AAV5 (AAV5 Helper-Free System, Agilent Technologies Stratagene Products Division, CA, USA). O kit contém três vetores: pAAV-MSC, pAAV-RC5 e pHelper. No primeiro vetor foram adicionados os genes de interesse, CRMP2-WT e CRMP2-K374A, ambos contendo como marcador o gene para GFP (Green Fluorescent Protein), resultando na formação dos vetores para GFP-CRMP2-WT e GFP-CRMP2-K374A. Estes foram transfectados em células imortalizadas da linhagem 293AAV (pelo uso de solução de fosfato de cálcio) concomitantemente com os vetores pAAV-RC5 e pHelper, processo que resulta na produção dos vírus específicos para infecção de neurônios do DRG e que contém como material viral os genes de interesse

CRMP2-WT-GFP e CRMP2-K374A-GFP. 24-72 horas após a transfecção o vírus foi extraído das células 293AAV de acordo com instruções contidas no kit para purificação de vírus (Takara AAVpro® Purification Kit, TAKARA BIO INC), gerando como produto final soluções contendo vírus na concentração de $5 \cdot 10^7$ gc/uL (cópias genômicas por microlitro).

4.12 Transfecção dos neurônios do DRG

12-18 horas após a dissociação dos neurônios do DRG foram adicionados 5 μ L/poço de solução contendo o vírus para GFP-CRMP2-WT ou 10 μ L/poço de solução contendo o vírus para GFP-CRMP2-K374A. Os vírus foram mantidos na cultura pelo período de 72 horas, quando o meio contendo vírus foi, então, substituído por meio F12 enriquecido de suplementos. Após duas semanas em cultura, todos os neurônios de aspecto saudável emitiram fluorescência ante o estímulo luminoso emitido pelo laser de microscopia confocal (Zeiss LSM-510, $\lambda = 488$ nm), confirmando que foram transfectadas.

Para o estudo do efeito da exposição ao TNF α sobre a corrente total de Na⁺ nas células transfectadas, estas tiveram adicionadas ao seu meio de cultura TNF na concentração de 700 pg/ml por 6 horas. Após esta exposição, as células tiveram sua corrente total de sódio registrada.

4.13 Análises dos dados

Para os dados de eletrofisiologia celular foram utilizados neurônios com capacitância ≤ 45 pF (diâmetros entre 15 e 30 μ m) (HAMADA *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2004; LEO *et al.*, 2015). Os dados que compuseram a curva da relação corrente x voltagem para a corrente de sódio foram ajustados utilizando-se a lei de Ohm estendida,

$$G = \frac{I(V_m)}{(V_m - V_r)} \quad (1),$$

em conjunto com a relação de Boltzmann,

$$G = \frac{G_{m\acute{a}x}}{1 + e^{(V_{1/2} - V_m)/k}} \quad (2),$$

resultando na equação

$$I(V_m) = \frac{G_{m\acute{a}x} \cdot (V_m - V_r)}{1 + e^{(V_{1/2} - V_m)/k}} \quad (3),$$

onde G é condutância, $I(V_m)$ é a corrente para um dado potencial de membrana (V_m), V_r é o potencial de reversão, $G_{m\acute{a}x}$ é a condutância máxima, $V_{1/2}$ é o potencial para ativação de 50% da corrente máxima e k é a inclinação da curva de condutância. A condutância normalizada foi obtida pela relação $G/G_{m\acute{a}x}$. Para o ajuste dos dados de inativação rápida estacionária dos canais de sódio, o h_∞ , utilizou-se a equação 3 normalizada pela corrente máxima ($I/I_{m\acute{a}x}$) obtida pela equação 1, resultando na equação

$$h_\infty = \frac{1}{1 + e^{(V_m - V_h)/k_h}} \quad (4),$$

onde V_h é o potencial pré-pulso teste que inativa 50% da corrente máxima e k_h é a inclinação da curva de inativação rápida estacionária. O gráfico da corrente de janela foi obtido pelo produto entre as equações de ajuste da curva de ativação estacionária e inativação rápida estacionária (FISCHER *et al.*, 2017), conforme descrito na equação 5.

$$p = \frac{1}{1 + e^{[(V_{1/2} - V_m)/k]}} \cdot \frac{1}{1 + e^{[(V_m - V_h)/k_h]}} \quad (5).$$

A subtração das correntes TTXs e TTXr da corrente total de sódio foi realizada digitalmente. Os dados de eletrofisiologia celular, bem como os demais dados, foram submetidos ao teste de normalidade e, em seguida, as análises estatísticas para todos os dados foram realizadas usando-se o Teste t-Student, One Way ANOVA ou Two Way ANOVA, conforme apropriado, seguidos do teste de Bonferroni. Os dados apresentaram nível de significância quando o p foi menor do que 0,05. Os dados foram processados e analisados utilizando-se os softwares Fit Master, Clampfit 10.2, Sigma Plot 11.0 e GraphPad Prism 5.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do tratamento crônico com o Composto A sobre os parâmetros de consumo de água, ração, volume urinário e fluxo urinário

5.1.1 Tratamento crônico com o Composto A não altera glicemia

A injeção i.p. de estreptozotocina (65 mg/kg) resulta em hiperglicemia acentuada (figura 14), bastante evidente no 15º dia após a indução, nos ratos do grupo Diabético e Diabético + CA. É possível notar que o tratamento crônico com o Composto A, salvo medida do dia 15 pós protocolo de indução ao diabetes, não resulta em alteração da glicemia dos ratos tratados, sejam estes controles ou diabéticos.

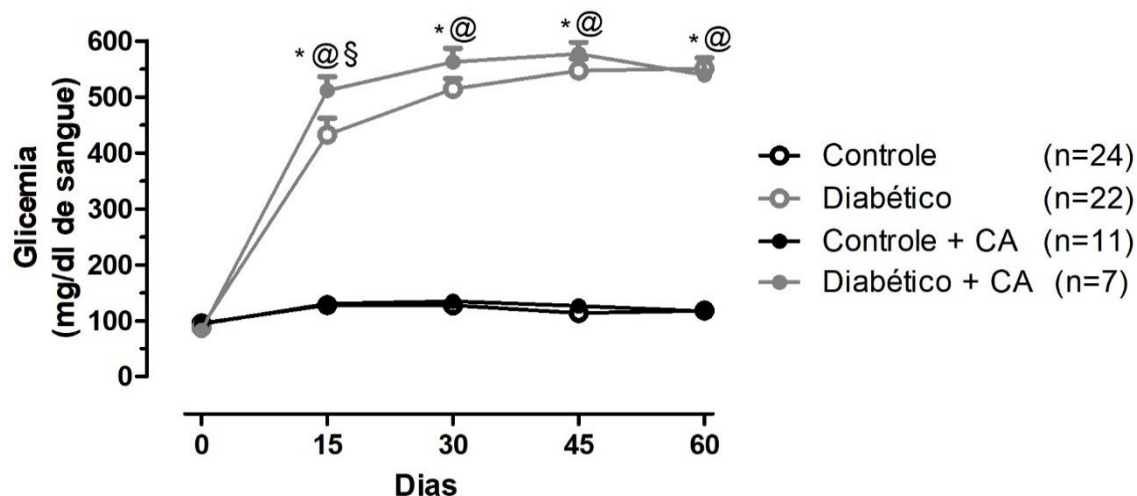


FIGURA 14– Representação dos valores de glicemia aferidos ao longo do curso temporal de 60 dias. As medidas foram obtidas quinzenalmente, a partir do dia “0”. * Controle vs Diabético; @ Controle vs Diabético + CA; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.1.2 Tratamento crônico com o Composto A promove redução da massa corpórea

Os ratos diabéticos apresentaram reduzido ganho de massa corpórea, quando comparados aos grupos Controle e Controle Tratado (figura 15). Porém, tanto os ratos do

grupo controle quanto os animais do grupo diabético que receberam cronicamente o Composto A tiveram reduzido ganho de massa corpórea quando comparado com os ratos dos grupos Controle e Diabético, respectivamente.

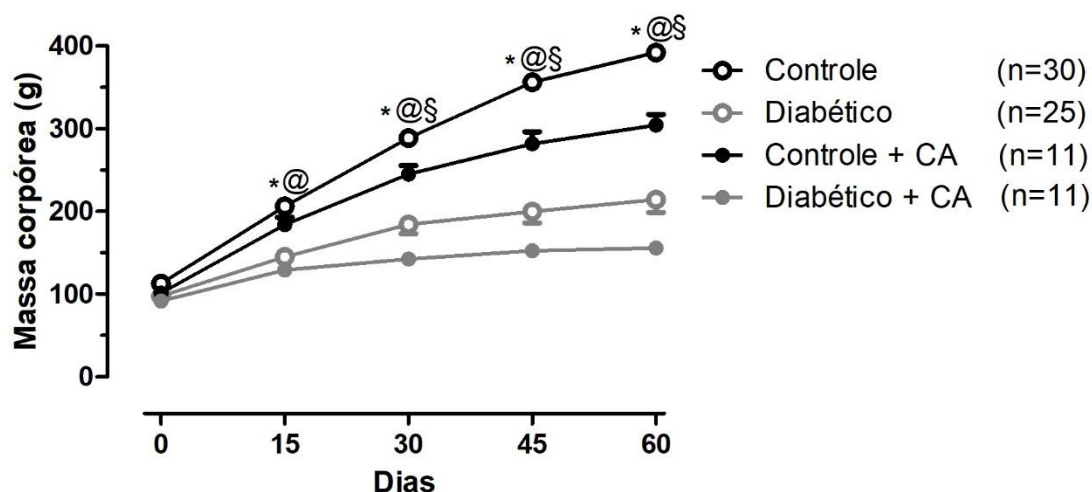


FIGURA 15- – Representação dos valores de massa corpórea aferidos ao longo do curso temporal de 60 dias. As medidas foram obtidas quinzenalmente, a partir do dia “0”. * Controle vs Diabético; @ Controle vs Diabético + CA; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.1.3 Polifagia é atenuada em animais diabéticos tratados com o Composto A

Os ratos diabéticos apresentaram polifagia, como resultado da hiperglicemia estabelecida nestes animais. Apesar de apresentar redução no ganho de massa corpórea (figura 11), os animais diabéticos mostraram maior consumo de ração (figura 16) quando comparado com os grupos Controle e Controle + CA. Além disso, é possível observar um consumo atenuado do rato diabético tratado com o Composto A que, no dia 60, apresenta valores de consumo compatíveis com os observados nos ratos dos grupos Controle e Controle + CA.

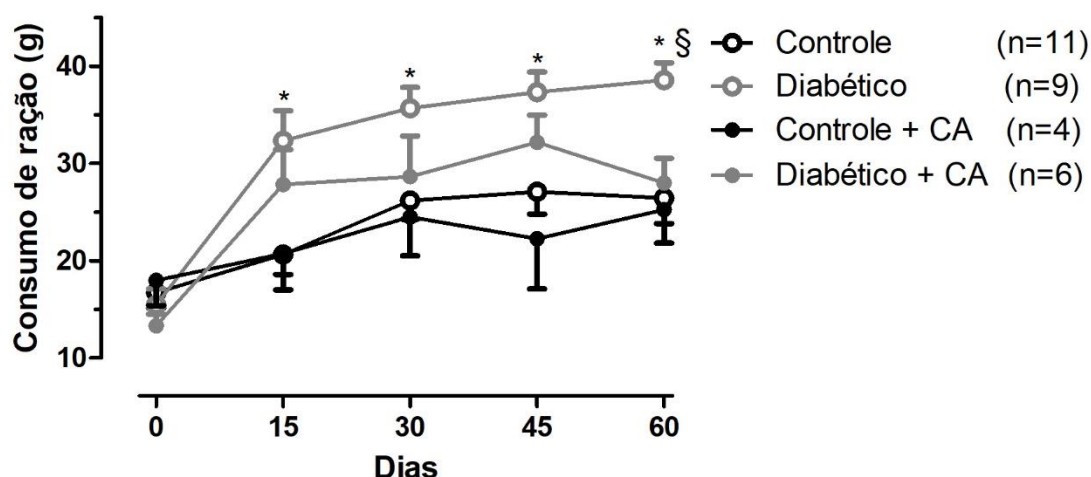


FIGURA 16– Representação dos valores de consumo de ração medidos no intervalo de tempo de 24 horas, aferidos ao longo do curso temporal de 60 dias. As medidas foram obtidas quinzenalmente, a partir do dia “0”. * Controle vs Diabético; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.1.4 Polidipsia é atenuada em ratos diabéticos tratados com o Composto A

Os ratos diabéticos também apresentaram polidipsia (figura 17), como sintoma da hiperglicemia acentuada. O consumo de água dos ratos dos grupos diabético e diabético tratado se mostrou aumentado em comparação com os demais grupos. Porém, é interessante notar que os ratos diabéticos tratados com o Composto A exibiram atenuação do consumo de água a partir do dia 45 pós protocolo de indução ao diabetes, o que não foi apresentado pelos ratos do grupo Controle + CA.

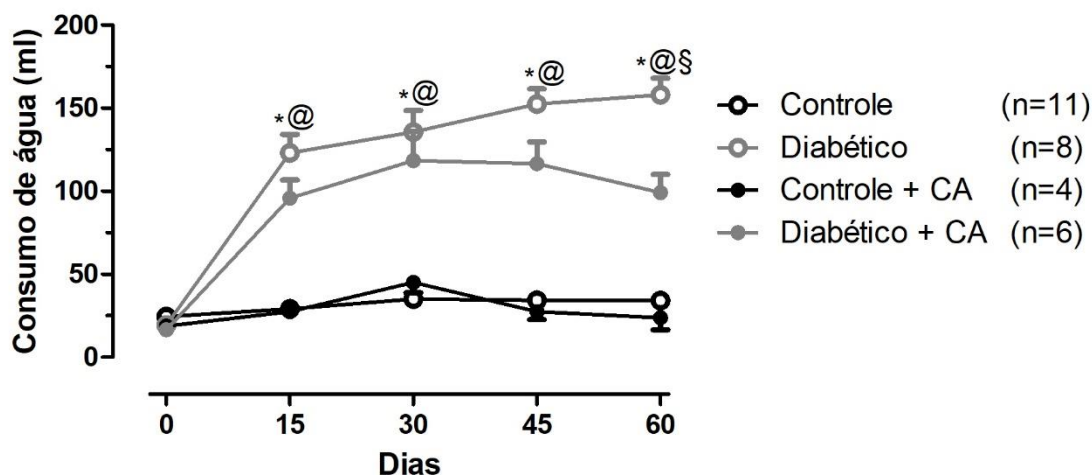


FIGURA 17- Representação dos valores de consumo de água medidos no intervalo de tempo de 24 horas, aferidos ao longo do curso temporal de 60 dias. As medidas foram obtidas quinzenalmente, a partir do dia “0”. * Controle vs Diabético; @ Controle vs Diabético + CA; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.1.5 Composto A reduz poliúria em ratos diabéticos

Os ratos diabéticos passaram a excretar elevada quantidade de urina (poliúria) quando comparados aos dos grupos Controle e Controle + CA (figura 18). Interessante observar que o tratamento com o Composto A não apresenta efeito nos ratos Controle + CA, enquanto nos ratos Diabéticos + CA causa atenuação do volume urinário, verificado na medida do dia 30 pós protocolo de indução ao diabetes.

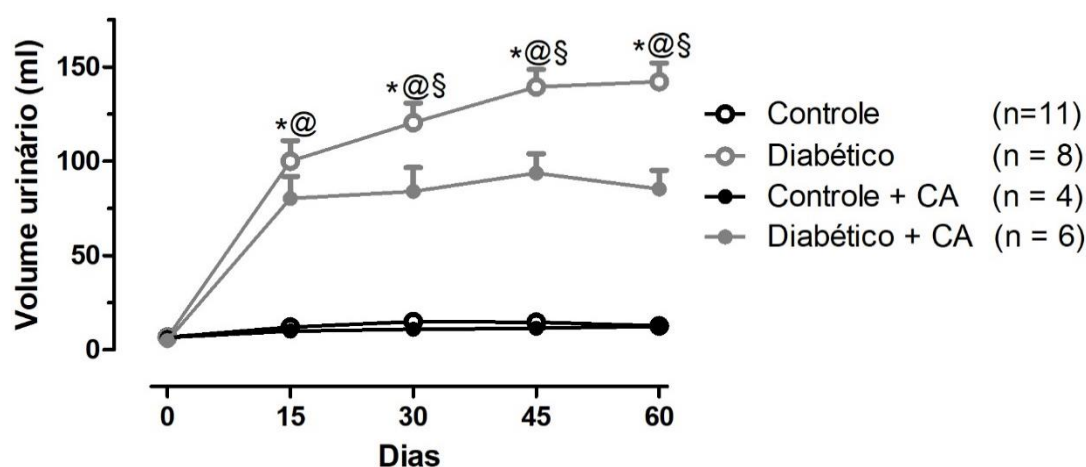


FIGURA 18- Representação dos valores de volume urinário medidos no intervalo de tempo de 24 horas, aferidos ao longo do curso temporal de 60 dias. As medidas foram obtidas quinzenalmente, a partir do dia “0”. * Controle vs Diabético; @ Controle vs Diabético + CA; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.1.6 Fluxo Urinário dos ratos diabéticos é alterado pelo tratamento com o Composto A

Os dados de volume urinário apresentados na forma de fluxo urinário (figura 19) mostram que a quantidade de urina excretada pelos ratos diabéticos por unidade de tempo ($\text{ml}/\text{min} \cdot 10^{-3}$) é bastante elevado quando comparado com os ratos dos grupos controle. Novamente se nota que o tratamento com o Composto A atenua a quantidade de urina por unidade de tempo.

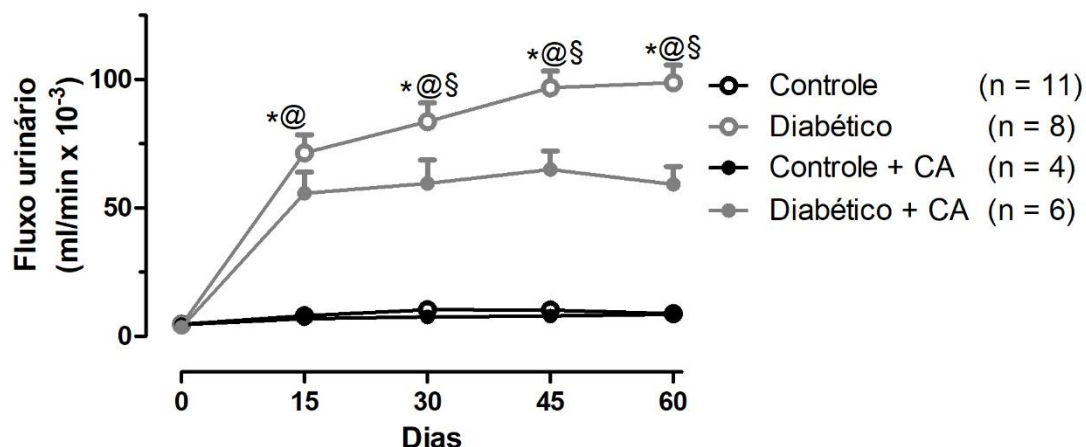


FIGURA 19– Representação dos valores de fluxo urinário medidos no intervalo de tempo de 24 horas, aferidos ao longo do curso temporal de 60 dias. As medidas foram obtidas quinzenalmente, a partir do dia “0”. * Controle vs Diabético; @ Controle vs Diabético + CA; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.2 Tratamento com o Composto A atenua hiperalgesia dos ratos diabéticos

Foi possível observar, pelas medidas obtidas através da técnica de Randall-Selitto (figuras 20 e 21), que os ratos dos grupos Diabético e Diabético + CA apresentam hiperalgesia já a partir da primeira medida pós indução ao diabetes. Nota-se também que o tratamento com o Composto A atenua significativamente a hiperalgesia dos ratos diabéticos, mas não é capaz recuperar o limiar mecânico ao nível dos ratos controle.

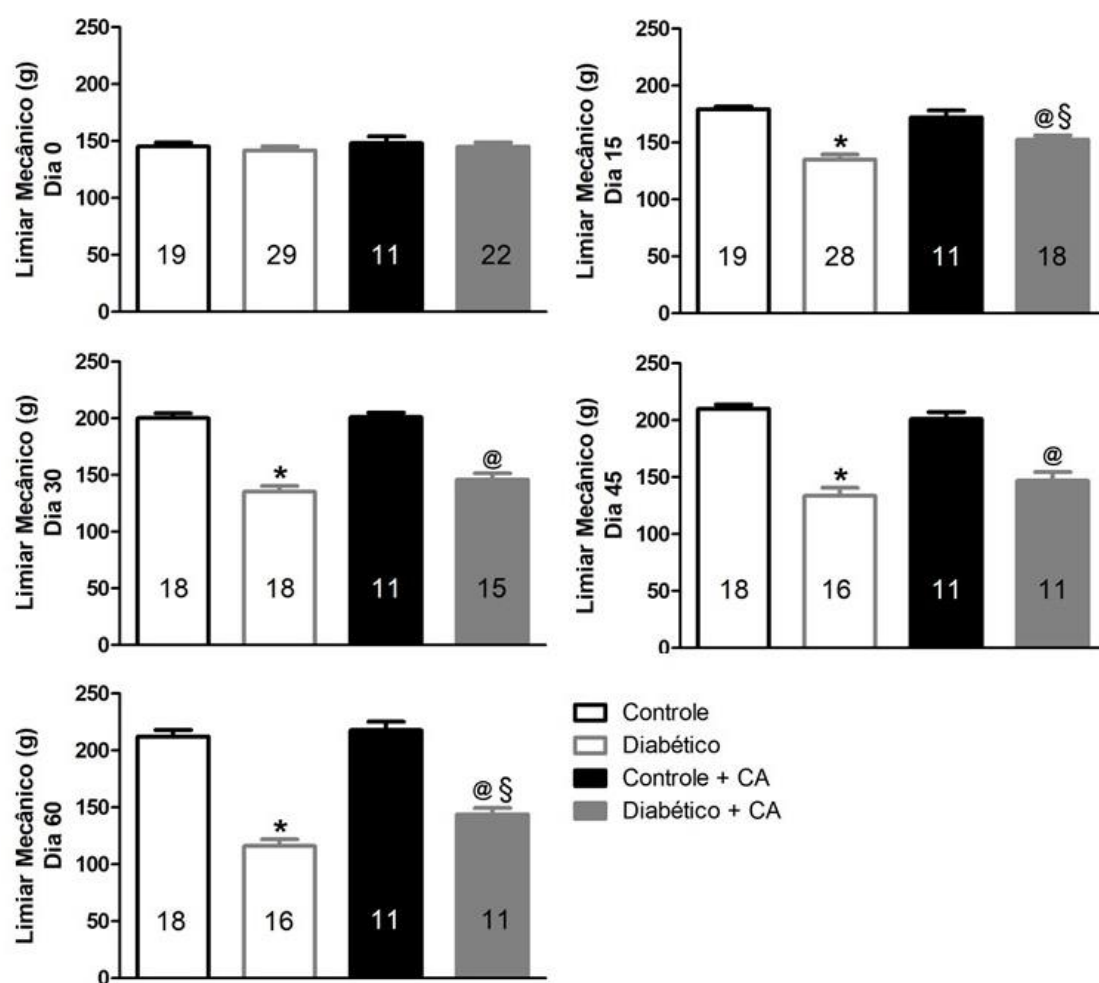


FIGURA 20– Representação dos valores de limiar mecânico aferidos pelo teste de Randall-Selitto ao longo do curso temporal de 60 dias. As medidas foram obtidas quinzenalmente, a partir do dia “0”. * Controle vs Diabético; @ Controle vs Diabético + CA; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

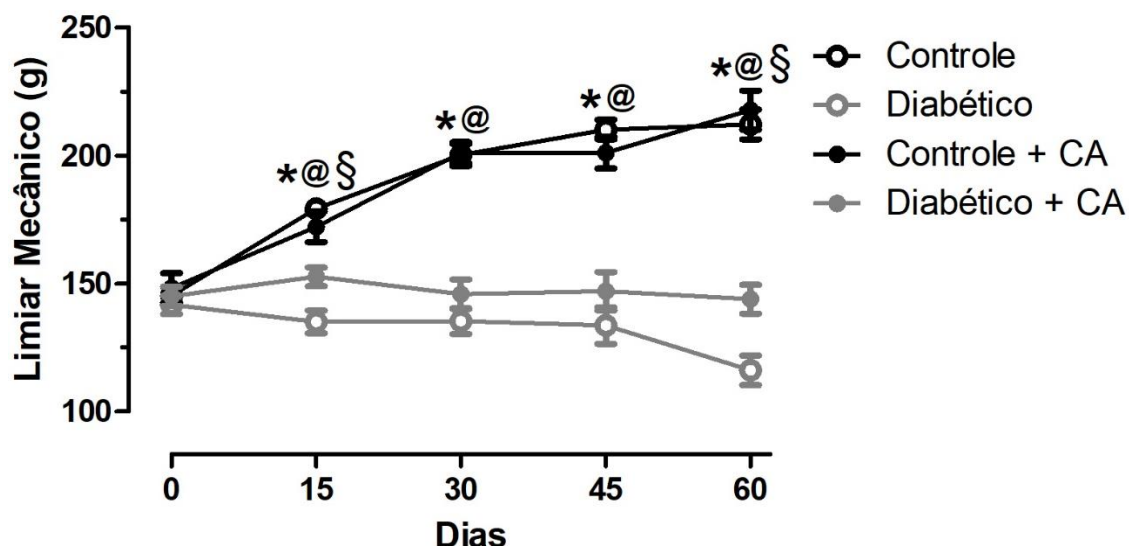


FIGURA 21– Representação dos valores de limiar mecânico aferidos pelo teste de Randall-Selitto ao longo do curso temporal de 60 dias. As medidas foram obtidas quinzenalmente, a partir do dia “0”. * Controle vs Diabético; @ Controle vs Diabético + CA; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.3 Tratamento com o Composto A inibe aumento da densidade de corrente total de Na^+ observada nos neurônios do DRG dos animais diabéticos sem tratamento

O estudo da relação corrente-voltagem (I-V) para a corrente total de sódio em neurônios do DRG (figuras 22 e 23) mostrou que a densidade da corrente de sódio no pico se encontra aumentada nos neurônios dos animais diabéticos quando comparada aos demais grupos (Controle: $189,4 \pm 10,7$ pA/pF, $n = 18$; Diabético: $231,4 \pm 25,1$ pA/pF, $n = 10$; Controle Tratado: $152,6 \pm 13,1$ pA/pF, $n = 14$; Diabético Tratado: $159,2 \pm 14,7$ pA/pF, $n = 12$). Neurônios provenientes de animais diabéticos tratados com o Composto A mostraram valores de amplitude da densidade de corrente bastante próximos dos valores controle (figura 22, 23 e 24).

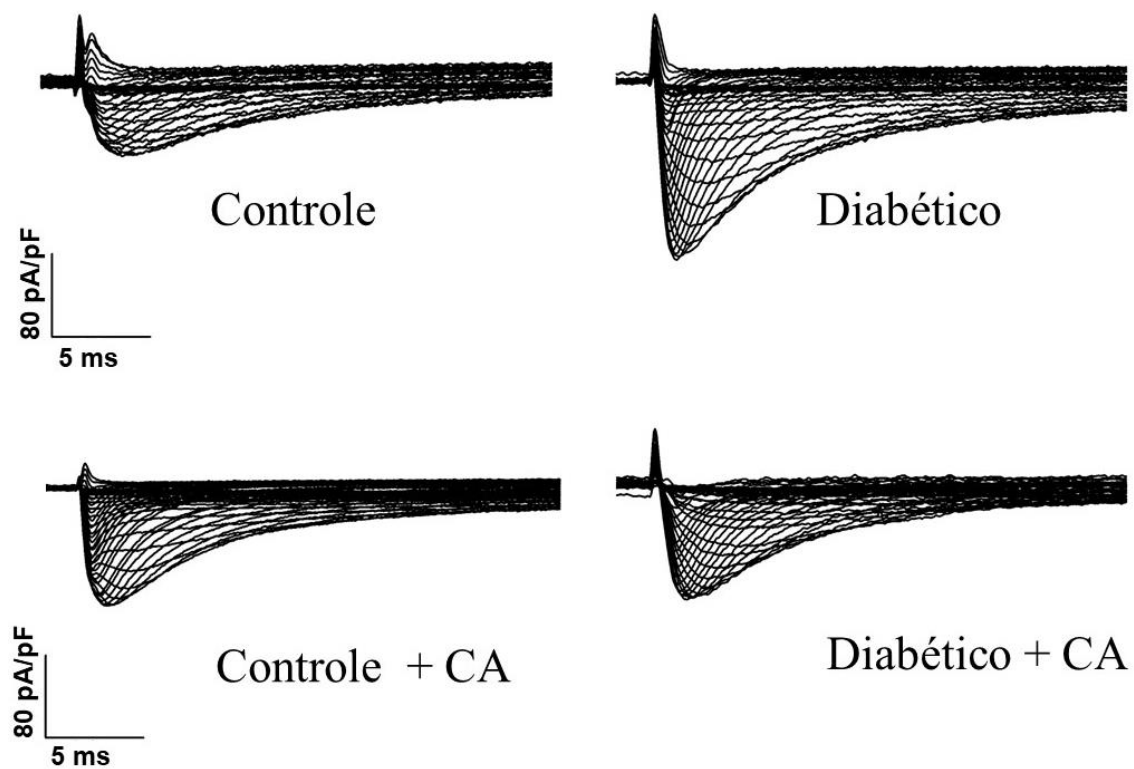


FIGURA 22– Traçados representativos das densidades da corrente total de Na^+ deflagradas pelo estabelecimento dos diferentes potenciais de membrana utilizados para confecção dos gráficos da relação I-V.

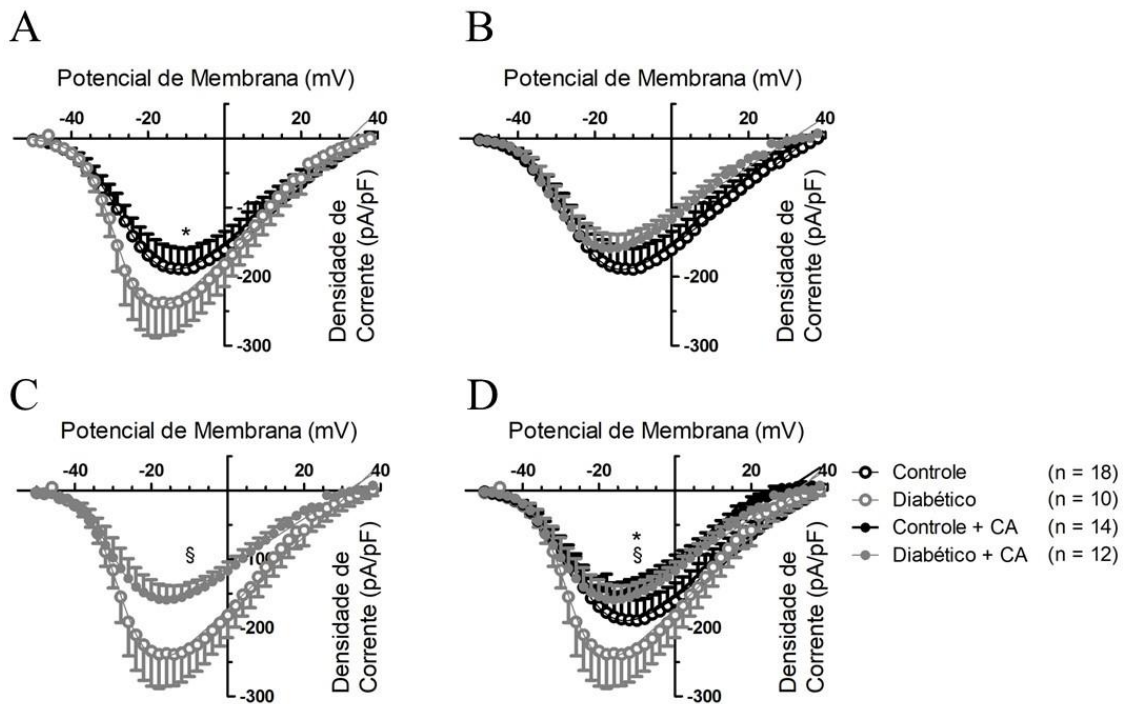


FIGURA 23– Comparativo da relação I-V entre os grupos estudados. A. Controle vs Diabético. B. Controle vs Diabético + CA. C. Diabético vs Diabético + CA. D. Todos os grupos estudados. Pico das correntes adotado em -10 mV. * Controle vs Diabético; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

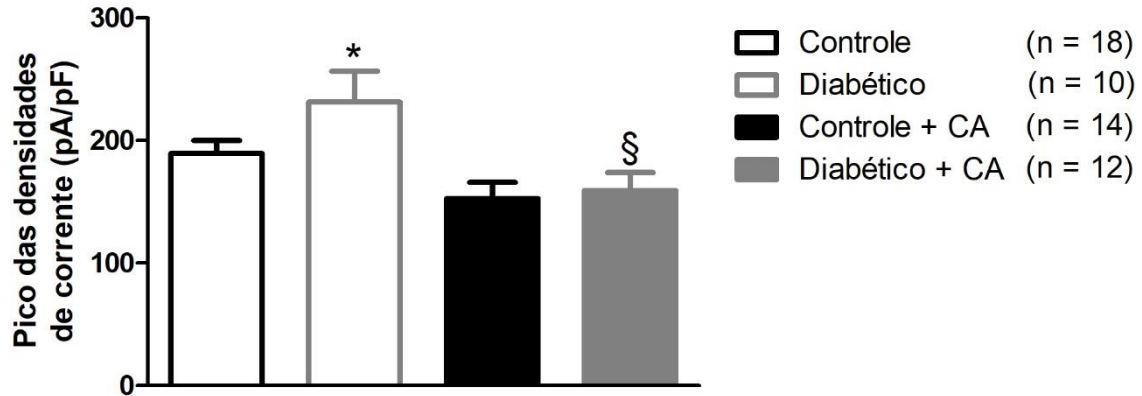


FIGURA 24– Comparativo dos valores de pico da densidade de corrente da relação I-V entre os grupos estudados. Pico das correntes adotado em -10 mV. * Controle vs Diabético; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.4 Diabetes desloca para valores mais negativos a curva de ativação estacionária dos canais de Na⁺, efeito atenuado pelo tratamento com o Composto A

Tanto o quadro diabético quanto o tratamento com o Composto A tiveram efeito sobre a curva de condutância normalizada (figura 25A e D). O $V_{1/2}$ (figura 26) mostra que o potencial de membrana que ativa metade da população de canais de sódio disponíveis em neurônios do grupo diabético é menos despolarizado que àquele do grupo controle. Nota-se, ainda, que neurônios do grupo Diabético + CA apresenta um valor de $V_{1/2}$ entre os valores do grupo Controle e Diabético. Na tabela 1 estão expressos os valores de k, ou seja, da inclinação das curvas de condutância normalizada, da figura 25.

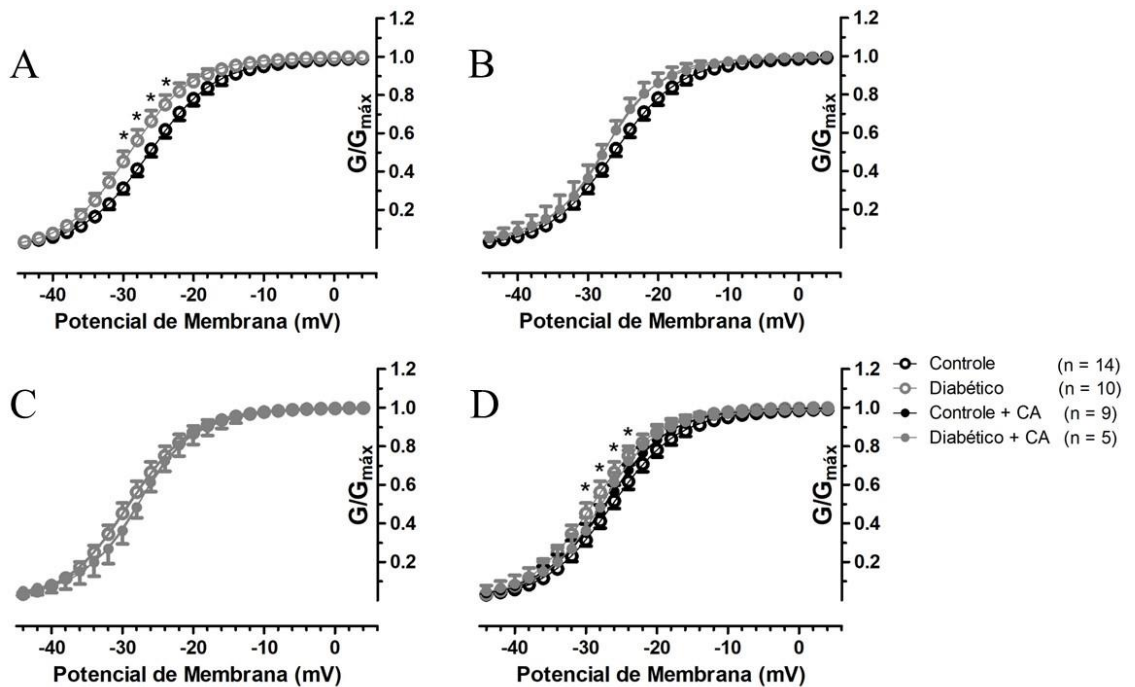


FIGURA 25– Relação entre a condutância normalizada e os diferentes potenciais de membrana utilizados, resultando na curva de ativação estacionária da corrente total de sódio. A. Controle vs Diabético. B. Controle vs Diabético + CA. C. Diabético vs Diabético + CA. D. Todos os grupos estudados. * Controle vs Diabético, $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

Grupo	k (mV)	N
Controle	$4,8 \pm 0,2$	14
Diabético	$4,6 \pm 0,3$	10
Controle + CA	$4,6 \pm 0,2$	9
Diabético + CA	$4,1 \pm 0,3$	5

TABELA 1 – Valores da inclinação das curvas de ativação estacionária da corrente total de sódio nos grupos Controle, Diabético, Controle + CA e Diabético + CA. $p > 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

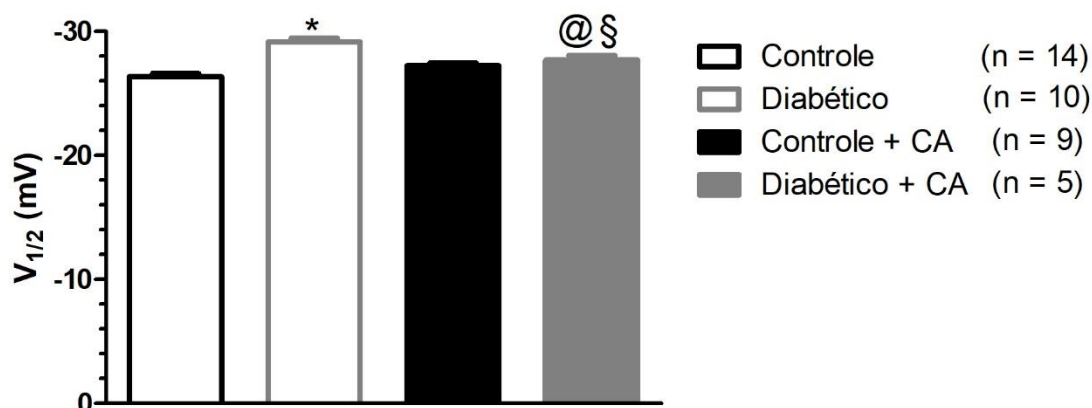


FIGURA 26– Representação dos valores de potencial de membrana onde se observa 50% da ativação da corrente total de sódio ($V_{1/2}$). * Controle vs Diabético; @ Controle vs Diabético + CA, § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.5 Composto A previne o aumento da concentração sérica de TNF resultante da hiperglicemia crônica

O teste de Elisa acusou que os ratos diabéticos apresentaram elevação da concentração sérica de TNF, fato prevenido pelo tratamento crônico com o Composto A (figura 27).

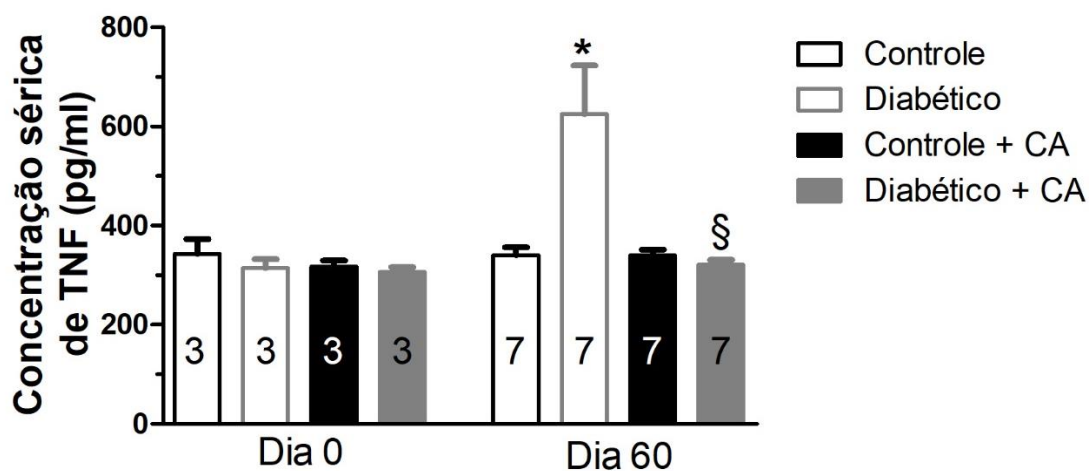


FIGURA 27– Dosagem de TNF sérico dos diferentes grupos estudados, antes da indução ao diabetes e após 60 dias da indução. * Controle vs Diabético; § Diabético vs Diabético + CA, $p < 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.6 Proteína CRMP2 não parece constituir a via de sinalização entre a elevação de TNF plasmático e o aumento da densidade de corrente total de sódio.

5.6.1 Transfecção de neurônios do DRG pelo uso de adenovírus AVV5 é viável

O método de transfecção dos neurônios do DRG pelo uso do adenovírus recombinante AAV5 mostrou-se bastante eficaz (figura 28). A adição da proteína GFP como marcador dos plasmídeos para as proteínas CRMP2-WT e CRMP2-K374A confirma que a transfecção é viável. Além disso, o desenvolvimento de densa rede neural pelos neurônios em cultura (figuras 28C e D) sinaliza para uma cultura neuronal saudável, indicando que este método não gera grande toxicidade celular.

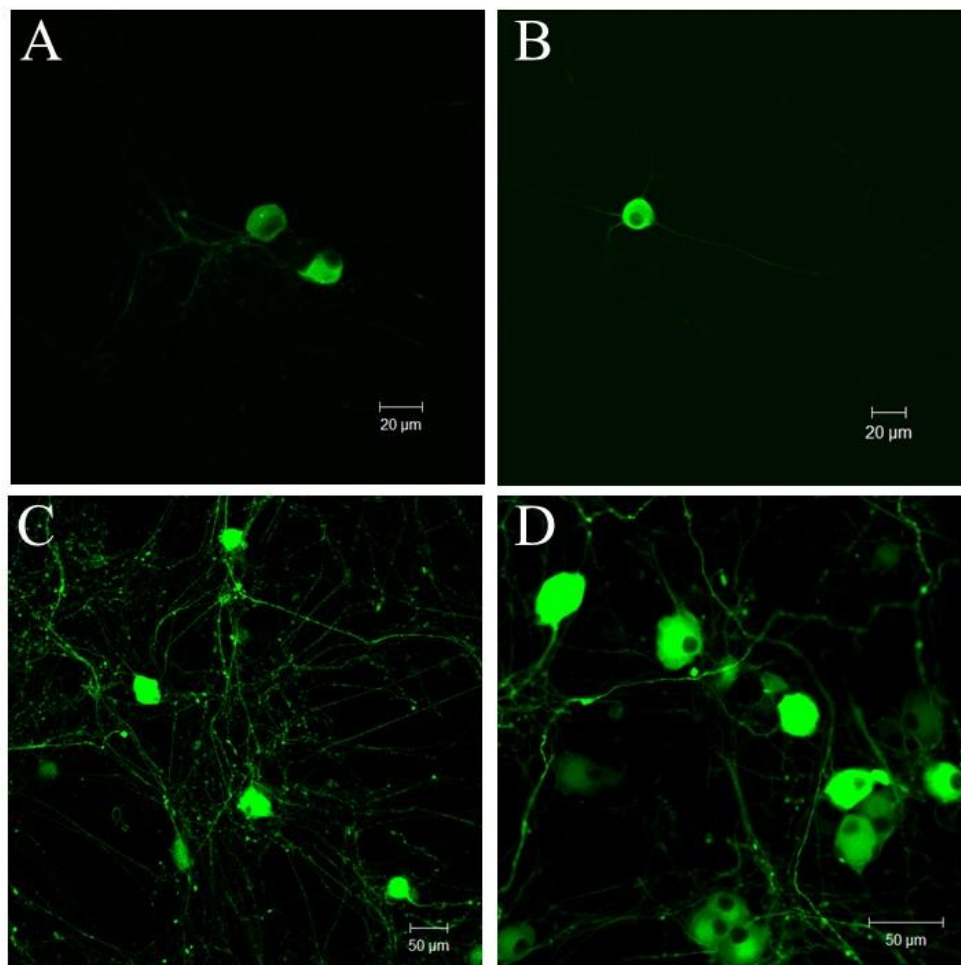


FIGURA 28– Imagens de microscopia confocal de neurônios isolados do DRG mantidos por duas semanas em cultura. A. Enfoque no corpo celular de um neurônio expressando CRMP2-WT-GFP. B. Enfoque no corpo celular de um neurônio expressando CRMP2-K374A-GFP. C e D. Enfoque na densa rede de axônios desenvolvida ao longo das duas semanas na cultura de células transfectadas com CRMP2-WT-GFP e CRMP2-K374A-GFP, respectivamente.

5.6.2 Via de sinalização do TNF para aumento da expressão de Nav 1.7 provavelmente independente da proteína CRMP2

Ainda que se tenha observado redução da corrente total de sódio em neurônios do DRG expressando a proteína mutacionada CRMP2-K374A (figuras 29D, 30C e 31), devido à redução da expressão de canal de sódio Na_v 1.7, a exposição do neurônio ao TNF ainda resultou em aumento da corrente de sódio (figura 29E e 30F e 31), indicando que a via de sinalização do TNF para o aumento da expressão deste canal iônico provavelmente independente da ação da proteína CRMP2. Além disso, os grupos estudados não mostraram indução de alteração da curva de dependência de voltagem pela exposição ao TNF (figura 32). Na tabela 2 estão expressos os valores de k da figura 32.

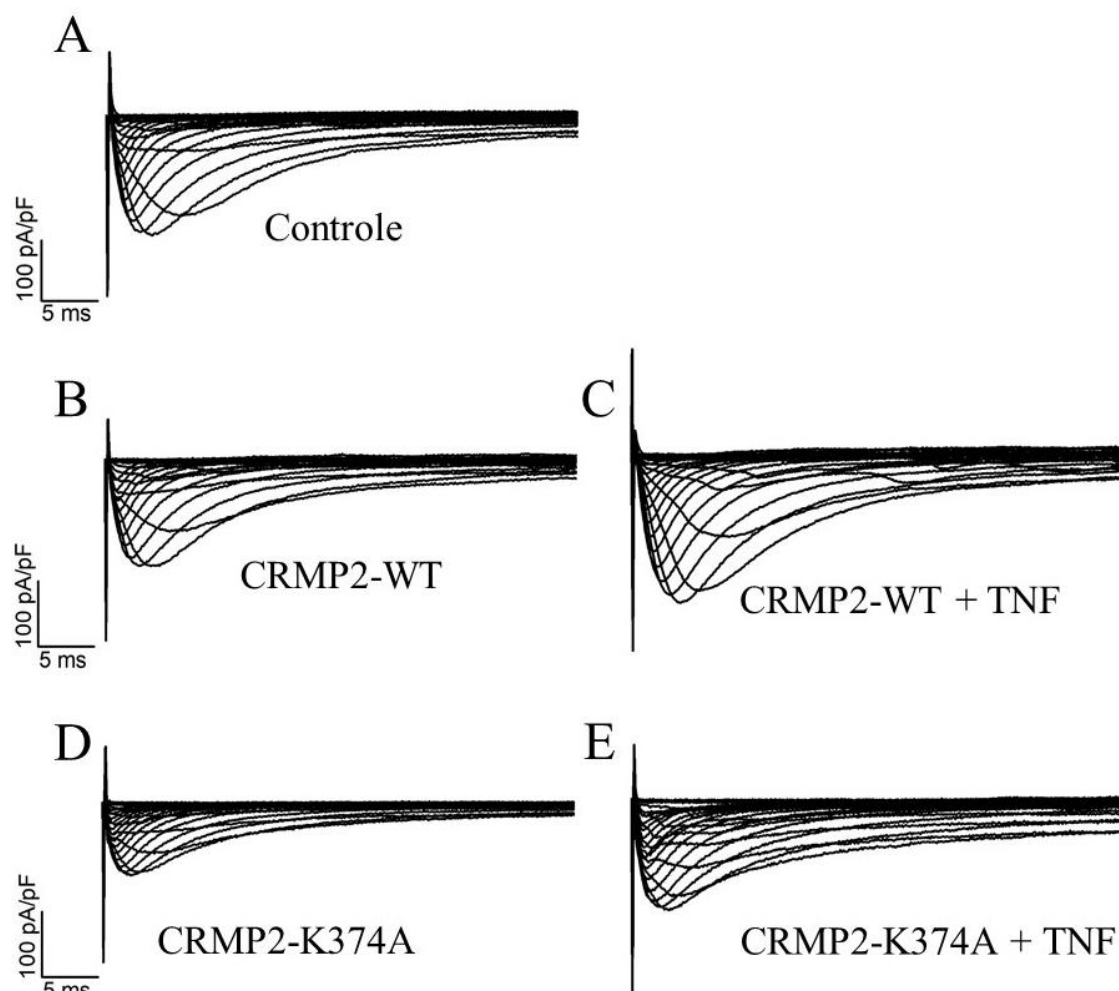


FIGURA 29– Traçados representativos das densidades da corrente total de Na^+ deflagradas pelo estabelecimento dos diferentes potenciais de membrana utilizados para confecção dos gráficos da relação I-V. A. Neurônio não transfectados. B. Neurônio transfectado com o plasmídeo para a proteína CRMP2 WT. D. Neurônio transfectado com o plasmídeo para a proteína CRMP2-K374A. Após 6 horas da adição de 700 pg/ml de TNF, se verificou um aumento da corrente total de sódio nos neurônios transfectados com os dois plasmídeos (C e E).

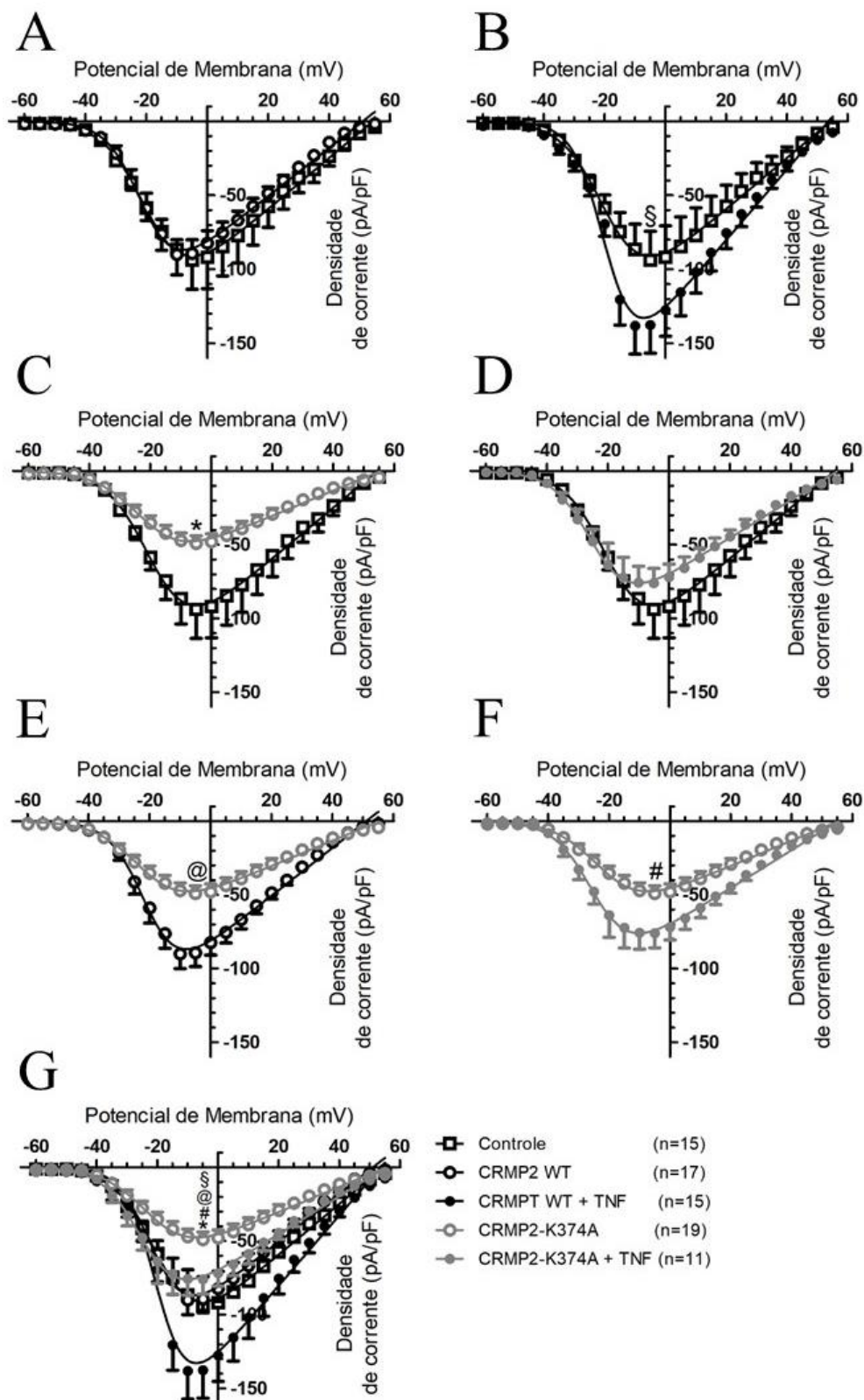


FIGURA 30- Comparativo da relação I-V entre os grupos estudados. A. x. B. Controle vs CRMP2 WT + TNF. C. Controle vs CRMP2-K374A. D. Controle vs CRMP2-K374A + TNF. E. CRMP2 WT vs CRMP2-K374A. F. CRMP2-K374A vs CRMP2-K374A + TNF. G. Todos os grupos estudados. Pico das correntes adotado em -5 mV. § Controle vs CRMP2 WT + TNF; * Controle vs CRMP2-K374A; @ CRMP2 WT vs CRMP2-K374A; # CRMP2-K374A vs CRMP2-K374A + TNF. $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

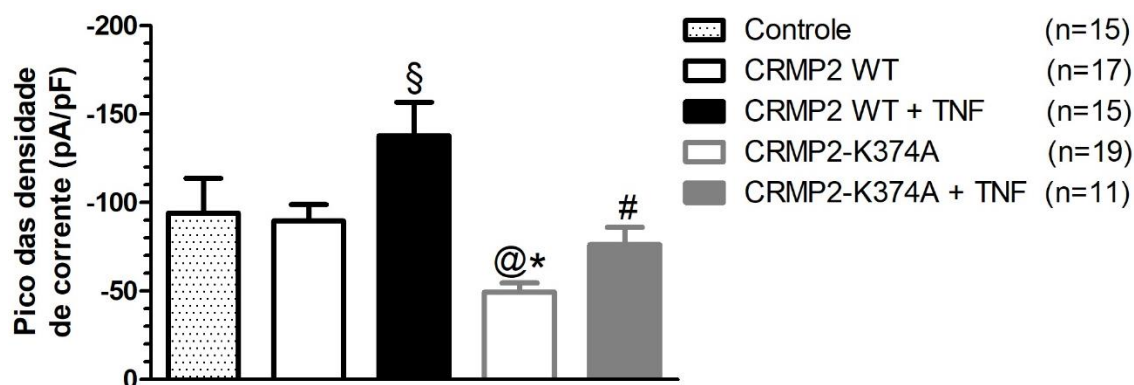


FIGURA 31– Comparativo dos valores de pico da densidade de corrente da relação I-V entre os grupos estudados. Pico das correntes adotado em -5 mV. § Controle vs CRMP2 WT + TNF; * Controle vs CRMP2-K374A; @ CRMP2 WT vs CRMP2-K374A; # CRMP2-K374A vs CRMP2-K374A + TNF., $p < 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

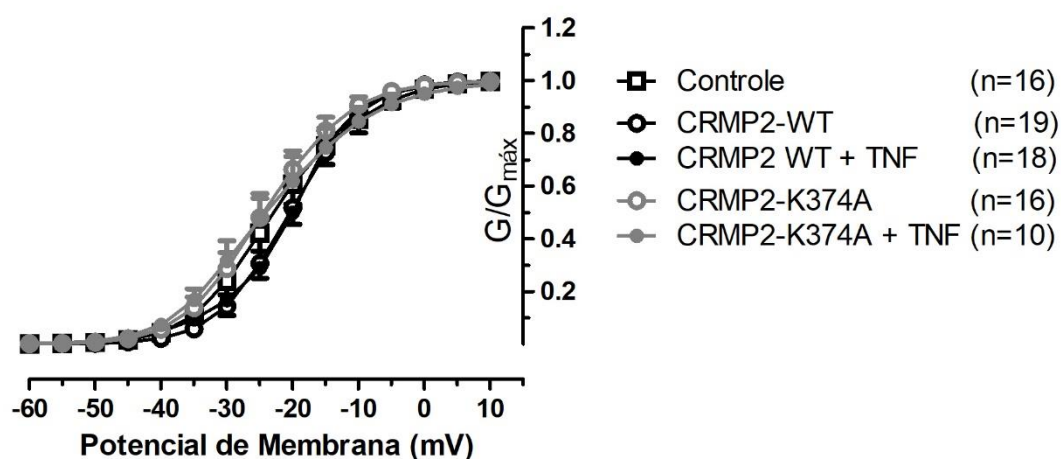


FIGURA 32- Relação entre a condutância normalizada e os diferentes potenciais de membrana utilizados, resultando na curva de ativação estacionária da corrente total de sódio.

Grupo	k (mV)	N
Controle	6,2 ± 0,6	16
CRMP2-WT	6,6 ± 0,7	19
CRMP2-WT + TNF	7,7 ± 1,1	18
CRMP2-K374A	5,4 ± 0,4	16
CRMP2-K374A + TNF	5,3 ± 0,5	10

TABELA 2- Valores da inclinação das curvas de ativação estacionária da corrente total de sódio nos grupos Controle, CRMP2-WT, CRMP2-WT + TNF, CRMP2-K374A e CRMP2-K374A + TNF. $p > 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.7 Exposição aguda ao TNF altera parâmetros da eletrofisiologia celular na corrente de sódio via canais sensíveis e resistentes à TTX

5.7.1 Exposição aguda de TNF aumenta corrente de sódio via canais sensíveis e resistentes à TTX

Utilizando-se de TTX para separar as correntes de sódio provenientes de canais sensíveis e resistentes a este (figura 33A-C), pôde-se notar que o TNF aumenta a corrente de sódio pelas duas populações de canais (figura 33D-F). É possível notar que o aumento da densidade da corrente total de sódio (figura 34A e figura 35) tem maior contribuição dos canais sensíveis a TTX (figura 34B e figura 35) do que da corrente via canais resistentes à TTX (figura 34C e figura 35).

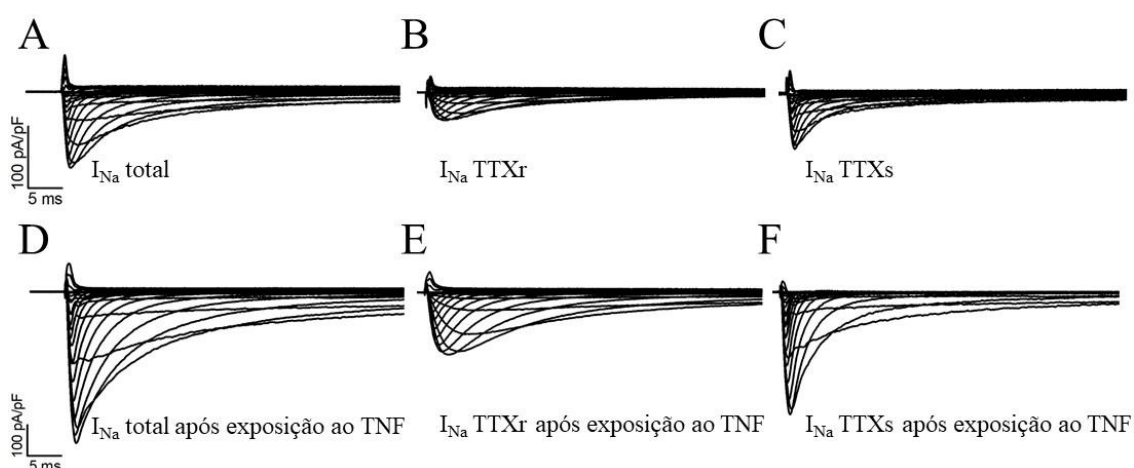


FIGURA 33– Traçados representativos das densidades da corrente total de Na⁺ deflagradas pelo estabelecimento dos diferentes potenciais de membrana utilizados para confecção dos gráficos da relação I-V. A. Corrente total de sódio. B. Corrente de sódio após adição de 300 nM de TTX, ou seja, corrente de sódio TTXr (resistente à TTX). C. Corrente de sódio resultante após subtração da corrente TTXr da corrente total de sódio, ou corrente de sódio TTXs (sensível à TTX). D, E e F são reproduções das correntes registradas em A, B e C após exposição, por 6 horas, ao TNF na concentração de 700 pg/ml.

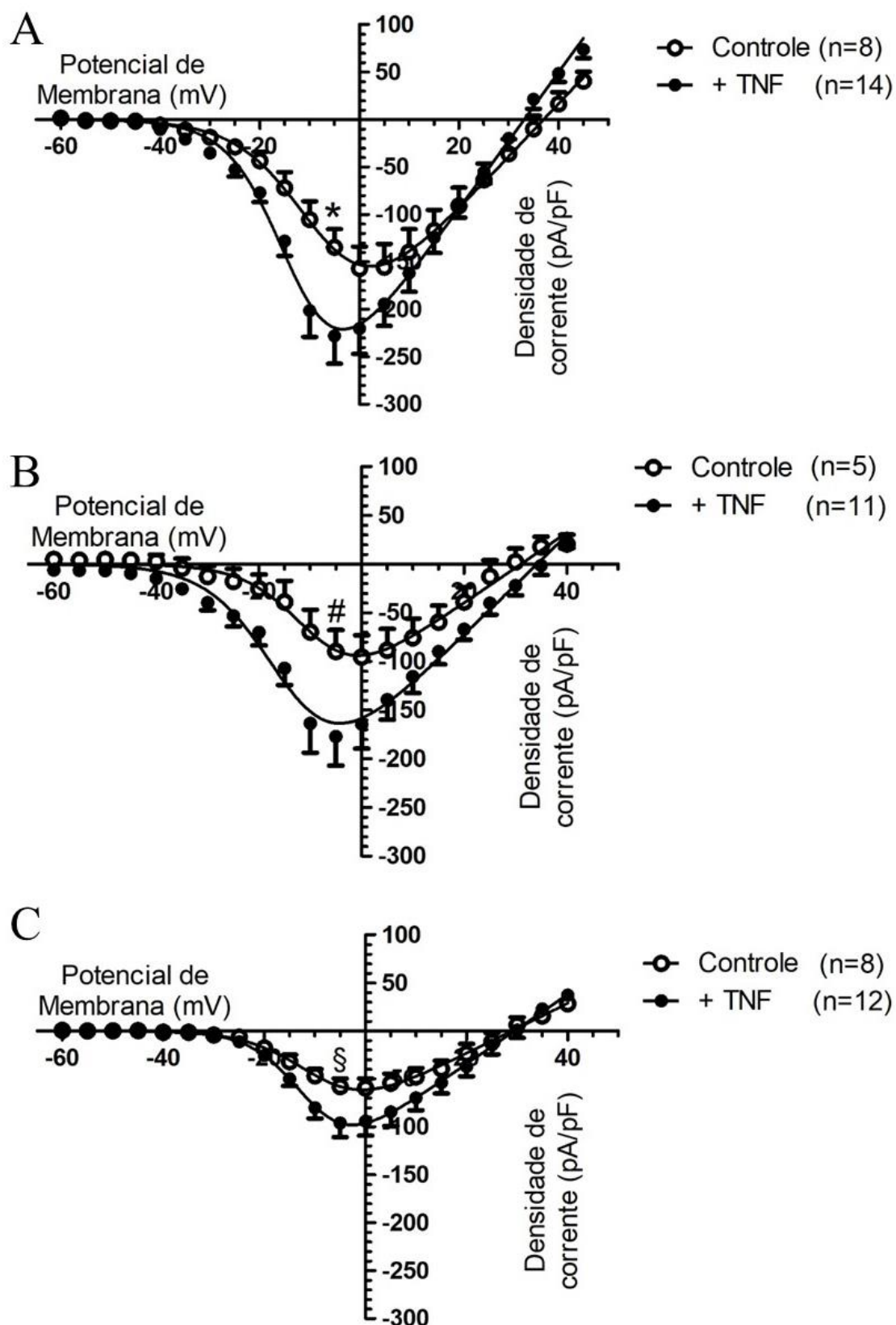


FIGURA 34– Comparativo da relação I-V entre os grupos estudados. A. Corrente total de sódio sem exposição vs pós exposição ao TNF. B. Corrente de sódio TTXs sem exposição vs pós exposição ao TNF. C. Corrente de sódio TTXr sem exposição vs pós exposição ao TNF. Comparações realizadas sob o potencial de membrana de -5 mV. * Corrente total de sódio sem exposição vs Corrente total de sódio pós exposição ao TNF; # Corrente de sódio TTXs sem exposição vs corrente de sódio TTXs pós exposição ao TNF. § Corrente de sódio TTXr sem exposição vs corrente de sódio TTXr pós exposição ao TNF $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

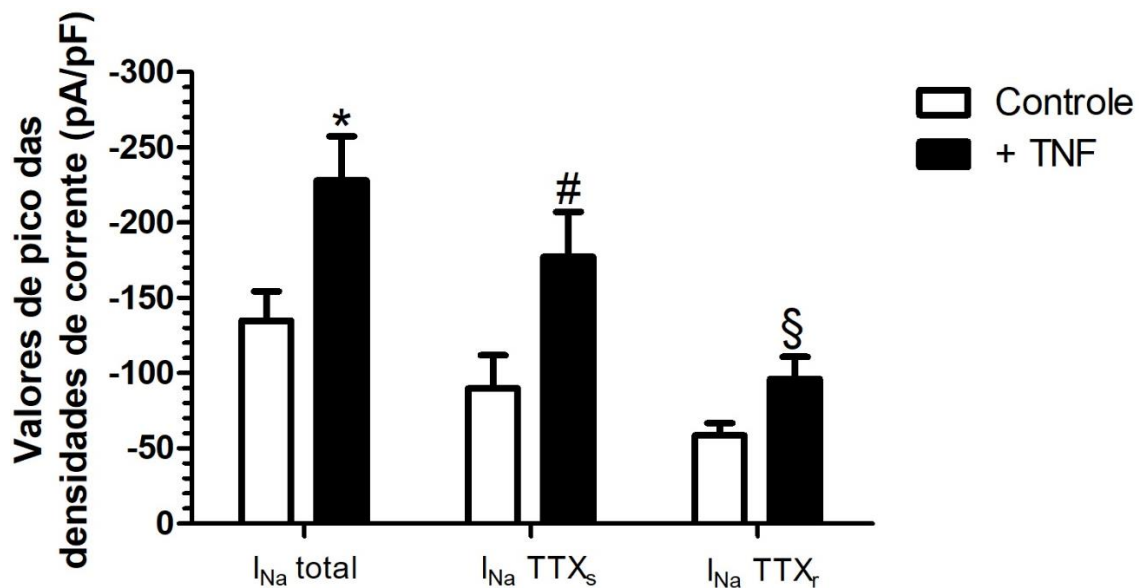


FIGURA 35- Comparativo dos valores de pico da densidade de corrente da relação I-V entre os grupos estudados, no potencial de membrana de -5 mV. * Corrente total de sódio sem exposição vs Corrente total de sódio pós exposição ao TNF; # Corrente de sódio TTXs sem exposição vs corrente de sódio TTXs pós exposição ao TNF. § Corrente de sódio TTXr sem exposição vs corrente de sódio TTXr pós exposição ao TNF $p < 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.7.2 TNF altera dependência de voltagem para ativação dos canais de sódio sensíveis à TTX

Conforme visualizado de modo menos evidente nos neurônios dos ratos diabéticos (figuras 25A e 26), a exposição dos neurônios ao TNF desloca a curva de dependência de voltagem para ativação estacionária para valores mais negativos, ou seja, torna os neurônios mais sensíveis a despolarização (figura 36A). A separação das correntes TTXs e TTXr mostra efeitos diferentes do TNF sobre estas populações de canais: ao passo que a corrente TTXs se torna mais sensível a despolarizações de membrana (figura 36B), isto não se verifica na corrente TTXr (figura 36C), ainda que ambas as correntes aumentem (figura 34 e 35). A análise do $V_{1/2}$ (figura 37) mostra que o TNF facilita o recrutamento de canais TTXs disponíveis (figura 36B), ou seja, após exposição ao TNF, o potencial de membrana necessário para ativar metade desta população de canais é mais despolarizado do que quando estes não foram expostos ao TNF. O mesmo, como já mencionado, não ocorre com os canais TTXr (figura 36C e 37). Na tabela 3 estão expressos os valores de k da figura 36.

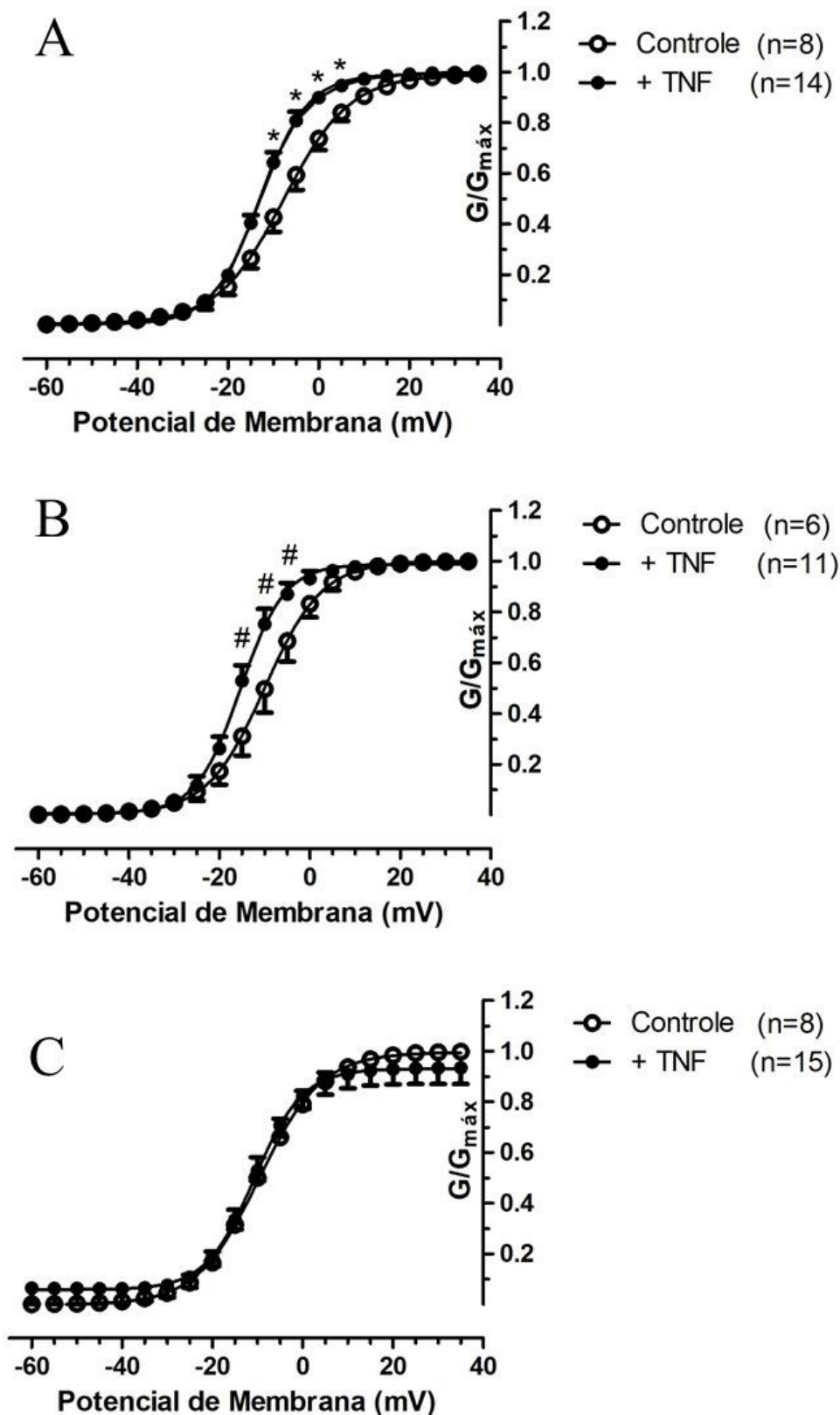


FIGURA 36– Relação entre a condutância normalizada e os diferentes potenciais de membrana utilizados, resultando na curva de ativação estacionária das correntes de sódio total, TTXr e TTXs. A. Corrente total de sódio sem exposição vs pós exposição ao TNF. B. Corrente de sódio TTXs sem exposição vs pós exposição ao TNF. C. Corrente de sódio TTXr sem exposição vs pós exposição ao TNF * Corrente total de sódio sem exposição vs Corrente total de sódio pós exposição ao TNF; # Corrente de sódio TTXs sem exposição vs corrente de sódio TTXs pós exposição ao TNF. $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

Grupo		k (mV)	N
Controle	- Ina total	7,3 ± 0,5	8
+ TNF	- Ina total	5,3 ± 0,2 *	14
Controle	- Ina TTXs	6,3 ± 0,6	6
+ TNF	- Ina TTXs	4,9 ± 0,3 #	11
Controle	- Ina TTXr	6,9 ± 0,5	8
+ TNF	- Ina TTXr	5,4 ± 0,8	15

TABELA 3- Valores da inclinação das curvas de ativação estacionária da corrente de sódio total, sensível e resistente a TTX sem exposição ou após exposição ao TNF. Ina representa corrente de sódio. * $p < 0,05$ + TNF – Ina total vs Controle - Ina total; # $p < 0,05$ + TNF – Ina TTXs vs Controle - Ina TTXs; teste t de Student.

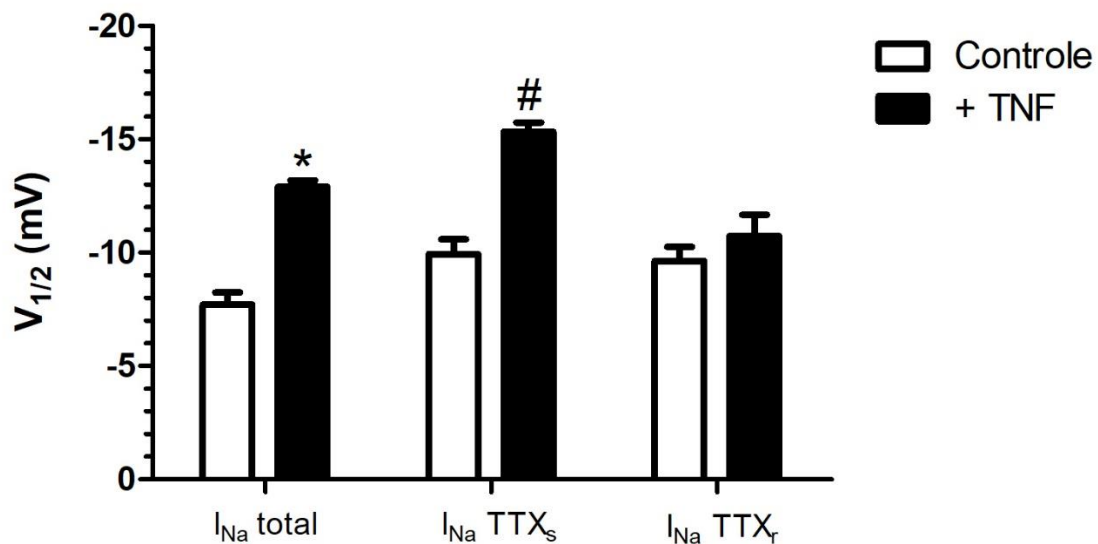


FIGURA 37– Representação dos valores de potencial de membrana onde se observa 50% da ativação da corrente total de sódio. * Corrente total de sódio sem exposição vs Corrente total de sódio pós exposição ao TNF; # Corrente de sódio TTXs sem exposição vs corrente de sódio TTXs pós exposição ao TNF. $p < 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.7.3 TNF influencia cinética de inativação rápida estacionária dos canais de sódio sensíveis a TTX

Além de sensibilizar os canais de sódio TTXs a se ativarem em potenciais mais negativos, o TNF também parece influenciar a inativação estacionária rápida desta população de canais. Como pode ser visto no gráfico da relação $I/I_{\text{máx}}$, (h_{∞} , figura 38), pré-pulsos menos despolarizados inativam uma maior parcela dos canais de sódio antes disponível, quando comparado à neurônios não expostos ao TNF (figura 38A). Porém,

quando analisadas isoladamente, as correntes TTXs e TTXr não apresentaram diferença estatística com relação à curva de inativação rápida estacionária do grupo controle (figura 38B e 38C, respectivamente). Porém, na análise do V_h (figura 39), o potencial de membrana do pré-pulso que inativa metade da população de canais antes disponível, mostra que os canais TTXs apresentam valor de V_h mais negativo após exposição ao TNF. O mesmo não foi observado para os canais TTXr. Na tabela 4 estão expressos os valores de k_h , a inclinação da curva de inativação rápida estacionária, da figura 38.

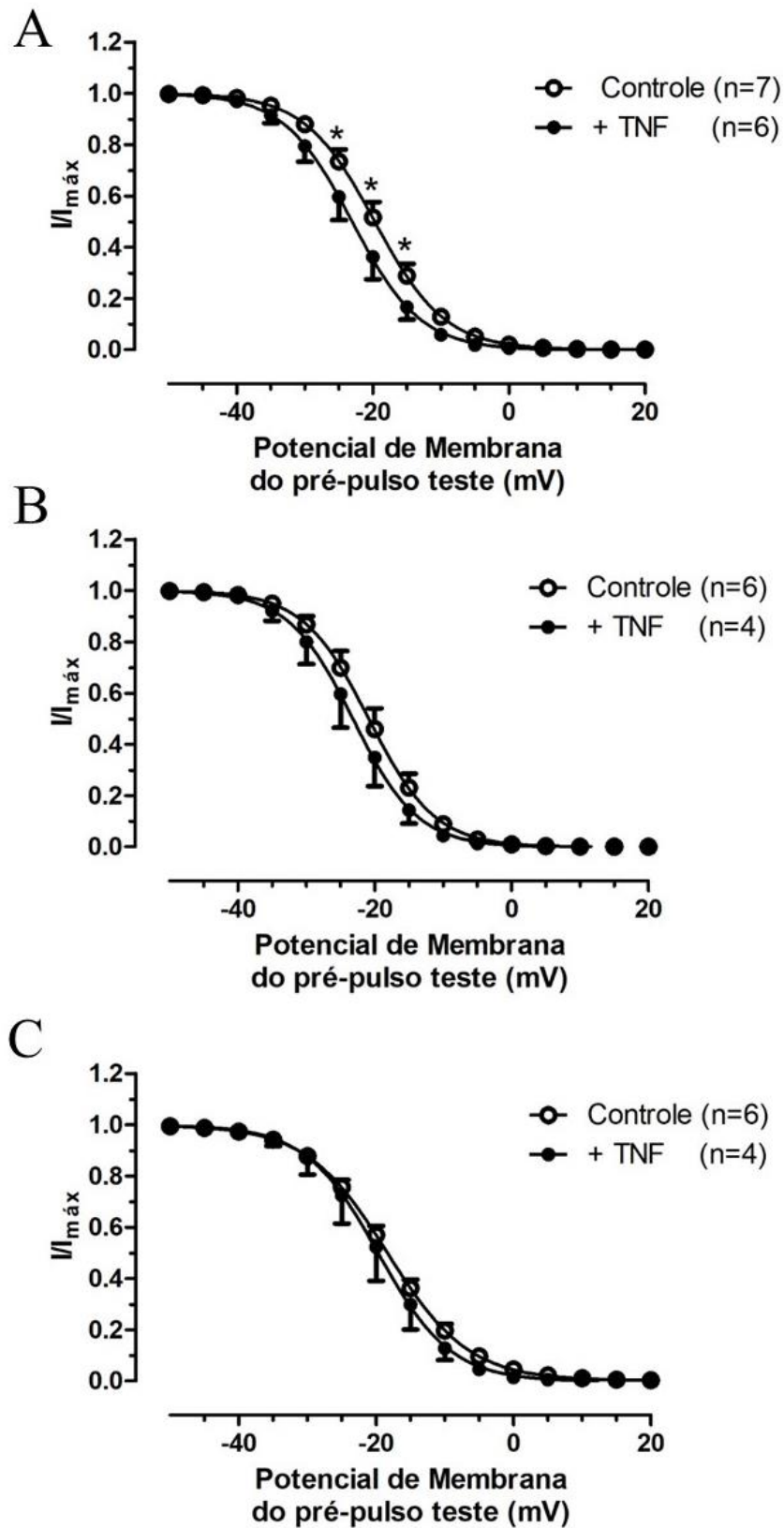


FIGURA 38 – Relação entre a corrente normalizada e os diferentes potenciais de membrana utilizados, resultando na curva de inativação estacionária das correntes de sódio total, TTXr e TTXs. A. Corrente total de sódio sem exposição vs pós exposição ao TNF. B. Corrente de sódio TTXs sem exposição vs pós exposição ao TNF. C. Corrente de sódio TTXr sem exposição vs pós exposição ao TNF. * Corrente total de sódio sem exposição vs Corrente total de sódio pós exposição ao TNF. $p < 0,05$; Two Way ANOVA seguido de Bonferroni.

Grupo		k (mV)	N
Controle	- Ina total	-7,3 ± 0,5	8
+ TNF	- Ina total	-5,3 ± 0,2 *	14
Controle	- Ina TTXs	- 6,3 ± 0,6	6
+ TNF	- Ina TTXs	- 4,9 ± 0,3 #	11
Controle	- Ina TTXr	- 6,9 ± 0,5	8
+ TNF	- Ina TTXr	- 5,4 ± 0,8	15

TABELA 4- Valores da inclinação das curvas de inativação estacionária rápida da corrente de sódio total, sensível e resistente a TTX sem exposição ou após exposição ao TNF. Ina representa corrente de sódio. * $p < 0,05$ + TNF – Ina total vs Controle - Ina total; # $p < 0,05$ + TNF – Ina TTXs vs Controle - Ina TTXs; teste t de Student.

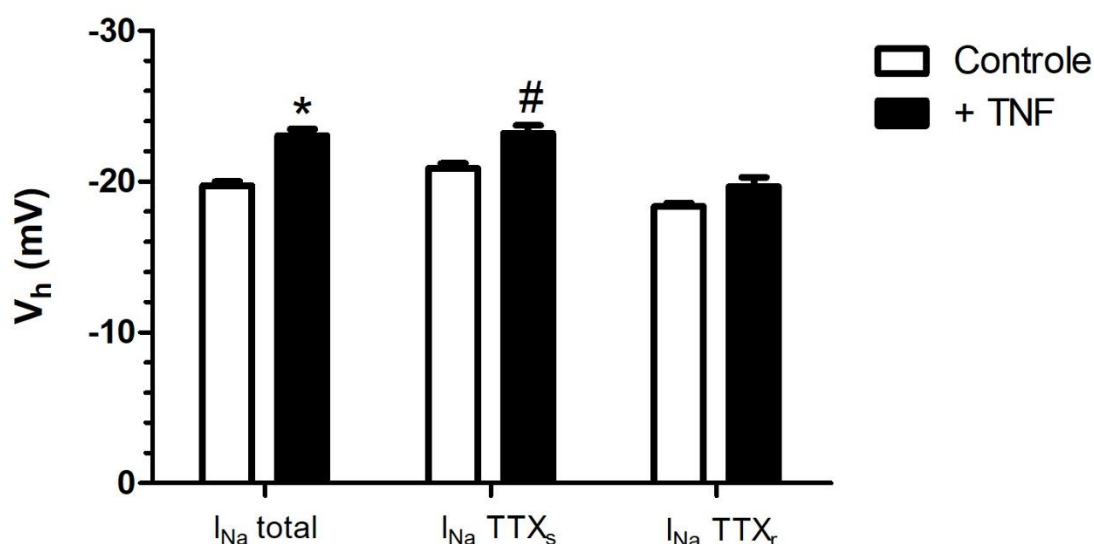


FIGURA 39– Representação dos valores de potencial de membrana do pulso condicionante que inativam metade da população de canais de sódio disponível. * Corrente total de sódio sem exposição vs Corrente total de sódio pós exposição ao TNF; # Corrente de sódio TTXs sem exposição vs corrente de sódio TTXs pós exposição ao TNF. $p < 0,05$; One Way ANOVA seguido de Bonferroni.

5.7.4 TNF induz efeitos opostos sobre a probabilidade de ativação das correntes TTXs e TTXr

Os gráficos a seguir destacam a importância da corrente de sódio conduzida pelos canais $Na_v 1.8$ no mecanismo de ação da sensibilização do neurônio por ação do TNF. O gráfico das sobreposições das curvas de ativação e inativação (figura 40) resulta no gráfico da figura 41, ilustrando que a corrente TTXs tem sua corrente de janela deslocada para valores mais hiperpolarizados e com maior amplitude após exposição ao TNF (B).

A corrente TTX, por sua vez, sofre redução tanto estreitamento da sua corrente de janela quanto redução da sua amplitude, após exposição ao TNF (C). No somatório dos efeitos do TNF sobre as duas correntes, a corrente de janela da corrente total de sódio se encontra reduzida após exposição ao TNF, quando comparada ao grupo controle (A).

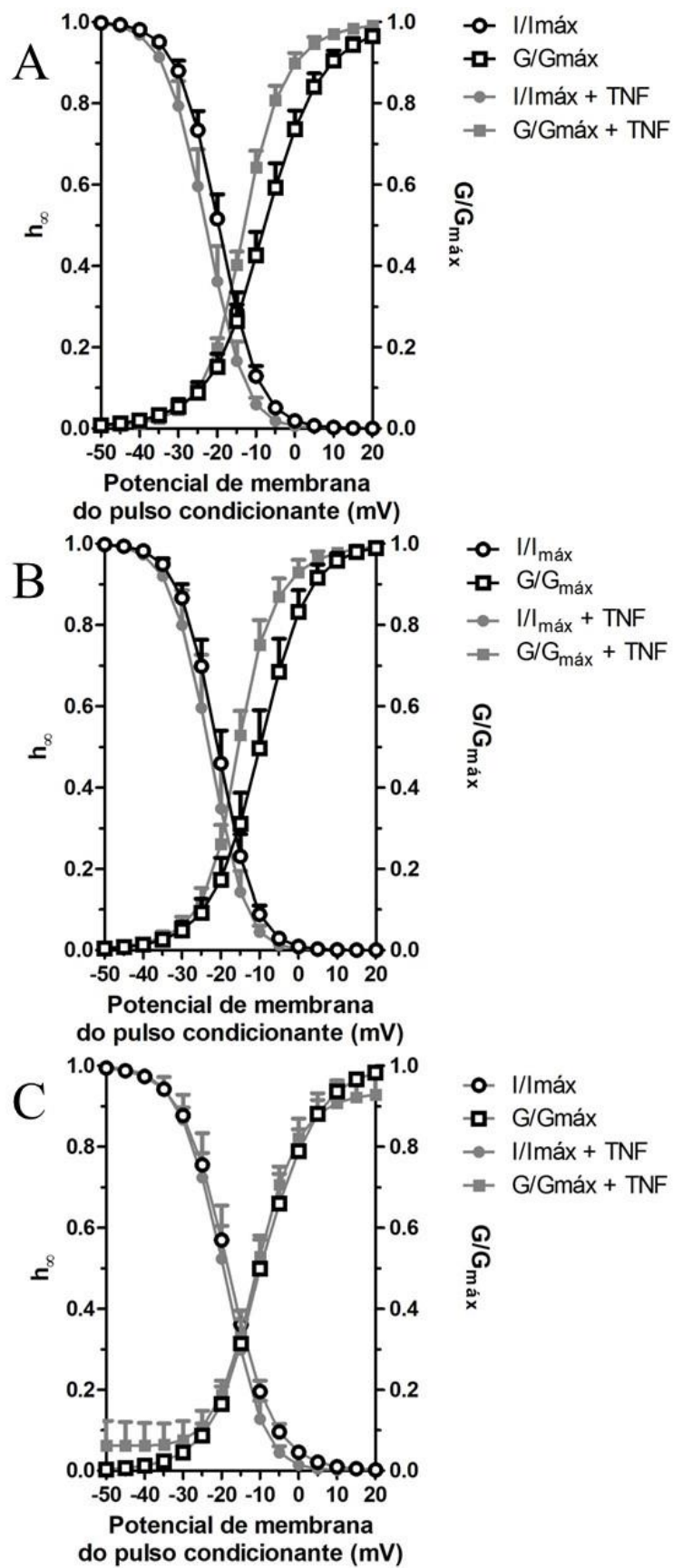


FIGURA 40– Sobreposição das curvas de ativação dos canais de sódio no estado estacionário e inativação rápida estacionária. A. Corrente total de sódio sem exposição vs pós exposição ao TNF. B. Corrente de sódio TTXs sem exposição vs pós exposição ao TNF. C. Corrente de sódio TTXr sem exposição vs pós exposição ao TNF.

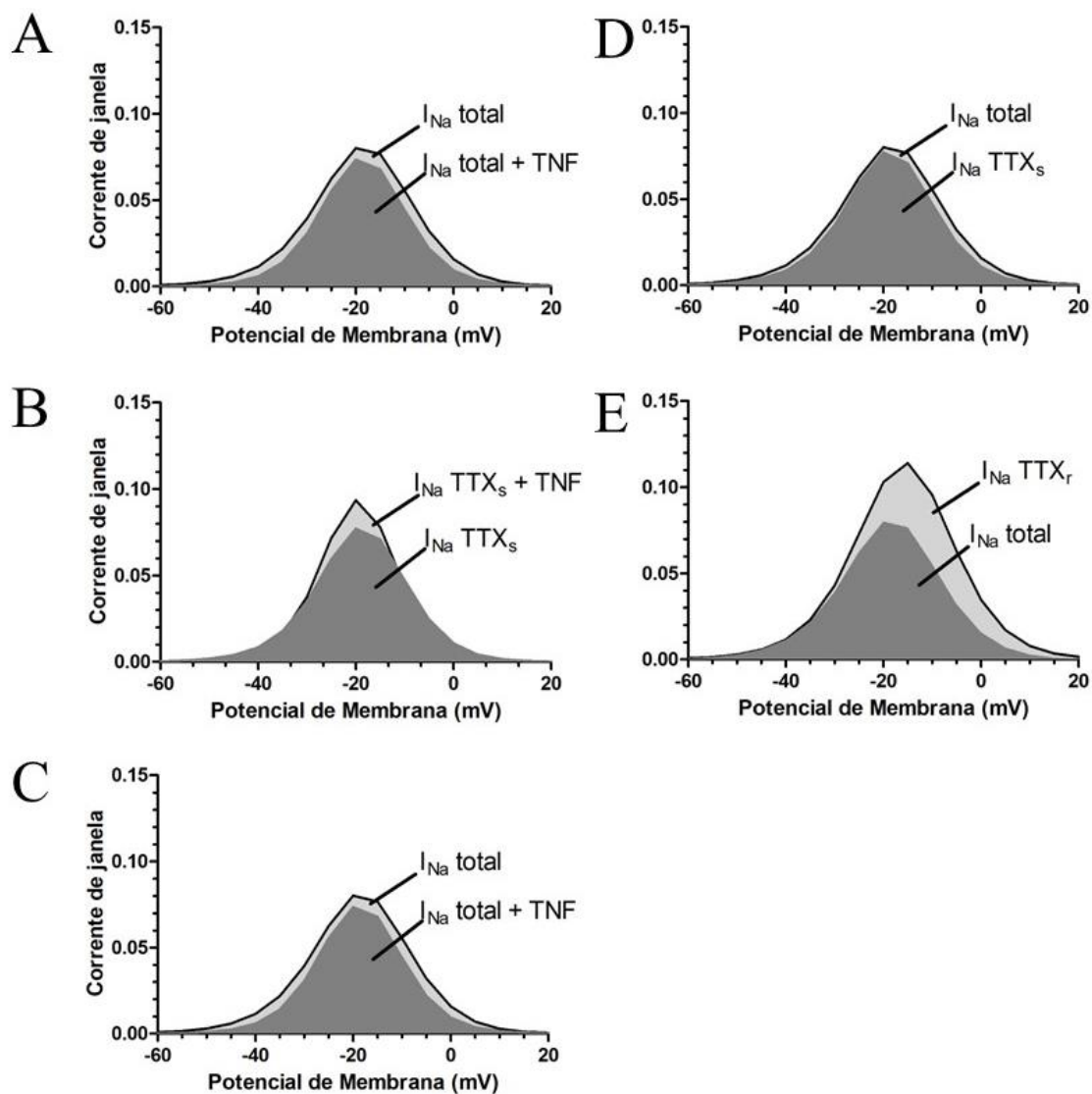


FIGURA 41– Representação da probabilidade de se ter corrente de sódio sustentada nos diferentes potenciais de membrana estudados (corrente de janela). A. Corrente total de sódio sem exposição vs pós exposição ao TNF. B. Corrente de sódio TTX_s sem exposição vs pós exposição ao TNF. C. Corrente de sódio TTX_r sem exposição vs pós exposição ao TNF.

6. DISCUSSÃO

Como primeiro dado deste trabalho (figura 14) tem-se o estabelecimento da hiperglicemia nos ratos dos grupos Diabético e Diabético + CA, os quais receberam STZ intraperitoneal. A STZ é um análogo da glicose (2-deoxi-2-[3-metil-e-nitrosourido]-D-glucopiranosose que foi inicialmente extraído como antibiótico isolado de culturas de *Streptomyces acromogenes* (HERR *et al.*, 1959-1960). Sua ação diabetogênica, descoberta por Rakieta, Rakieta e Nadkarni (1963), é especificamente citotóxica sobre as células β pancreáticas (JUNOD *et al.*, 1967). A STZ obtém acesso às células β pelo GLUT 2, causando fragmentação do DNA e estresse oxidativo, no que resulta uma morte celular rápida (SCHNEDL *et al.*, 1994; THULESEN *et al.*, 1997). Como resultado, os ratos que recebem administração de STZ com concentração igual ou superior a 65 mg/kg apresentam hiperglicemia sustentada (JUNOD *et al.*, 1969) como visto na figura 14, mimetizando o que ocorre com pacientes acometidos pelo diabetes tipo I (THULESEN *et al.*, 1997; OZAWA *et al.*, 2011). O método de indução ao diabetes usado neste trabalho, no qual o rato tem 28 dias de vida no dia da indução, é fundamentado em um modelo já bem estabelecido na literatura (SHUTOV *et al.*, 2006; KHOMULA *et al.*, 2013).

O gráfico do curso temporal da glicemia na figura 14 também mostra que o tratamento dos ratos diabéticos com o Composto A não exerce qualquer influência sobre a hiperglicemia destes ratos. Este dado traz como consequência o fato de que, caso o Composto A exerça alguma ação de proteção contra o desenvolvimento da DND, seu mecanismo de ação independe da manutenção dos valores hiperglicêmicos para normoglicêmicos.

Os ratos do grupo Diabético também apresentaram comprometimento do ganho de massa corpórea, no curso temporal dos 60 dias (figura 15), quando comparados ao grupo Controle. Este resultado está em concordância com a literatura, ocorrendo devido a excessiva degradação de proteínas teciduais que passam a constituir uma rota metabólica alternativa (LEE *et al.*, 1999; ANDALLU; VARADACHARYULU, 2003; YANARDAG *et al.*, 2005). No entanto, enquanto o Composto A não alterou a hiperglicemia nos ratos diabéticos, ele compromete ainda mais o ganho de massa corpórea destes ratos. A redução do ganho de massa corpórea também ocorre nos ratos do grupo Controle + CA, quando comparado ao grupo Controle. Tal fato pode constituir um efeito colateral do tratamento com o Composto A.

Ainda que os ratos diabéticos apresentem redução no seu ganho de massa corpórea, pode-se notar na figura 16 que, na verdade, estes ratos têm aumentada a sua ingestão de ração em comparação com os ratos do grupo Controle. De fato, este dado enfatiza o desenvolvimento de um sintoma comum aos pacientes diabéticos, a polifagia, decorrente do nível reduzido de insulina em indivíduos portadores de diabetes tipo 1 (KUO, 2006).

A literatura aponta dois mecanismos possíveis para o desenvolvimento da polifagia. O primeiro enfoca nos neurônios secretores de neuropeptídeo Y. O neuropeptídeo Y é o transdutor de apetite mais potente conhecido e amplamente distribuído no sistema nervoso central, cuja maior concentração se encontra no hipotálamo (LEGER *et al.*, 1987). É um peptídeo altamente conservado, com ações orexígenas no discreto núcleo hipotalâmico, que exerce o papel de regular a homeostase energética (MERCER; CHEE; COLMERS, 2011; CHUNG *et al.*, 2012). Estudos têm mostrado que a polifagia apresentada por ratos diabéticos induzidos por STZ está estreitamente relacionada com o aumento da expressão do neuropeptídeo Y (SAHU; SNINSKY; KALRA, 1997; QU *et al.*, 2001), e que a redução de seus níveis parece amenizar a polifagia nestes animais (LIU; CHI; CHENG, 2001; KUO, 2006; CHUNG *et al.*, 2012).

O segundo mecanismo é resultante do aumento da produção de corpos cetônicos. Ratos submetidos ao modelo de diabetes utilizado neste trabalho, bem como pacientes com diabetes tipo 1 sem o devido controle glicêmico, ante reduzida concentração plasmática de insulina, têm elevação da cetogênese, a produção de corpos cetônicos. Por este processo, a mitocôndria dos hepatócitos passa a gerar, a partir da acetilcoenzima A, os dois corpos cetônicos principais: acetoacetato e 3- β -hidroxibutirato (ainda que, por questões históricas, os dois produtos sejam referidos como corpos cetônicos, apenas o acetoacetato é uma cetona real). Ambos, acetoacetato e 3- β -hidroxibutirato, são ácidos carboxílicos de cadeia curta, formado por 4 carbonos, tendo alta solubilidade em água e servindo como fonte de energia para o sistema nervoso central, rins, coração e músculo esquelético (ROBINSON; WILLIAMSON, 1980; FUKAO *et al.*, 2014; QIU; NOVIKOV; VALLON, 2017). Porém, uma vez que o indivíduo sofra com a deficiência parcial ou completa da insulina, a captação de glicose e seu uso pelos tecidos periféricos é reduzida, e hormônios contra-regulatórios da insulina como glucagon, cortisol, catecolaminas e hormônio do crescimento sinalizam para maior liberação de ácidos graxos livres dos tecidos adiposos para a circulação sanguínea, ao que se segue a oxidação

hepática destes ácidos graxos para produção de corpos cetônicos. É neste cenário que ocorre o estabelecimento da cetoacidose: por serem liberados pelo fígado nas suas formas protonadas e em quantidade que excede o uso pelos tecidos periféricos, acetoacetato e 3- β -hidroxibutirato podem ocasionar redução do pH sanguíneo a níveis que induzam complicações outras como anorexia, náuseas e vômitos, além de, em cerca de 10% dos pacientes, também poder causar coma (CASTEELS; MATHIEU, 2003; PALMER; CLEGG, 2015; QIU; NOVIKOV; VALLON, 2017).

Porém, além da cetoacidose mencionada acima, a literatura aponta indícios de que a elevação na produção de corpos cetônicos incide em elevação de sua concentração no fluido cerebrospinal, ativando uma via neural específica: o estímulo noradrenérgico dos terminais de neurônios presentes no núcleo paraventricular que secretam neuropeptídio Y. Como já mencionado, o aumento na liberação deste neuropeptídio levaria, então, a uma resposta orexígena (IWATA *et al.*, 2011).

Pode-se notar ainda, na figura 16, que os dados do consumo de ração dos ratos diabéticos tratados com o Composto A são intermediários entre os valores apresentados pelos grupos Diabético e Controle, o que indicaria uma atenuação da polifagia nestes animais. No dia 60 após a indução ao diabetes, o grupo Diabético + CA ainda apresenta valores de consumo de ração equivalentes aos grupos Controle e Controle + CA.

Os dados dos gráficos que compõem as figuras 17, 18 e 19 estão intimamente relacionados. A hiperglicemia estabelecida nos ratos diabéticos (figura 15) acaba por exceder a quantidade de glicose filtrada no glomérulo renal que pode ser reabsorvida no túbulo distal. Com isto, a urina dos ratos diabéticos apresentará elevada concentração de glicose que, por ser uma molécula osmoticamente ativa, drena grande volume de água, o que resulta em poliúria, ou seja, excessivo volume urinário (como pode ser visto nas figuras 18 e 19) quando comparado aos grupos Controle e Controle + CA. Consequentemente, como mecanismo de compensação à desidratação decorrente do estabelecimento da poliúria, estes ratos apresentam grande consumo de água quando comparado aos grupos Controle e Controle + CA (figura 17), sintoma denominado polidipsia (AIRES, 2012; PORTH, 2015).

No tocante ao volume urinário e ao fluxo urinário (figuras 18 e 19), os ratos do grupo Diabético + CA apresentaram atenuação da poliúria a partir do dia 30 após a indução ao diabetes, quando comparado com o grupo Diabético. No entanto, estes valores ainda se mostram bem superiores aos valores obtidos dos ratos dos grupos Controle e Controle + CA. Isto se torna particularmente interessante com a observação dos dados do

consumo de água (figura 17). Neste resultado é possível notar que os ratos do grupo Diabético + CA só têm atenuado o consumo de água em comparação ao grupo Diabético unicamente no dia 60 após a indução ao diabetes, enquanto a redução dos valores de volume urinário e fluxo urinário nos ratos do grupo Diabético + CA já ocorre no dia 30 pós-indução ao diabetes. Assim, é possível que o Composto A administrado nestes ratos diabéticos esteja reduzindo a desidratação verificada no grupo Diabético.

Como ponto central deste trabalho, o estudo do desenvolvimento da hiperalgesia nos ratos diabéticos foi realizado pela utilização da técnica de Randall-Selitto (figura 20) por meio da compressão da pata do rato, em que é possível estabelecer seu limiar para nocicepção mecânica. A nocicepção inclui os mecanismos pelos quais os estímulos nocivos são detectados pelo sistema nervoso periférico, codificados, transferidos e, inconscientemente, tratados pelo sistema nervoso central. A detecção é assegurada por transdutores moleculares específicos (conforme mencionado na seção 1.5 da Revisão de Literatura) expressos nos neurônios nociceptivos, cujos corpos celulares se encontram agrupados nos gânglios da raiz dorsal ou em gânglios trigeminais, ou seu equivalente no tronco cerebral (TODD, 2010).

O teste de Randall-Selitto constitui um meio clássico de aferição do limiar mecânico, alodinia mecânica ou hiperalgesia e analgesia em ratos (RANDALL; SELITTO, 1957; KAYSER; BASBAUM; GUILBAUD, 1990). Neste teste, a pata traseira é posicionada entre uma superfície fixa e uma superfície cônica móvel, a qual exercerá uma pressão crescente numa taxa controlada. O parâmetro aferido é o limiar (em gramas) para uma dada reação do rato, que pode ser o reflexo de retirada da pata da região do teste (parâmetro do presente trabalho), reação de luta/fuga ou vocalização, a depender do protocolo. Realizado corretamente, este teste oferece valores altamente estáveis e reproduzíveis (CÉLÈRIER *et al*, 2001; RIVAT *et al.*, 2008).

Por este teste, duas categorias de neurônios são ativadas: os mecanorreceptores de baixo limiar e os nociceptores. Os primeiros podem inervar os folículos pilosos na pele com terminações lanceoladas ou terminações de ruffini, além de poderem inervar células de Merkel. São neurônios de resposta mecanosensorial adaptativa lenta. Estes mecanorreceptores podem enviar um ramo neuronal colateral ao núcleo da coluna dorsal, e tendem a formar conexões monossinápticas diretas com neurônios mais internos do corno dorsal. Os nociceptores, por sua vez, podem formar terminações livres na derme ou na epiderme, e tipicamente formam sinapses com neurônios menos internos do corno dorsal.

A informação nociceptiva é, então, transmitida a neurônios mais internos no corno dorsal, os quais enviam a informação para o cérebro (LEWIN; MOSHOURAB, 2004).

Os neurônios mecanorreceptores acima referidos são neurônios de fibras A δ . Tanto em ratos (LEEM; WILLIS; CHUNG, 1993) quanto em humanos (ADRIAENSEN *et al.*, 1983), estes neurônios mecanorreceptores de baixo limiar também podem atuar como nociceptores, respondendo a estímulos mecânicos de alta intensidade. Os que atuam como nociceptores possuem terminações livres associadas aos queratinócitos (KRUGER; PERL; SEDIVEC, 1981; KRUGER; LIGHT; SCHWEIZER, 2003).

Já os neurônios nociceptores são os chamados neurônios de fibra C. Ainda que respondam ao estímulo mecânico nocivo gerado pelo teste de Randall-Selitto, essas fibras são, em sua maioria, polimodais, sendo ativadas tanto por estímulos nocivos mecânicos quanto térmicos (BESSOU; PERL, 1969; LYNN; CARPENTER, 1982; BIRDER; PERL, 1994). Logo, a hiperalgesia detectada nos ratos dos grupos Diabético e Diabético + CA pelo teste de Randall-Selitto está associada com o aumento da excitabilidade das populações neuronais mencionadas acima.

Hiperalgesia a estímulos mecânicos têm sido extensamente relatada em ratos diabéticos induzidos por STZ (WUARIN-BIERMAN *et al.*, 1987; KAMEI; OGAWA; KASUYA, 1990; AHLGREN; LEVINE, 1993; COURTEIX; LAVARENNE; ESCHALIER, 1993; COURTEIX *et al.*, 1994), e os dados representados na figura 20 estão em concordância com a literatura, ainda que ao longo do curso temporal de 60 dias (figura 21) os valores do limiar mecânico para os grupos Diabético e Diabético + CA apresentem-se, senão estáticos, apenas ligeiramente reduzidos. Por outro lado, os valores de limiar mecânico para os grupos Controle e Controle + CA aumentam ao longo do curso temporal. Este dado também está de acordo com os dados da literatura, que apontam para o aumento do limiar mecânico em função da idade (FITZGERALD; SHAW; MACINTOSH, 1988; REYNOLDS; FITZGERALD, 1995; RIRIE *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 2017). De fato, de acordo com o trabalho de Ririe e colaboradores, enquanto os ratos utilizados no trabalho apresentaram aumento do limiar mecânico com a idade (na 2^a, 4^a e 16^a semana de vida), seus limiares para estímulo nocivo térmico diminuíram da 2^a semana de vida para a 4^a e se mantiveram estáveis da 4^a semana para a 16^a. Uma vez que a latência ao estímulo térmico é estabelecida pela ativação das fibras C (OSSIPOV *et al.*, 1999), este dado é consistente com o fato de que o circuito neural destas fibras ainda não está totalmente concluído até a 2^a semana de vida (FITZGERALD; GIBSON, 1984; FITZGERALD, 1985). Uma vez que o limiar mecânico destes animais varia entre a 4^a e

a 16ª semana, quando não há mais variação no limiar térmico, isso indica uma variação de resposta das fibras Aδ com a idade dos animais. Considerando que os ratos utilizados no presente trabalho têm idades entre 4 e 12 semanas, os dados do curso temporal do limiar mecânico indicariam o aumento do limiar mecanonociceptivo das fibras Aδ com a idade dos animais, por razões ainda desconhecidas (RIRIE *et al.*, 2003). Além disso, dado que os ratos dos grupos Diabético e Diabético + CA não apresentaram aumento do limiar mecânico exibido pelos grupos Controle e Controle + CA, isto destacaria o comprometimento da resposta fisiológica das fibras Aδ, estando seu limiar de ativação reduzido. A este fato soma-se o provável comprometimento da resposta fisiológica das fibras C pelo diabetes, conforme já descrito na literatura (FUCHS *et al.*, 2010).

Em ratos diabéticos com hiperalgesia, neurônios do DRG exibem aumento da frequência de geração de potencial de ação em resposta a estímulos mecânicos supralimiais (AHLGREN; LEVINE, 1993; MALCANGIO; TOMLINSON, 1998; FOX *et al.*, 1999) e atividade espontânea aumentada (SAID, 1996). A ambos os efeitos é creditada a sensação de dor (HONG *et al.*, 2004), e têm relação com a atividade de canais de sódio ativados por voltagem. Dentre estes canais de sódio, à isoforma Na_v 1.7 têm sido associado papel crucial no desenvolvimento da DND, uma vez que sua expressão se encontra aumentada em ratos diabéticos (HONG *et al.*, 2004; CHATTOPADHYAY; MATA; FINK, 2008; HUANG *et al.*, 2014). Paralelamente, a literatura tem demonstrado que citocinas pró-inflamatórias tem papel importante na patogênese e manutenção da dor neuropática diabética (LU; LIN; ZHONG, 2017; NI *et al.*, 2017), incluindo dados clínicos (PURWATA, 2011). Soma-se a isto a demonstração de Huang e colaboradores (2014), que demonstraram a relação direta entre a elevação da expressão de TNF e de Na_v 1.7 no DRG de ratos diabéticos.

Os canais Na_v 1.7 são robustamente expressos no corpo celular de, virtualmente, todos os neurônios que originam as fibras nociceptivas Aδ e C (HARPER; LAWSON, 1985b; DJOUHRI *et al.*, 2003). De fato, Na_v 1.7 é expresso tanto nas terminações neuronais periféricas quanto nas terminações centrais, sendo robustamente expressos nas fibras nervosas intraepidérmicas dentro da pele e na lâmina superficial do corno da raiz dorsal, a região de maior conectividade sináptica entre os neurônios nociceptivos primários e os secundários (BLACK *et al.*, 2012). Estes dados enfatizam que o Na_v 1.7 é crucial no processo de desenvolvimento da hiperalgesia diabética.

O presente trabalho corrobora a relação entre a hiperalgesia mecânica (figuras 20 e 21) e a elevação da concentração plasmática de TNF (figura 27) com o aumento da

excitabilidade neuronal (figuras 22 a 26) denotada em neurônios de ratos diabéticos com hiperalgesia mecânica.

A excitabilidade neuronal pôde ser verificada através dos dados de eletrofisiologia celular, onde a relação I-V mostrou que os neurônios dos ratos diabéticos têm aumentada a densidade da corrente total de sódio quando comparados com o grupo controle (Controle, $189,4 \pm 10,7$ pA/pF vs Diabético, $231,4 \pm 25,1$ pA/pF, figura 22, 23 e 24). Isto pode estar relacionado ao aumento da expressão de Na_v 1.7 (HONG *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2016) e tanto com o aumento da condutância unitária do canal Na_v 1.8 (HONG *et al.*, 2004; JIN; GEREAU, 2006; HUDMON *et al.*, 2008) quanto com o aumento da expressão de Na_v 1.8 (SUN *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2016). Além disso, a curva de ativação estacionária dos canais de sódio (figura 25A) demonstra que estes canais estão mais sensíveis à despolarização de membrana, com o valor do $V_{1/2}$ (figura 26) para o grupo Diabético ($-29,1 \pm 0,3$ mV) mais hiperpolarizado que o do grupo Controle ($-26,3 \pm 0,3$ mV). Lembrando que o presente estudo abrangeu o estudo de neurônios que originam fibras A δ e C, os dados embasam o estado de hiperalgesia dos ratos diabéticos (HONG *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2012) demonstrado pelo teste de Randall-Selitto (figura 16 e 17).

Ao analisar os dados da concentração de TNF sérico no dia 60 após a indução ao diabetes (figura 27), onde o valor para o grupo Diabético ($624,9 \pm 97,8$ pg/ml) é praticamente o dobro do valor do grupo Controle ($340,3 \pm 16$ pg/ml), é possível relacionar o aumento da corrente total de sódio, o aumento da sensibilidade destes canais e a elevação da concentração de TNF sérico no diabetes, com base nos achados da literatura (PURWATA, 2011; HUANG *et al.*, 2014; LU; LIN; ZHONG, 2017; NI *et al.*, 2017).

TNF afeta neurônios aferentes primários, induzindo hipersensibilidade (OZAKTAY *et al.*, 2006; CZESCHIK *et al.*, 2008; SPICAROVA; NERANDZIC; PALECEK, 2011) pelo aumento tanto da corrente de sódio via canais TTXs (CHEN *et al.*, 2011; SPICAROVA; NERANDZIC; PALECEK, 2011) quanto via canais TTXr (JIN; GEREAU, 2006; CHEN *et al.*, 2011). Além do aumento da expressão das isoformas Na_v 1.7 e Na_v 1.8 mencionadas acima, estudos anteriores já demonstraram que o TNF aumenta a corrente de sódio TTXr via ativação do receptor TNFR1 e pela via da MAPK p38 em neurônios dissociados do DRG (JIN; GEREAU, 2006). Já foi demonstrado, também, que o aumento da expressão de Na_v 1.7 estava co-localizada com o aumento de fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular-1 e -2 (ERK1 e ERK2) e da p38 em neuromas humanos dolorosos (BLACK *et al.*, 2008) e de ratos (PERSSON *et al.*, 2011). A ERK1

fosforilada fosforila o canal Na_v 1.7, diminuindo seu limiar de ativação e tornando-o mais predisposto a ser ativado em resposta a um estímulo de menor intensidade (NEMOTO *et al.*, 2010; STAMBOULIAN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2013). Estes trabalhos, somado ao de Tamura e colaboradores (2014), mostram que a elevação plasmática de TNF contribui para o desenvolvimento da DND de duas formas: via ativação dos receptores TNFR1 e TNFR2 e/ou via MAPK p38 no que seria a fase inicial, ou seja, facilitando a ativação do canal Na_v 1.7, e numa fase mais tardia, aumentando a expressão de Na_v 1.7 na membrana celular neuronal. E estes dados da literatura embasam e reforçam os achados do presente trabalho.

Ainda na figura 27, nota-se que o tratamento com o Composto A foi capaz de prevenir completamente o aumento do TNF sérico medido no grupo Diabético ($624,9 \pm 97,8$ pg/ml), com os valores do grupo Diabético + CA ($320,8 \pm 10$ pg/ml) sendo similares aos valores do grupo Controle ($340,3 \pm 16$ pg/ml). Este dado ratifica a alta capacidade da atividade anti-TNF do Composto A. Esta redução gerou efeitos específicos sobre os dados de eletrofisiologia celular e hiperalgesia.

O tratamento inibiu o aumento dos valores do pico da corrente total de sódio visto no grupo Diabético ($231,4 \pm 25,1$ pA/pF, Diabético vs $159,2 \pm 14,7$ pA/pF, Diabético + CA, figuras 23C e 24) a valores do grupo Controle ($189,4 \pm 10,7$ pA/pF, figuras 23B e 24). Isto pode sugerir que a prevenção do aumento de TNF sérico no grupo Diabético + CA preveniria, também, o aumento da expressão de canais Na_v 1.7 nos neurônios estudados. No entanto, a condutância normalizada obtida da relação I-V mostrou que, mesmo com o tratamento com o Composto A, os canais de sódio nos neurônios do grupo Diabético + CA ainda apresentam aumento da sensibilidade à despolarização de membrana quando comparado com o grupo Controle, ainda que tenha sido menor do que a detectada no grupo Diabético, como evidenciado pela análise do $V_{1/2}$ (Controle, $-26,3 \pm 0,3$ mV, Diabético, $-29,1 \pm 0,3$ mV e Diabético + CA, $-27,7 \pm 0,4$ mV, figura 26). Este dado pode ser associado a atenuação da hiperalgesia verificada no grupo Diabético + CA, onde não há a prevenção completa do desenvolvimento da hiperalgesia nos ratos diabéticos tratados (Controle $212,1 \pm 5,9$ g, Diabético, $116,1 \pm 5,8$ g e Diabético + CA, $143,9 \pm 5,6$ g, figuras 20 e 21, dia 60). Esta combinação de dados indicaria que, mesmo sem o aumento sérico de TNF, outros fatores estariam sensibilizando os canais de sódio à sua ativação em potenciais de membrana menos despolarizados. Como exemplo, pode ser citada a alteração da composição da bicamada lipídica neuronal. Um dos mecanismos possíveis seria a depleção de mioinositol, um importante constituinte da membrana

celular. Em conjunto com danos oxidativos à membrana lipídica, resultante do aumento de espécies reativas de oxigênio, a redução do mioinositol incide na modificação da composição da membrana celular no diabetes (BROWNLEE, 2001, FARIAS *et al.*, 2011). Como, no geral, os canais de sódio dependentes de voltagem respondem ao gradiente do potencial elétrico da região interna da bicamada lipídica, não ao potencial transmembrana em si (BAKER; HODGKIN; MEVES, 1964; CHANDLER; HODGKIN; MEVES, 1965), a modificação da composição da bicamada lipídica, como já visto em outros trabalhos (HOFTRIG *et al.*, 1983; KUMAR; MENON, 1993), modificaria o potencial detectado pelos canais de sódio, causando o deslocamento da curva de condutância normalizada nos grupos Diabético e Diabético + CA (figuras 25 e 26) para valores mais negativos.

Uma vez que, até o dado momento, o mecanismo de ação pelo qual o TNF induz o aumento da expressão dos canais Na_v 1.7 não foi esclarecido, o presente trabalho abordou a possibilidade da SUMOilação da proteína CRMP2 compor este mecanismo. Neste intuito, neurônios dissociados do DRG foram transfectados com plasmídeos contendo a sequência de DNA para transdução celular da proteína CRMP2-K374A-GFP. Utilizado no trabalho de Dustrude e colaboradores (2013), o plasmídeo CRMP2-K374A teve substituída a lisina na posição 374, alvo do processo de SUMOilação, por uma alanina. Esta mutação resultou na transdução de uma proteína que manteve seu perfil de expressão e função neuronal, mas sem a capacidade de ser SUMOilada. O GFP foi adicionado ao plasmídeo original com o propósito de indicar, pelo uso da microscopia confocal, que as células fluorescentes responsivas ao estímulo luminoso ($\lambda = 488 \text{ nm}$) também expressavam a proteína CRMP2-K374A, confirmando, assim, a transfecção. O mesmo procedimento foi realizado para a expressão da proteína CRMP2-WT (sem mutação). Após a transfecção, as células necessitaram de 2 semanas em cultura para expressar as proteínas de modo a serem satisfatoriamente detectadas.

Conforme visto na figura 28A e 28B, a transfecção, realizada pelo uso do adenovírus AAV5 (específico para infecção de neurônios do DRG), resultou em neurônios com expressão intensa das proteínas CRMP2-WT e CRMP2-K374A, respectivamente. As figuras 28C e 28D mostram a árvore dendrítica gerada pelos neurônios após 2 semanas em cultura, demonstrando que são células saudáveis e viáveis.

Após duas semanas em cultura, as células foram expostas por 6 horas à uma concentração de TNF similar a média da concentração sérica aferida nos ratos do grupo Diabético (figura 27): 700 pg/ml. Assim, se a SUMOilação da proteína CRMP2 compõe

o mecanismo pelo qual o TNF induz o aumento da expressão de Na_v 1.7, os neurônios expressando a proteína CRMP2 mutada (CRMP2-K374A), após exposição ao TNF, ou não apresentariam aumento da densidade de corrente, ou menor aumento da densidade de corrente quando comparado aos neurônios expressando apenas a proteína CRMP2-WT e expostos ao TNF. O aumento da expressão de Na_v 1.7 em neurônios do DRG suscitado pela exposição aguda ao TNF já foi reportado pela literatura (TAMURA *et al.*, 2014).

Como visto nas figuras 29, 30C e 30E, neurônios expressando a proteína CRMP2-K374A têm reduzida densidade de corrente total de sódio ($-49,2 \pm 5,3$ pA/pF) quando comparada tanto com os neurônios do grupo Controle ($-94 \pm 19,6$ pA/pF) quanto com neurônios expressando a proteína CRMP2-WT ($-89,4 \pm 9,3$ pA/pF). Os dados do comparativo entre os grupos CRMP2-WT e CRMP2-K374A estão em concordância com o trabalho de Dustrude e colaboradores (2013), mesmo que o presente trabalho tenha adotado um método de transfecção alternativo (pelo uso do adenovírus AAV5). A esta redução na densidade da corrente total de sódio no grupo CRMP2-K374A pode ser atribuída a redução na expressão de Na_v 1.7 na membrana celular. Além disto, dado o fato de que os neurônios dissociados do DRG expressam endogenamente CRMP2 (CHI *et al.*, 2009), os neurônios do grupo CRMP2-WT estão, então, superexpressando a proteína CRMP2. No entanto, esta superexpressão não resultou em alteração da densidade da corrente verificada no grupo Controle, denotando que estes neurônios se encontram em condições similares.

Assim sendo, neurônios dos dois grupos transfectados foram expostos, por 6 horas, a 700 pg/ml de TNF. Neste intervalo de tempo se dá o pico da expressão de Na_v 1.7 induzida pela exposição ao TNF (TAMURA *et al.*, 2014). As figuras 29, 30B e 30D mostram que tanto os neurônios do grupo CRMP2-WT + TNF ($-137,6 \pm 19$ pA/pF) quanto os do grupo CRMP2-K374A + TNF ($-76 \pm 9,9$ pA/pF) exibem aumento da corrente total de sódio após exposição ao TNF, em comparação com grupo Controle ($-94 \pm 19,6$ pA/pF). De fato, a exposição ao TNF dos neurônios do grupo CRMP2-K374A + TNF não só aumentou a densidade da corrente vista no grupo CRMP2-K374A ($-49,2 \pm 5,3$ pA/pF, CRMP2-K374A vs $-137,6 \pm 19$ pA/pF, CRMP2-K374A + TNF, figuras 29 e 30F) como anulou a diferença estatística antes existente entre as comparações entre os grupos Controle vs CRMP2-K374A e CRMP2-WT vs CRMP2-K374A (figuras 30C e 30G). O resumo dos valores de pico das densidades de corrente mencionadas acima pode ser visto na figura 31. Além destes dados, a análise da condutância normalizada (figura 32) não mostrou nenhuma diferença estatística entre os grupos.

Desta forma, uma vez que os neurônios do grupo CRMP2-K374A + TNF apresentaram, proporcionalmente, o mesmo aumento na densidade de corrente que os neurônios do grupo CRMP2-WT + TNF ($\approx 54\%$), estes dados mostram que mesmo com a SUMOilação da proteína CRMP2 constituindo uma via importante de regulação celular do tráfego de canais $\text{Na}_v 1.7$ para a sua inserção na membrana em neurônios do DRG (DUSTRUDE *et al.*, 2013), a SUMOilação do CRMP2, provavelmente, não compõe a via de sinalização pela qual o TNF induz o aumento da expressão de $\text{Na}_v 1.7$.

Com este resultado, entretanto, foi possível notar que a concentração de TNF verificada nos ratos diabéticos do presente trabalho (figura 27) e utilizada no experimento anterior foi capaz de produzir grande aumento da corrente total de sódio. Com o propósito de verificar a resposta induzida pelos 700 pg/ml de TNF sobre as correntes de sódio TTXs e TTXr, a preparação descrita no item 4.7 de Material e Métodos foi utilizada. Após 6 horas de exposição, os neurônios do grupo + TNF apresentaram aumento da densidade da corrente total de sódio (figuras 33A e D, 34A e 35), reproduzindo os resultados obtidos com os neurônios dos grupos CRMP2-WT + TNF e CRMP2-K374A + TNF (figuras 29, 30 e 31) e podendo ser associado aos resultados obtidos nos neurônios dos ratos diabéticos (figuras 22, 23 e 24). A análise da relação I-V da densidade da corrente total de sódio (figura 34A) mostra um aumento de $\approx 69\%$ no valor pico destas densidades (Controle, $-134,7 \pm 19,3$ pA/pF vs + TNF, $-228 \pm 29,2$ pA/pF, potencial de membrana de -5 mV, figura 35). Notavelmente, o pico da densidade de corrente do grupo + TNF desloca-se para o potencial de membrana de -5 mV, em comparação com o grupo Controle. Esse deslocamento é enfatizado pelo gráfico da condutância normalizada (figura 36A), onde o TNF induziu uma hiperpolarização do valor do $V_{1/2}$ na ordem de ~ 5 mV (Controle, $-7,7 \pm 0,5$ mV vs + TNF, $-12,9 \pm 0,3$ mV, figuras 36A e 37).

A separação da corrente total de sódio nas suas constituintes TTXs e TTXr traz resultados interessantes. Inicialmente, é possível notar que, além do aumento do pico da densidade da corrente do grupo TTXs + TNF com relação ao Controle ($\approx 89\%$), este também se desloca para valores de potencial mais hiperpolarizado, reproduzindo o que foi visto na corrente total de sódio tanto na densidade de corrente (Controle, $-89,7 \pm 22$ pA/pF vs + TNF, $-177 \pm 29,8$ pA/pF, figuras 33C e F, 34B e 35) quanto na condutância normalizada (Controle, $-9,9 \pm 0,6$ mV vs + TNF, $-15,3 \pm 0,4$ mV, figuras 36B e 37). Já a corrente TTXr, mesmo apresentando aumento do pico da densidade de sua corrente ($\approx 65\%$) após exposição ao TNF (Controle, $-58,3 \pm 8,4$ pA/pF vs + TNF, $-96 \pm 14,8$ pA/pF,

figuras 33B e E, 34C e 35), não apresentou deslocamento do pico para potenciais mais negativos, como visto nas correntes de sódio total e TTXs ($V_{1/2}$ – Controle, $-9,6 \pm 0,6$ mV vs + TNF, $-10,7 \pm 0,9$ mV, figura 36C e 37). Os valores da inclinação da curva de ativação estacionária normalizada (tabela 3) também mostraram que os canais de sódio TTXs são, ao longo dos pulsos teste, mais facilmente ativados (Controle - Ina TTXs, $6,3 \pm 0,6$ mV vs + TNF - Ina TTXs, $4,9 \pm 0,3$ mV), enquanto os canais de sódio TTXr não apresentam esta sensibilização de sua ativação (Controle - Ina TTXr, $6,9 \pm 0,5$ mV vs + TNF - Ina TTXr, $5,4 \pm 0,8$ mV). Estes dados embasam que o aumento da sensibilidade da corrente total de sódio à ativação após exposição ao TNF (Controle – Ina total, $7,3 \pm 0,5$ mV vs + TNF - Ina total, $5,3 \pm 0,2$ mV) se deve, especificamente, à sensibilização da corrente de sódio TTXs após exposição ao TNF. Assim, o TNF promove alterações distintas sobre as correntes TTXs e TTXr. Vale destacar, neste ponto, que a corrente TTXr isolada neste trabalho se deve ao canal $Na_v 1.8$, uma vez que a solução de pipeta não contém CsF (ou mesmo F^-), necessário para o registro da corrente de sódio conduzida pela isoforma $Na_v 1.9$ (COSTE *et al.*, 2004). Mesmo que ambas as correntes tenham sofrido aumento de suas densidades, apenas a corrente TTXs se tornou mais sensível às despolarizações de membrana. Ainda que haja trabalhos na literatura indicando que a hiperpolarização do valor do $V_{1/2}$ em ≈ 5 mV provavelmente não é suficiente para despolarizar, de modo significativo, o potencial de repouso neuronal [para tanto, acredita-se que seria preciso uma hiperpolarização de ≈ 8 mV (HARTY *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2009; ESTACION; WAXMAN, 2017)], isto ainda não é consensual. Além disto, há ainda outras variantes, no diabetes, que podem incrementar a sensibilização já iniciada pelo TNF (WOOLF *et al.*, 1997; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017). Lembrando que o canal $Na_v 1.7$ é a principal isoforma de canal de sódio expressa nos neurônios que originam as fibras A δ e C (HARPER; LAWSON, 1985; HO; O'LEARY, 2011) e sendo sua expressão aumentada pela ação do TNF (TAMURA *et al.*, 2014), pode-se inferir que estas alterações verificadas na corrente TTXs têm relação direta com o canal $Na_v 1.7$. Com isto, estes dados inferem que o TNF contribui para a sensibilização do $Na_v 1.7$ e consequente despolarização da membrana celular de modo efetivo via ação sobre os canais $Na_v 1.7$.

Outro efeito interessante do TNF sobre as correntes TTXs e TTXr se deu sobre a inativação rápida estacionária dos canais de sódio. Como visto nas figuras 38A e 39, o TNF induz a corrente total de sódio à inativação a potenciais mais negativos, gerando o deslocamento da curva de inativação para valores de potencial de membrana menos despolarizados (figura 38A), dado evidenciado pelo V_h (Controle, $-19,7 \pm 0,3$ mV vs +

TNF, $-23 \pm 0,4$ mV, figura 39). Ainda que o deslocamento da curva de inativação rápida estacionária do grupo TTXs não tenha diferido estatisticamente após exposição ao TNF, possivelmente devido ao reduzido grupo amostral (4 registros, figura 38B), seu V_h mostrou o mesmo efeito visto na corrente total de sódio após exposição ao TNF (Controle, $-20,9 \pm 0,3$ mV vs + TNF, $-23,2 \pm 0,5$ mV, figura 39). A corrente TTXr, no entanto, não sofreu alteração na sua inativação rápida estacionária (V_h - Controle, $-18,3 \pm 0,2$ mV vs + TNF, $-19,7 \pm 0,6$ mV). Estes dados também são embasados pelos valores de k_h (tabela 4), ou valores da inclinação da curva de inativação rápida estacionária das correntes de sódio. Estes valores para a corrente de sódio TTXs (Controle, $6,3 \pm 0,6$ mV vs + TNF, $4,9 \pm 0,3$ mV) e para a corrente de sódio TTXr (Controle, $6,9 \pm 0,5$ mV vs + TNF, $5,4 \pm 0,8$ mV) mostram que a sensibilização da inativação rápida estacionária da corrente total de sódio (Controle, $7,3 \pm 0,5$ mV vs + TNF, $5,3 \pm 0,2$ mV) é decorrente do aumento da sensibilização à inativação, especificamente, da corrente de sódio TTXs após exposição ao TNF.

Com a finalidade de se verificar a faixa de ativação sustentada das correntes de sódio total, TTXs e TTXr vs potencial de membrana, os gráficos da corrente de janela foram plotados (figuras 40 e 41). Por estes gráficos pode-se sugerir que a corrente de sódio TTXs exposta ao TNF (figuras 40B e 41B), além de mais sensível à despolarização da membrana, têm aumentada a amplitude de sua corrente sustentada em comparação com o grupo controle, possivelmente devido ao aumento de sua expressão de canais Na_v 1.7 na membrana celular, conforme já mencionado anteriormente. De fato, no trabalho de CHEN e colaboradores (2015), que utilizaram a mesma abordagem do presente trabalho (exposição de neurônios do DRG ao TNF), não houve alteração na expressão das isoformas de canal de sódio Na_v 1.1, 1.2, 1.3 ou 1.6 antes de 8 horas de exposição a 1000 pg/ml de TNF, em oposição ao aumento da expressão de Na_v 1.7, com apenas 6 horas de exposição à mesma concentração de TNF. Este dado reforça a hipótese das alterações apresentadas na corrente TTXs neste trabalho advirem do efeito do TNF sobre o Na_v 1.7. Um possível mecanismo pelo qual o TNF aumenta a sensibilidade do canal Na_v 1.7 se daria pela fosforilação das proteínas quinase ERK1 e ERK2 e da MAPK p38, induzida pela ativação do TNFR1 (BARBIN; ROISIN; ZALC, 2001; BLACK *et al.*, 2008; PERSSON *et al.*, 2011).

Ainda pelo trabalho de CHEN e colaboradores, no entanto, enfatiza-se os achados anteriores da literatura de que o TNF induz o aumento da corrente unitária dos canais Na_v 1.8 pela ativação do NF- κ B e/ou da MAPK p38 (JIN; GEREAU, 2006; HUDMON *et al.*,

2008). Estes dados, em conjunto com os dados da densidade de corrente e da corrente de janela, indicariam que apesar dos canais $\text{Na}_v 1.8$ poderem estar apresentando aumento de corrente unitária (34C e 35) estes canais podem também, nestas 6 horas de exposição ao TNF, terem reduzida a sua expressão na membrana celular, o que justificaria a redução de sua corrente de janela (figura 41C). Como se pode notar no gráfico 41D e E, os canais $\text{Na}_v 1.8$ contribuem majoritariamente com a corrente de janela estabelecida na corrente total de sódio. Como em 41C tem-se uma redução da corrente de janela pelo canal $\text{Na}_v 1.8$ após a exposição ao TNF, tem-se também a redução da corrente de janela na corrente total de sódio após a exposição ao TNF. O aumento da corrente TTXs pós TNF, por sua vez, parece compensar a redução da corrente de janela da corrente total de sódio pós exposição ao TNF. Este dado também reforça a importância do curso temporal da exposição neuronal ao TNF, dependendo da isoforma de canal de sódio estudada.

7. CONCLUSÃO

O tratamento dos ratos diabéticos com o Composto A foi capaz de atenuar alguns sintomas dos ratos diabéticos, como polifagia, polidipsia e poliúria. Também atenuou o desenvolvimento da hiperalgesia verificada nos ratos diabéticos sem tratamento sem, porém, impedir seu desenvolvimento. Enquanto os experimentos *in vitro* mostraram que neurônios do grupo Diabetes + CA tiveram atenuada a hiperexcitabilidade verificada nos neurônios do grupo Diabetes, os experimentos *in vivo* indicam que o desenvolvimento da hiperalgesia nos ratos do grupo Diabetes + CA persistiu, mesmo que sensivelmente atenuada. Isto indica que mesmo com a completa nulidade do aumento dos níveis séricos de TNF dos ratos do grupo Diabetes + CA, a combinação dos demais mecanismos presentes no quadro diabético ainda exercem grande efeito no desenvolvimento da hiperalgesia.

Além disto, o nível de TNF sérico encontrado nos ratos diabéticos se mostrou suficiente para, no intervalo de 6 horas, sensibilizar os neurônios que originam as fibras Aδ e C. Tal evento parece decorrer tanto do aumento da sensibilidade do canal Na_v 1.7 quanto do aumento de sua expressão na membrana neuronal. Soma-se, também, o efeito sobre o canal Na_v 1.8 que, possivelmente, tem aumentada a sua condutância unitária, mas pode ter tido reduzida a sua expressão na membrana celular destes neurônios.

No tocante à proteína CRMP2, ainda que sua SUMOilação constitua, de modo importante, o mecanismo de regulação do tráfego do canal de sódio Na_v 1.7, bem como sua posterior expressão na membrana celular neuronal, o mecanismo pelo qual o TNF aumenta a expressão de Na_v 1.7 na membrana celular não parece depender, ao menos majoritariamente, da SUMOilação da proteína CRMP2.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, C. A.; MALIK, R. A.; VAN ROSS, E. R.; KULKARNI, J.; BOULTON, A. J. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. **Diabetes Care**. v. 34, n. 10, p. 2220-2224, 2011 Oct.

ADRIAENSEN, H.; GYBELS, J.; HANDWERKER, H. O.; VAN HEES, J. Response properties of thin myelinated (A-delta) fibers in human skin nerves. **The Journal of Neurophysiology**. v. 49, n. 1, p. 111-122, 1983 Jan.

AHERN, C. A.; PAYANDEH, J.; BOSMANS, F.; CHANDA, B. The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. **The Journal of General Physiology**. v. 147, n. 1, p. 1-24, 2016 Jan.

AHLGREN, S. C.; LEVINE, J. D. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. **Neuroscience**. v. 52, n. 4, p. 1049-1055, 1993 Feb.

AHMED, C. M.; WARE, D. H.; LEE, S. C.; PATTEN, C. D.; FERRER-MONTIEL, A. V.; SCHINDER, A. F.; MCPHERSON, J. D.; WAGNER-MCPHERSON, C. B.; WASMUTH, J. J.; EVANS, G. A.; MONTAL, M. Primary structure, chromosomal localization, and functional expression of a voltage-gated sodium channel from human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 89, n. 17, p. 8220-8224, 1992, Sep.

AIRES, M. M. Excreção renal de solutos. In: _____. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 741-743.

AKOPIAN, A. N.; SOUSLOVA, V.; ENGLAND, S.; OKUSE, K.; OGATA, N.; URE, J.; SMITH, A.; KERR, B. J.; MCMAHON, S. B.; BOYCE, S.; HILL, R.; STANFA, L. C.; DICKENSON, A. H.; WOOD, J. N. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. **Nature Neuroscience**. v. 2, n. 6, p. 541-548, 1999, Jun.

ALBERS, J. W.; HERMAN, W. H.; POP-BUSUI, R.; FELDMAN, E. L.; MARTIN, C. L.; CLEARY, P. A.; WABERSKI, B. H.; LACHIN, J. M.; DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL /EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS RESEARCH GROUP. Effect of prior intensive insulin treatment during the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) on peripheral neuropathy in type 1 diabetes during the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study. **Diabetes Care**. v. 33, n. 5, p. 1090-1096, 2010 May.

ANDALLU, B.; VARADACHARYULU, NCH. Antioxidant role of mulberry (*Morus indica* L. cv. Anantha) leaves in streptozotocin-diabetic rats. **Clinica Chimica Acta**. v. 338, n. 1-2, p. 3-10, 2003 Dec.

ANDERSON, P. A.; GREENBERG, R. M. Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**. v. 129, n. 1, p. 17-28, 2001 May.

ANG, L.; JAISWAL, M.; MARTIN, C.; POP-BUSUI, R. Glucose control and diabetic neuropathy: lessons from recent large clinical trials. **Current Diabetes Reports**. v. 14, n. 9, p. 528, 2014.

ARMSTRONG, C. M.; BEZANILLA, F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. **The Journal of General Physiology**. v. 70, n. 5, p. 567-590, 1977 Nov.

BACCAGLINI, P. I.; HOGAN, P. G. Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 80, n. 2, p. 594-598, 1983 Jan.

BAKER, P. F.; HODGKIN, A. L.; MEVES, H. The effect of diluting the internal solution on the electrical properties of a perfused giant axon. **The Journal of Physiology**. v. 170, p. 541-560, 1964 Apr.

BANSAL, V.; KALITA, J.; MISRA, U. K. Diabetic neuropathy. **Postgraduate Medical Journal**. v. 82, n. 964, p. 95-100, 2006 Feb.

BARBIN, G.; ROISIN, M. P.; ZALC, B. Tumor necrosis factor alpha activates the phosphorylation of ERK, SAPK/JNK, and P38 kinase in primary cultures of neurons. **Neurochemical Research**. v. 26, n. 2, p. 107-112, 2001 Feb.

BESSOU, P.; PERL, E. R. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. . **Journal of Neurophysiology**. v. 32, n. 6, p. 1025-1043, 1969 Nov.

BEUTLER, B.; MAHONEY, J.; LE TRANG, N.; PEKALA, P.; CERAMI, A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 161, n. 5, p. 984-995, 1985a May.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J. D.; CHANG, M.; PAN, Y. C.; MATHISON, J.; ULEVITCH, R.; CERAMI, A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature**. v. 316, n. 6028, p. 552-554, 1985b Aug.

BEZANILLA, F.; ARMSTRONG, C. M. A low-cost signal averager and data-acquisition device. **American Journal of Physiology**. v. 232, n. 5, p. 211-215, 1977 May

BICKELS, J.; KOLLENDER, Y.; MERINSKY, O.; MELLER, I. Coley's toxin: historical perspective. **The Israel Medical Association Journal**. v. 4, n. 6, p. 471-472, 2002 Jun.

BIRDER, L. A.; PERL, E. R. Cutaneous sensory receptors. **Journal of Clinical Neurophysiology**. v. 11, n. 6, p. 534-552, 1994 Nov.

BLACK, J. A.; DIB-HAJJ, S.; MCNABOLA, K.; JESTE, S.; RIZZO, M. A.; KOCSIS, J. D.; WAXMAN, S. G. Spinal sensory neurons express multiple sodium channel alpha-subunit mRNAs. **Brain Research. Molecular Brain Research**. v. 43, n. 1-2, p. 117-131, 1996 Dec.

BLACK, J. A.; NIKOLAJSEN, L.; KRONER, K.; JENSEN, T. S.; WAXMAN, S. G. Multiple sodium channel isoforms and mitogen-activated protein kinases are present in painful human neuromas. **Annals of Neurology**. v. 64, n. 6, p. 644-653; 2008 Dec.

BLACK, J. A.; FRÉZEL, N.; DIB-HAJJ, S. D.; WAXMAN, S. G. Expression of Nav1.7 in DRG neurons extends from peripheral terminals in the skin to central preterminal branches and terminals in the dorsal horn. **Molecular Pain**. v. 8, p. 82, 2012 Nov.

BLACK, R. A.; RAUCH, C. T.; KOZLOSKY, C. J.; PESCHON, J. J.; SLACK, J. L.; WOLFSON, M. F.; CASTNER, B. J.; STOCKING, K. L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K. A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J. N.; JOHNSON, R. S.; PAXTON, R. J.; MARCH, C. J.; CERRETTI, D. P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**. v. 385, n. 6618, p. 729-733, 1997 Feb.

BLAIR, N. T.; BEAN, B. P. Roles of tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na⁺ current, TTX-resistant Na⁺ current, and Ca²⁺ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. **The Journal of Neuroscience**. v. 22, n. 23, p. 10277-10290, 2002 Dec.

BOULTON, A. J.; KIRSNER, R. S.; VILEIKYTE, L. Clinical practice. Neuropathic diabetic foot ulcers. **New England Journal of Medicine**. v. 351, n. 1, p. 48-55, 2004 Jul.

BOULTON, A. J.; VINIK, A.; AREZZO, J. C.; BRIL, V.; FELDMAN, E. L.; FREEMAN, R.; MALIK, R. A.; MASER, R. E.; SOSENKO, J. M.; ZIEGLER, D; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 28, n. 4, p. 956-962, 2005 Apr.

BOULTON, A. J.; VALENSI, P.; TESFAYE, S. International Neuropathy Workshop of 2009: introduction to the final reports. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. v. 27, n. 7, p. 617-619, 2011 Oct.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. v. 13, v. 414, p. 813-820, 2001 Dec.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **The Journal of Physiology**. v. 190, n. 3, p. 541-562, 1967 Jun.

CAFFREY, J. M.; ENG, D. L.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G.; KOCSIS, J. D. Three types of sodium channels in adult rat dorsal root ganglion neurons. **Brain Research**. v. 592, n. 1-2, p. 283-297, 1992 Oct.

CALLAGHAN, B. C.; FELDMAN, E.; LIU, J.; KERBER, K.; POP-BUSUI, R.; MOFFET, H.; KARTER, A. J. Triglycerides and amputation risk in patients with diabetes: ten-year follow-up in the DISTANCE study. **Diabetes Care**. v. 34, n. 3, p. 635-640, 2011 Mar.

CALLAGHAN, B. C.; CHENG, H. T.; STABLES, C. L.; SMITH, A. L.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. **The Lancet. Neurology**. v. 11, n. 6, p. 521-534, 2012 Jun.

CALVO, M.; DAWES, J. M.; BENNETT, D. L. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. **The Lancet. Neurology**. v. 11, n. 7, p. 629-642, 2012 Jul.

CAMERON, A. A.; CLIFFER, K. D.; DOUGHERTY, P. M.; WILLIS, W. D.; CARLTON, S. M. Changes in lectin, GAP-43 and neuropeptide staining in the rat superficial dorsal horn following experimental peripheral neuropathy. **Neuroscience Letters**. v. 14, n. 131, p. 249-252, 1991 Oct.

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A. Diabetes causes an early reduction in autonomic ganglion blood flow in rats. **Journal of Diabetes Complications**. v. 15, n. 4, p. 198-202, 2001 Jul-Aug.

CÁRDENAS, M.; DE LA FUENTE, S.; FONT, P.; CASTRO-VILLEGAS, M. C.; ROMERO-GÓMEZ, M. RUIZ-VÍLCHEZ, D. CALVO-GUTIÉREZ, J.; ESCUDERO-CONTRERAS, A.; CASADO, M. A.; DEL PRADO, J. R.; COLLANTES-ESTÉVEZ, E. Real-world cost-effectiveness of infliximab, etanercept and adalimumab in rheumatoid

arthritis patients: results of the CREATE registry. **Rheumatology International**. v. 36, n. 2, p. 231-241, 2016 Feb.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 72, n. 9, p. 3666-3670, 1975 Oct.

CASTEELS, K.; MATHIEU, C. Diabetic ketoacidosis. **Review in Endocrine & Metabolic Disorders**. v. 4, n. 2, p. 159-166, 2003 May.

CATTERALL, W. A. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. **Annual Review of Biochemistry**. v. 55, p. 953-985, 1986.

CATTERALL, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**. v. 26, n. 1, p. 13-25, 2000 Apr.

CATTERALL, W. A.; RAMAN, I. M.; ROBINSON, H. P.; SEJNOWSKI, T. J.; PAULSEN, O. The Hodgkin-Huxley heritage: from channels to circuits. **The Journal of Neuroscience**. v. 32, n. 41, p. 14064-14073, 2012 Oct.

CATTERALL, W. A. Structure and function of voltage.-gated sodium channels at atomic resolution. **Experimental Physiology**. v. 99, n. 1, p. 35-51, 2014 Jan.

CÉLÈRIER, E.; LAULIN, J. P.; CORCUFF, J. B.; LE MOAL, M.; SIMONNET, G. Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: a sensitization process. **The Journal of Neuroscience**. v. 21, n. 11, p. 4074-4080, 2001 Jun.

CHAHINE, M.; O'LEARY, M. E. Regulation/Modulation of Sensory Neuron Sodium Channels. In: RUBEN, P. C. (ed). *Voltage Gated Sodium Channels*, Handbook of Experimental Pharmacology, v. 221, p. 111, 2014.

CHANDLER, W. K.; HODGKIN, A. L.; MEVES, H. The effect of changing the internal solution on sodium inactivation and related phenomena in giant axons. **The Journal of Physiology**. v. 180, n. 4, p. 821-836, 1965 Oct.

CHANG, V.; MCCURDY, D.; GORDON, L. K. Etanercept associated optic neuropathy. **Clinical Experimental Ophthalmology**. v. 35, n. 7, p. 680-682, 2007 Sep-Oct.

CHATTOPADHYAY, M.; MATA, M.; FINK, D. J. Continuous delta-opioid receptor activation reduces neuronal voltage-gated sodium channel (NaV1.7) levels through activation of protein kinase C in painful diabetic neuropathy. **The Journal of Neuroscience**. v. 28, n. 26, p. 6652-6658, 2008 Jun.

CHATTOPADHYAY, M.; MATA, M.; FINK, D. J. Vector-mediated release of GABA attenuates pain-related behaviors and reduces Na(V)1.7 in DRG neurons. **European Journal of Pain**. v. 15, n. 9, p. 913-920, 2011 Oct.

CHEN, S.; MUKHERJEE, S.; CHAKRABORTY, C.; CHAKRABARTI, S. High glucose-induced, endothelin-dependent fibronectin synthesis is mediated via NF-kappa B and AP-1. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**. v. 284, n. 2, p. 263-272, 2003 Feb.

CHEN, W.; SHENG, J.; GUO, J.; GAO, F.; ZHAO, X.; DAI, J.; WANG, G.; LI, K. Tumor necrosis factor- α enhances voltage-gated Na⁺ currents in primary culture of mouse cortical neurons. **Journal of Neuroinflammation**. v. 12, n. 126, 2015 Jun.

CHEN, X.; PANG, R. P.; SHEN, K. F.; ZIMMERMANN, M.; XIN, W. J.; LI, Y. Y.; LIU, X. G. TNF- α enhances the currents of voltage gated sodium channels in uninjured dorsal root ganglion neurons following motor nerve injury. **Experimental Neurology**. v. 227, n. 2, p. 279-286, 2011 Feb.

CHENG, K. I.; WANG, H. C.; CHANG, L. L.; WANG, F. Y.; LAI, C. S.; CHOU, C. W.; TSAI, H. P.; KWAN, A. L. Pretreatment with intrathecal amitriptyline potentiates anti-hyperalgesic effects of post-injury intra-peritoneal amitriptyline following spinal nerve ligation. **BMC Neurology**. v. 12, n. 44, 2012 Jun.

CHEVRIER, P.; VIJAYARAGAVAN, K.; CHAHINE, M. Differential modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by the local anesthetic lidocaine. **British Journal of Pharmacology**. v. 142, n. 3, p. 576-584, 2004 Jun.

CHI, X. X.; SCHMUTZLER, B. S.; BRITTAIN, J. M.; WANG, Y.; HINGTGEN, C. M.; NICOL, G. D.; KHANNA, R. Regulation of N-type voltage-gated calcium channels (Cav2.2) and transmitter release by collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) in sensory neurons. **Journal of Cell Science**. v. 122, n. 23, p. 4351-4362, 2009 Dec.

CHUNG, H. H.; YANG, T. T.; CHEN, M. F.; CHOU, M. T.; CHENG, J. T. Improvement of hyperphagia by activation of cerebral I(1)-imidazoline receptors in streptozotocin-induced diabetic mice. **Hormone and Metabolism Research**. v. 44, n. 9, p. 645-649, 2012 Sep.

COSTE, B.; OSORIO, N.; PADILLA, F.; CREST, M.; DELMAS, P. Gating and modulation of presumptive NaV1.9 channels in enteric and spinal sensory neurons. **Molecular and Cellular Neurosciences**. v. 26, n. 1, p. 123-134, 2004 May.

COX, J. J.; REIMANN, F.; NICHOLAS, A. K.; THORNTON, G.; ROBERTS, E.; SPRINGELL, K.; KARBANI, G.; JAFRI, H.; MANNAN, J.; RAASHID, Y.; AL-GAZALI, L.; HAMAMY, H.; VALENTE, E. M.; GORMAN, S.; WILLIAMS, R.; MCHALE, D. P.; WOOD, J. N.; GRIBBLE, F. M.; WOODS, C. G. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature**. v. 444, n. 7121, p. 894-898, 2006 Dec.

COURTEIX, C.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. RP-67580, a specific tachykinin NK1 receptor antagonist, relieves chronic hyperalgesia in diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 241, n. 2-3, p. 267-270, 1993 Sep.

COURTEIX, C.; BARDIN, M.; CHANTELAUZE, C.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Study of the sensitivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics. **Pain**. v. 57, n. 2, p. 153-160, 1994 May.

COWARD, W. R.; OKAYAMA, Y.; SAGARA, H.; WILSON, S. J.; HOLGATE, S. T.; CHURCH, M. K. NF- κ B and TNF- α : a positive autocrine loop in human lung mast cells? **Journal of Immunology**. v. 169, n. 9, p. 5287-5293, 2002 Nov.

CRANER, M. J.; KLEIN, J. P.; RENGANATHAN, M.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. Changes of sodium channel expression in experimental painful diabetic neuropathy. **Annals of Neurology**. v. 52, n. 6, p. 786-792, 2002 Dec.

CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. **The Journal of Neuroscience**. v. 17, n. 10, p. 3503-3514, 1997 May.

CUMMINS, T. R.; HOWE, J. R.; WAXMAN, S. G. Slow closed-state inactivation: a novel mechanism underlying ramp currents in cells expressing the hNE/PN1 sodium channel. **The Journal of Neuroscience**. v. 18, n. 23, p. 9607-9619, 1998 Dec.

CUMMINS, T. R.; AGLIECO, F.; RENGANATHAN, M.; HERZOG, R. I.; DIB-HAJJ, S. D.; WAXMAN, S. G. Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons. **The Journal of Neuroscience**. v. 21, n. 16, p. 5952-5961, 2001 Aug.

CUMMINS, T. R.; SHEETS, P. L.; WAXMAN, S. G. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. **Pain**. v. 131, n. 3, p. 243-257, 2007 Oct.

CZESCHIK, J. C.; HAGENACKER, T.; SCHÄFERS, M.; BÜSSELBERG, D. TNF- α differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. **Neuroscience Letters**. v. 434, n. 3, p. 293-298, 2008 Apr.

DAOUSI, C.; MACFARLANE, I. A.; WOODWARD, A.; NURMIKKO, T. J.; BUNDRED, P. E.; BENBOW, S. J. Chronic painful peripheral neuropathy in an urban

community: a controlled comparison of people with and without diabetes. **Diabetic Medicine**. v. 21, n. 9, p. 976-982, 2004 Sep.

DAVIES, M.; BROPHY, S.; WILLIAMS, R.; TAYLOR, A. The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v. 29, n. 7, p. 1518-1522, 2006 Jul.

DIB-HAJJ, S.; BLACK, J. A.; CUMMINS, T. R.; WAXMAN, SG. NaN/Nav1.9: a sodium channel with unique properties. **Trends in Neuroscience**. v. 25, n. 5, p. 253-259, 2002 May.

DIB-HAJJ, S. D.; CUMMINS, T. R.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. From genes to pain: Na v 1.7 and human pain disorders. **Trends in Neuroscience**. v. 30, n. 11, p. 555-563, 2007 Nov.

DIB-HAJJ, S. D.; CUMMINS, T. R.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. Sodium channels in normal and pathological pain. **Annual Review of Neuroscience**. v. 33, p. 325-347, 2010.

DIB-HAJJ, S. D.; YANG, Y.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. The Na(V)1.7 sodium channel: from molecule to man. **Natura Reviews. Neuroscience**. v. 14, n. 1, p. 49-62, 2013 Jan.

DJOUHRI, L.; NEWTON, R.; LEVINSON, S. R.; BERRY, C. M.; CARRUTHERS, B.; LAWSON, S. N. Sensory and electrophysiological properties of guinea-pig sensory neurones expressing Nav 1.7 (PN1) Na⁺ channel alpha subunit protein. **The Journal of Physiology**. v. 546, n. 2, p. 565-576, 2003 Jan.

DJOUHRI, L.; NEWTON, R.; LEVINSON, S. R.; BERRY, C. M.; CARRUTHERS, B.; LAWSON, S. N. Sensory and electrophysiological properties of guinea-pig sensory neurones expressing Nav 1.7 (PN1) Na⁺ channel alpha subunit protein. **The Journal of Physiology**. v. 546, n. 2, p. 565-576, 2010 Jan.

DONG, X. W.; GOREGOAKER, S.; ENGLER, H.; ZHOU, X.; MARK, L.; CRONA, J.; TERRY, R.; HUNTER, J.; PRIESTLEY, T. Small interfering RNA-mediated selective knockdown of Na(V)1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel reverses mechanical allodynia in neuropathic rats. **Neuroscience**. v. 146, n. 2, p. 812-821, 2007 May.

DOWNS, C. A.; FAULKNER, M. S. Toxic stress, inflammation and symptomatology of chronic complications in diabetes. **World Journal of Diabetes**. v. 15, n. 4, p. 554-565, 2015 May.

DUSTRUDE, E. T.; WILSON, S. M.; JU, W.; XIAO, Y.; KHANNA, R. CRMP2 protein SUMOylation modulates NaV1.7 channel trafficking. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 288, n. 34, p. 24316-24331, 2013 Aug.

DVORNIK, D.; PORTE, D. **Aldose Reductase Inhibition: An Approach to the Prevention of Diabetic Complications**. 1st ed., McGraw-Hill, New York, 1987.

ELLIOTT, A. A.; ELLIOTT, J. R. Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. **The Journal of Physiology**. v. 463, p. 39-56, 1993 Apr.

EMPL, M.; RENAUD, S.; ERNE, B.; FUHR, P.; STRAUBE, A.; SCHAEEREN-WIEMERS, N.; STECK, A. J. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. **Neurology**. v. 56, n. 10, p. 1371-1377, 2001 May.

ENGELMANN, H.; ADERKA, D.; RUBINSTEIN, M.; ROTMAN, D.; WALLACH, D. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 264, n. 20, p. 11974-11980, 1989 Jul.

ENGELMANN, H.; NOVIC, K. D.; WALLACH, D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 265, n. 3, p. 1531-1536, 1990 Jan.

ESPOSITO, K.; NAPPO, F.; MARFELLA, R.; GIUGLIANO, G.; GIUGLIANO, F.; CIOTOLA, M.; QUAGLIARO, L.; CERIELLO, A.; GIUGLIANO, D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. **Circulation**. v. 106, n. 16, p. 2067-2072, 2002 Oct.

ESTACION, M.; WAXMAN, S. G. Nonlinear effects of hyperpolarizing shifts in activation of mutant Nav1.7 channels on resting membrane potential. **Journal of Neurophysiology**. v. 117, n. 4, p. 1702-1712, 2017 Apr.

FAIVRE, A.; FRANQUES, J.; DE PAULA, A. M.; GUTIERREZ, M.; BRET, S.; AUBERT, S.; ATTARIAN, S.; POUGET, J. Acute motor and sensory axonal neuropathy and concomitant encephalopathy during tumor necrosis factor-alpha antagonist therapy. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 15, n. 291, p. 103-106, 2010 Apr.

FAVRE, I.; MOCZYDLOWSKI, E.; SCHILD, L. On the structural basis for ionic selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the voltage-gated sodium channel. **Biophysical Journal**. v. 71, n. 6, p. 3110-3125, 1996 Dec.

FARIAS, V. X.; MACÊDO, F. H.; OQUENDO, M. B.; TOMÉ, A. R.; BÃO, S. N.; CINTRA, D. O.; SANTOS, C. F.; ALBUQUERQUE, A. A.; HEIMARK, D. B.; LARNER, J.; FONTELES, M. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; NASCIMENTO, N. R. Chronic treatment with D-chiro-inositol prevents autonomic and somatic neuropathy in STZ-induced diabetic mice. **Diabetes, Obesity & Metabolism**. v. 13, n. 3, p. 243-250, 2011 Mar.

FERREIRA, L. D.; HUEY, P. U.; PULFORD, B. E.; ISHII, D. N.; ECKEL, R. H. Sciatic nerve lipoprotein lipase is reduced in streptozotocin-induced diabetes and corrected by insulin. **Endocrinology**. v. 143, N. 4, p. 1213-1217, 2002 Apr.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**. v. 18, n. 2, p. 179-190, 1979 Aug.

FISCHER, B. D.; HO, C.; KUZIN, I.; BOTTARO, A.; O'LEARY, M. E. Chronic exposure to tumor necrosis factor in vivo induces hyperalgesia, upregulates sodium

channel gene expression and alters the cellular electrophysiology of dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience Letters**. v. 653, p. 195-201, 2017 Jul.

FITZGERALD, M.; GIBSON, S. The postnatal physiological and neurochemical development of peripheral sensory C fibres. **Neuroscience**. v. 13, n. 3, p. 933-944, 1984 Nov.

FITZGERALD, M. The post-natal development of cutaneous afferent fibre input and receptive field organization in the rat dorsal horn. **The Journal of Physiology**. v. 364, p. 1-18, 1985 Jul.

FITZGERALD, M.; SHAW, A.; MACINTOSH, N. Postnatal development of the cutaneous flexor reflex: comparative study of preterm infants and newborn rat pups. **Developmental Medicine and Child Neurology**. v. 30, n. 4, p. 520-526, 1988 Aug.

FLINT, H.; COTTER, M. A.; CAMERON, N. E. Pentoxifylline effects on nerve conduction velocity and blood flow in diabetic rats. **International Journal of Experimental Diabetes Research**. v. 1, n. 1, p. 49-58, 2000.

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. J.; PFEFFER, K.; LOWENSTEIN, C. J.; SCHREIBER, R.; MAK, T. W.; BLOOM, B. R. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. **Immunity**. v. 2, n. 6, p. 561-572, 1995 Jun.

FORNARO, M.; LEE, J. M.; RAIMONDO, S.; NICOLINO, S.; GEUNA, S.; GIACOBINI-ROBECCHI, M. Neuronal intermediate filament expression in rat dorsal root ganglia sensory neurons: an in vivo and in vitro study. **Neuroscience**. v. 153, n. 4, p. 1153-1163, 2008 Jun.

FOX, A.; EASTWOOD, C.; GENTRY, C.; MANNING, D.; URBAN, L. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. **Pain**. v. 81, n. 3, p. 307-316, 1999 Jun.

FREEMAN, R. New and developing drugs for the treatment of neuropathic pain in diabetes. **Current Diabetes Reports**. v. 13, n. 4, p. 500-508, 2013 Aug.

FUCHS, D.; BIRKLEIN, F.; REEH, P. W.; SAUER, S. K. Sensitized peripheral nociception in experimental diabetes of the rat. **Pain**. v. 151, n. 2, p. 496-505, 2010 Nov.

FUKAO, T.; MITCHELL, G.; SASS, J. O.; HORI, T.; ORII, K.; AOYAMA, Y. Ketone body metabolism and its defects. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v. 37, n. 4, p. 541-551, 2014 Jul.

GALLOWAY, C.; CHATTOPADHYAY, M. Increases in inflammatory mediators in DRG implicate in the pathogenesis of painful neuropathy in Type 2 diabetes. **Cytokine**. v. 63, n. 1, p. 1-5, 2013 Jul.

GARDNER, E. P.; JOHNSON, K. O. Touch. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. (Eds) 5th edition. *Principles of Neural Science*. Nova Iorque, NI: The McGraw-Hill Companies, 2013. p. 498-527

GENEVAY, S.; STINGELIN, S.; GABAY, C. Efficacy of etanercept in the treatment of acute, severe sciatica: a pilot study. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 63, n. 9, p. 1120-1123, 2004 Sep.

GOLDIN, A. L.; BARCHI, R. L.; CALDWELL, J. H.; HOFMANN, F.; HOWE, J. R.; HUNTER, J. C.; KALLEN, R. G.; MANDEL, G.; MEISLER, M. H.; NETTER, Y. B.; NODA, M.; TAMKUN, M. M.; WAXMAN, S. G.; WOOD, J. N.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. **Neuron**. v. 28, n. 2, p. 365-368, 2000 Nov.

GOLDSTEIN, M. E.; HOUSE, S. B.; GAINER, H. NF-L and peripherin immunoreactivities define distinct classes of rat sensory ganglion cells. **Journal of neuronal Research**. v. 30, n. 1, p. 92-104, 1991 Sep.

GONZÁLEZ-CLEMENTE, J. M.; MAURICIO, D.; RICHART, C.; BROCH, M.; CAIXÀS, A.; MEGIA, A.; GIMÉNEZ-PALOP, O.; SIMÓN, I.; MARTÍNEZ-

RIQUELME, A.; GIMÉNEZ-PÉREZ, G.; VENDRELL, J. Diabetic neuropathy is associated with activation of the TNF-alpha system in subjects with type 1 diabetes mellitus. **Clinical Endocrinology**. v. 63, n. 5, p. 525-529, 2005 Nov.

GORE, M.; BRANDENBURG, N. A.; DUKES, E.; HOFFMAN, D. L.; TAI, K. S.; STACEY, B. Pain severity in diabetic peripheral neuropathy is associated with patient functioning, symptom levels of anxiety and depression, and sleep. **Journal of Pain and Symptom Management**. v. 30, n. 4, p. 374-385, 2005 Oct.

GRAFE, P.; BOSTOCK, H.; SCHNEIDER, U. The effects of hyperglycaemic hypoxia on rectification in rat dorsal root axons. **Journal of Physiology**. v. 15, n. 480, p. 297-307, 1994 Oct.

GREENE, D. A.; WINEGRAD, A. I. In vitro studies of the substrates for energy production and the effects of insulin on glucose utilization in the neural components of peripheral nerve. **Diabetes**, v. 28, n. 10, p. 878-887, 1979 Out.

GRELL, M.; DOUNI, E.; WAJANT, H.; LÖHDEN, M.; CLAUSS, M.; MAXEINER, B.; GEORGOPOULOS, S.; LESSLAUER, W.; KOLLIAS, G.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**. v. 83, n. 5, p. 793-802, 1995 Dec.

GUY, H. R.; SEETHARAMULU, P. Molecular model of the action potential sodium channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 88, n. 2, p. 508-512, 1986 Jan.

HAMADA, K.; MATSUURA, H.; SANADA, M.; TOYODA, F.; OMATSU-KANBE, M.; KASHIWAGI, A.; YASUDA, H. Properties of the Na⁺/K⁺ pump current in small neurons from adult rat dorsal root ganglia. **British Journal of Pharmacology**. v. 138, n. 8, p. 1517-1527, 2003 Apr.

HAN, C.; DIB-HAJJ, S. D.; LIN, Z.; LI, Y.; EASTMAN, E. M.; TYRRELL, L.; CAO, X.; YANG, Y.; WAXMAN, S. G. Early- and late-onset inherited erythromelalgia: genotype-phenotype correlation. **Brain**. v. 132, n. 7, p. 1711-1722, 2009 Jul.

HARPER, A. A.; LAWSON, S. N. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. **The Journal of Physiology**. v. 359, p. 31-46, 1985a Feb.

HARPER, A. A.; LAWSON, S. N. Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. **The Journal of Physiology**. v. 359, p. 47-63, 1985b Feb.

HARTY, T. P.; DIB-HAJJ, S. D.; TYRRELL, L.; BLACKMAN, R.; HISAMA, F. M.; ROSE, J. B.; WAXMAN, S. G. Na(V)1.7 mutant A863P in erythromelalgia: effects of altered activation and steady-state inactivation on excitability of nociceptive dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Neuroscience**. v. 26, n. 48, p. 12566-12575, 2006 Nov.

HAYWARD, L. J.; BROWN, R. H. JR.; CANNON, S. C. Inactivation defects caused by myotonia-associated mutations in the sodium channel III-IV linker. **The Journal of General Physiology**. v. 107, n. 5, p. 559-576, 1996 May.

HEINEMANN, S. H.; TERLAU, H.; STÜHMER, W.; IMOTO, K.; NUMA, S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. **Nature**. v. 356, n. 6368, p. 441-443, 1992 Apr.

HENSLEY, K.; VENKOVA, K.; CHRISTOV, A.; GUNNING, W.; PARK, J. Collapsin response mediator protein-2: an emerging pathologic feature and therapeutic target for neurodisease indications. **Molecular Neurobiology**. v. 43 n. 3, p. 180-191, 2011 Jun.

HERZOG, R. I.; CUMMINS, T. R.; GHASSEMI, F.; DIB-HAJJ, S. D.; WAXMAN, S. G. Distinct repriming and closed-state inactivation kinetics of Nav1.6 and Nav1.7 sodium channels in mouse spinal sensory neurons. **The Journal of Physiology**. v. 551, n. 3, p. 741-750, 2003 Sep.

HERR, R. R.; EBLE, T. E.; BERGY, M. E.; JAHNKE, H. K. Isolation and characterization of streptozotocin. **Antibiotics Annual**, v. 7, p. 236-240, 1959-1960.

HILLE, B. Introduction. In:_____. 3rd edition. *Ion channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2001. p. 1-20a

HILLE, B. Sensory transduction and excitable cells. In:_____. 3rd edition. *Ion channels of excitable membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2001. p. 237–268b

HO, C.; O'LEARY, M. E. Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons. **Molecular and Cellular Neurosciences**. v. 46, n. 1, p. 159-166, 2011 Jan.

HO, C.; ZHAO, J.; MALINOWSKI, S.; CHAHINE, M.; O'LEARY, M. E. Differential expression of sodium channel β subunits in dorsal root ganglion sensory neurons. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 287, n. 18, p. 15044-15053, 2012 Apr.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. **The Journal of Physiology**. v. 116, n. 4, p. 449-472, 1952a Apr.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. **The Journal of Physiology**. v. 116, n. 4, p. 473-496, 1952b Apr.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. **The Journal of Physiology**. v. 116, n. 4, p. 497-506, 1952c Apr.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **The Journal of Physiology**. v. 117, n. 4, p. 500-544, 1952d Aug.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F.; KATZ, B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. **The Journal of Physiology**. v. 116, n. 4, p. 424-448, 1952 Apr.

HOFTRIG, J. H.; LEON, K. S.; YATES, A. J.; THIBERT, P. Lipid abnormalities in nervous tissue of the diabetic BB-Wistar rat. *Neurochem. Path.* 1, 265–277, 1983.

HONG, S.; MORROW, T. J.; PAULSON, P. E.; ISOM, L. L.; WILEY, J. W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 28, p. 29341-29350, 2004 Jul.

HU, J.; SONG, Z. Y.; ZHANG, H. H.; QIN, X.; HU, S.; JIANG, X.; XU, G. Y. Colonic Hypersensitivity and Sensitization of Voltage-gated Sodium Channels in Primary Sensory Neurons in Rats with Diabetes. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**. v. 22, n. 1, p. 129-140, 2016 Jan.

HUANG, Y.; ZANG, Y.; ZHOU, L.; GUI, W.; LIU, X.; ZHONG, Y. The role of TNF α /NF- κ B pathway on the up-regulation of voltage-gated sodium channel Nav1.7 in DRG neurons of rats with diabetic neuropathy. **Neurochemistry International**. v. 75 p. 112-119, 2014 Sep.

HUDMON, A.; CHOI, J. S.; TYRRELL, L.; BLACK, J. A.; RUSH, A. M.; WAXMAN, S. G.; DIB-HAJJ, S. D. Phosphorylation of sodium channel Na(v)1.8 by p38 mitogen-activated protein kinase increases current density in dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Neuroscience**. v. 28, n. 12, p. 3190-3201, 2008 Mar.

HUIZINGA, M. M.; ROUMIE, C. L.; ELASY, T. A.; MURFF, H. J.; GREEVY, R.; LIU, X.; SPEROFF, T.; GRIFFIN, M. Changing incident diabetes regimens: a Veterans Administration cohort study from 2000 to 2005. **Diabetes Care**. v. 30, n. 8, p. 85, 2007 Aug.

IWATA, K.; KINOSHITA, M.; YAMADA, S.; IMAMURA, T.; UENOYAMA, Y.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K. Involvement of brain ketone bodies and the

noradrenergic pathway in diabetic hyperphagia in rats. **The Journal of Physiological Sciences**. v. 61, n. 2, p. 103-113, 2011 Mar.

JEON, S. M.; LEE, K. M.; CHO, H. J. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rat dorsal root ganglia and spinal cord in experimental models of neuropathic pain. **Brain Research**. v. 1251, p. 103-111, 2009 Jan.

JIN, X.; GEREAU, R. W. 4th. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of Neurosciences**. v. 26, n. 1, p. 246-255, 2006 Jan.

JOSHI, S. K.; MIKUSA, J. P.; HERNANDEZ, G.; BAKER, S.; SHIEH, C. C.; NEELANDS, T.; ZHANG, X. F.; NIFORATOS, W.; KAGE, K.; HAN, P.; KRAFTE, D.; FALTYNEK, C.; SULLIVAN, J. P.; JARVIS, M. F.; HONORE, P. Involvement of the TTXresistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. **Pain**. v. 123, n. 1-2, p. 75-82, 2006 Jul.

JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; ORCI, L.; PICTET, R.; GONET, A. E.; RENOLDS, A. E. Studies of diabetogenic action of streptozotocin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 126, n. 1, p. 201-205, 1967 Out.

JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A. E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **The journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 11, p. 2129-2139, 1969 Nov.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews. Rheumatology**. v. 12, n. 1, p. 49-62, 2016 Jan.

KAMEI, J.; OGAWA, M.; KASUYA, Y. Development of supersensitivity to substance P in the spinal cord of the streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v. 35, n. 2, p. 473-475, 1990 Feb.

KASANICKI, M. A.; PILCH, P. F. Regulation of glucose-transporter function. **Diabetes Care**, v. 13, n. 3, p. 219-227, 1990 Mar.

KATO, K.; LIU, H.; KIKUCHI, S.; MYERS, R. R.; SHUBAYEV, V. I. Immediate anti-tumor necrosis factor-alpha (etanercept) therapy enhances axonal regeneration after sciatic nerve crush. **Journal of Neuroscience Research**. v. 1, n. 88, p. 360-368, 2010 Feb.

KAWAKAMI, M.; CERAMI, A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 154, n. 3, p. 631-639, 1981 Sep.

KAYSER, V.; BASBAUM, A.; GUILBAUD, G. Deafferentation in the rat increases mechanical nociceptive threshold in the innervated limbs. **Brain Research**. v. 508, n. 2, p. 329-332, 1990 Feb.

KHANNA, R.; WILSON, S. M.; BRITTAIN, J. M.; WEIMER, J.; SULTANA, R.; BUTTERFIELD, A.; HENSLEY, K. Opening Pandora's jar: a primer on the putative roles of CRMP2 in a panoply of neurodegenerative, sensory and motor neuron, and central disorders. **Future Neurology**. v. 7, n. 6, p. 749-771, 2012 Nov.

KHOMULA, E. V.; VIATCHENKO-KARPINSKI, V. Y.; BORISYUK, A. L.; DUZHYY, D. E.; BELAN, P. V.; VOITENKO, N. V. Specific functioning of Cav3.2 T-type calcium and TRPV1 channels under different types of STZ-diabetic neuropathy. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1832, n. 5, p. 636-649, 2013 May.

KIM, B.; FELDMAN, E. L. Insulin resistance in the nervous system. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 23, n. 3, p. 133-141, 2012 Mar.

KLUGBAUER, N.; LACINOVA, L.; FLOCKERZI, V.; HOFMANN, F. Structure and functional expression of a new member of the tetrodotoxin-sensitive voltage-activated sodium channel family from human neuroendocrine cells. **The EMBO Journal**. v. 14, n. 6, p. 1084-1090, 1995 Mar.

KOHNO, T.; BREWER, M. T.; BAKER, S. L.; SCHWARTZ, P. E.; KING, M. W.; HALE, K. K.; SQUIRES, C. H.; THOMPSON, R. C.; VANNICE, J. L. A second tumor necrosis factor receptor gene product can shed a naturally occurring tumor necrosis factor inhibitor. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America**. v. 87, n. 21, p. 8331-8335, 1990 Nov.

KRIEGLER, M.; PEREZ, C.; DEFAY, K.; ALBERT, I.; LU, S. D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. **Cell**. v. 53, n. 1, p. 45-53, 1988 Sep.

KRUGER, L.; PERL, E. R.; SEDIVEC, M. J. Fine structure of myelinated mechanical nociceptor endings in cat hairy skin. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 198, n. 1, p. 137-154, 1981 May.

KRUGER, L.; LIGHT, A. R.; SCHWEIZER, F. E. Axonal terminals of sensory neurons and their morphological diversity. **Journal of Neurocytology**. v. 32, n. 3, p. 205-216, 2003 Mar.

KUMAR, J. S.; MENON, V. P. Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. **Metabolism**. v. 42, n. 11, p. 1435-1439, 1993 Nov.

KUO, D. Y. Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) and the attenuation of hyperphagia in streptozotocin diabetic rats treated with dopamine D1/D2 agonists. **British Journal of Pharmacology**. v. 148, n. 5, p. 640-647, 2006 Jul.

LAWSON, S. N.; PERRY, M. J.; PRABHAKAR, E.; MCCARTHY, P. W. Primary sensory neurones: neurofilament, neuropeptides, and conduction velocity. **Brain Research Bulletin**. v. 30, n. 3-4, p. 239-243, 1993.

LAWSON, S. N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Adelta- or Aalpha/beta-fibres. **Experimental Physiology**. v. 87, n. 2, p. 239-244, 2002 Mar.

LEE, K. H.; CHUNG, K.; CHUNG, J. M.; COGGESHALL, R. E. Correlation of cell body size, axon size, and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 243, n. 3, p. 335-346, 1986 Jan.

LEE, Y.; KIM, H.; CHOI, H. S.; KANG, B. H.; HAN, Y. B.; KIM, S. J. Effects of water extract of 1:1 mixture of Phellodendron cortex and Aralia cortex on polyol pathway and oxidative damage in lenses of diabetic rats. **Phytotherapy Research**. v. 13, n. 7, p. 555-560, 1999 Nov.

LEE, Y. F.; LIN, C. C.; CHEN, G. S. Temporal course of streptozotocin-induced diabetic polyneuropathy in rats. **Neurological Sciences**. v. 35, n. 11, p. 1813-1820, 2014 Nov.

LEEM, J. W.; WILLIS, W. D.; CHUNG, J. M. Cutaneous sensory receptors in the rat foot. **The Journal of Neurophysiology**. v. 69, n. 5, p. 1684-1699, 1993 May.

LEGER, L.; CHARNAY, Y.; DANGER, J. M.; VAUDRY, H.; PELLETIER, G.; DUBOIS, P. M.; JOUVET, M. Mapping of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the feline hypothalamus and hypophysis. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 8, n. 255, p. 283-292, 1987 Jan.

LEO, M.; ARGALSKI, S.; SCHÄFERS, M.; HAGENACKER, T. Modulation of Voltage-Gated Sodium Channels by Activation of Tumor Necrosis Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Small DRG Neurons of Rats. **Mediators of Inflammation**. v. 2015, 2015.

LEWIN, G. R.; MOSHOURAB, R. Mechanosensation and pain. **Journal of Neurobiology**. v. 61, n. 1, p. 30-44, 2004 Oct.

LI, R.; UTTARWAR, L.; GAO, B.; CHARBONNEAU, M.; SHI, Y.; CHAN, J. S.; DUBOIS, C. M.; KREPINSKY, J. C. High Glucose Up-regulates ADAM17 through HIF-1 α in Mesangial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 290, n. 35, p. 21603-216014, 2015 Aug.

LIEBESKIND, B. J. Evolution of sodium channels and the new view of early nervous system evolution. **Communicative & Integrative Biology**. v. 4, n. 6, p. 679-683, 2011 Nov.

LIEBESKIND, B. J.; HILLIS, D. M.; ZAKON, H. H.; HOFMANN, H. A. Complex Homology and the Evolution of Nervous Systems. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 31, n. 2, p. 129-135, 2016 Feb.

LIPKIND, G. M.; FOZZARD, H. A. Voltage-gated Na channel selectivity: the role of the conserved domain III lysine residue. **The Journal of General Physiology**. v. 131, n. 6, p. 523-529, 2008 Jun.

LIU, I. M.; CHI, T. C.; CHENG, J. T. Decrease of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by vanadyl sulfate in streptozotocin-induced diabetic rats. **Hormone and Metabolism Research**. v. 33, n. 2, p. 96-100, 2001 Feb.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**. v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001 Feb.

LU, Y.; LIN, B.; ZHONG, J. The therapeutic effect of dexmedetomidine on rat diabetic neuropathy pain and the mechanism. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. Ahead of print, 2017 Jun.

LYNN, B.; CARPENTER, S. E. Primary afferent units from the hairy skin of the rat hind limb. **Brain Research**. v. 238, n. 1, p. 29-43, 1982 Apr.

MAGNANI, P.; CHERIAN, P. V.; GOULD, G. W.; GREENE, D. A.; SIMA, A. A.; BROSIUS, F. C. 3RD. Glucose transporters in rat peripheral nerve: paranodal expression of GLUT1 and GLUT3. **Metabolism: Clinical and Experimental**. v. 45, n. 12, p. 1466-1473, 1996 Dez.

MALCANGIO, M.; TOMLINSON, D. R. A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. **Pain**. v. 76, n. 1-2, p. 151-157, 1998 May.

MANSCHOT, S. M.; GISPEN, W. H.; KAPPELLE, L. J.; BIESSELS, G. J. Nerve conduction velocity and evoked potential latencies in streptozotocin-diabetic rats: effects of treatment with an angiotensin converting enzyme inhibitor. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. v. 19, n. 6, p. 469-477, 2003 Nov-Dec.

MARCHAND, F.; TSANTOULAS, C.; SINGH, D.; GRIST, J.; CLARK, A. K.; BRADBURY, E. J.; MCMAHON, S. B. Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury. **European Journal of Pain**. v. 13, n. 7, p. 673-681, 2009 Aug.

MARLOW, H.; ARENDT, D. Evolution: ctenophore genomes and the origin of neurons. **Current Biology**. v. 24, n. 16, p. 757-761, 2014 Aug.

MARTIN, C. L.; ALBERS, J. W.; POP-BUSUI, R.; DCCT/EDIC RESEARCH GROUP. Neuropathy and related findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. **Diabetes Care**. v. 37, n. 1, p. 31-38, 2014.

MASER, R. E.; STEENKISTE, A. R.; DORMAN, J. S.; NIELSEN, V. K.; BASS, E. B.; MANJOO, Q.; DRASH, A. L.; BECKER, D. J.; KULLER, L. H.; GREENE, D. A.; ORCHARD, T. J. Epidemiological correlates of diabetic neuropathy. Report from Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. **Diabetes**. v. 38, n. 11, p. 1456-1461, 1989 Nov.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Medicine**. v. 3, n. 11, p. 442, 2006 Nov.

MCCUSKER, E. C.; BAGNÉRIS, C.; NAYLOR, C. E.; COLE, A. R.; D'AVANZO, N.; NICHOLS, C. G.; WALLACE, B. A. Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. **Nature Communications**. v. 3, n. 1102, 2012.

MCPHEE, J. C.; RAGSDALE, D. S.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast

inactivation. **The Journal of Biochemical Chemistry**. v. 270, n. 20, p. 12025-12034, 1995 May.

MCPHEE, J. C.; RAGSDALE, D. S.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. **The Journal of Biochemical Chemistry**. v. 273, n. 2, p. 1121-1129, 1998 Jan.

MERCER, R. E.; CHEE, M. J.; COLMERS, W. F. The role of NPY in hypothalamic mediated food intake. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v. 32, n. 4, p. 398-415, 2011 Oct.

MOORE, S. A.; PETERSON, R. G.; FELTEN, D. L.; O'CONNOR, B. L. A quantitative comparison of motor and sensory conduction velocities in short- and long-term streptozotocin- and alloxan-diabetic rats. **Journal of Neurological Sciences**. v. 48, n. 1, p. 133-152, 1980 Oct.

MOSS, M. L.; JIN, S. L.; MILLA, M. E.; BICKETT, D. M.; BURKHART, W.; CARTER, H. L.; CHEN, W. J.; CLAY, W. C.; DIDSBURY, J. R.; HASSLER, D.; HOFFMAN, C. R.; KOST, T. A.; LAMBERT, M. H.; LEESNITZER, M. A.; MCCAULEY, P.; MCGEEHAN, G.; MITCHELL, J.; MOYER, M.; PAHEL, G.; ROCQUE, W.; OVERTON, L. K.; SCHOENEN, F.; SEATON, T.; SU, J. L.; BECHERER, J. D. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. **Nature**. v. 385, n. 6618, p. 733-736, 1997 Feb.

NEMOTO, T.; MIYAZAKI, S.; KANAI, T.; MARUTA, T.; SATOH, S.; YOSHIKAWA, N.; YANAGITA, T.; WADA, A. Nav1.7-Ca²⁺ influx-induced increased phosphorylations of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 attenuate tau phosphorylation via glycogen synthase kinase-3beta: priming of Nav1.7 gating by ERK and p38. **European Journal of Pharmacology**. v. 640, n. 1-3, p. 20-28, 2010 Aug.

NI, G. L.; CUI, R.; SHAO, A. M.; WU, Z. M. Salidroside ameliorates diabetic neuropathic pain in rats by inhibiting neuroinflammation. **Journal of Molecular Neuroscience**. Ahead of print, 2017 Jul.

NOPHAR, Y.; KEMPER, O.; BRAKEBUSCH, C.; ENGLEMAN, H.; ZWANG, R.; ADERKA, D.; HOLTSMANN, H.; WALLACH, D. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor. **The EMBO Journal**. v. 9, n. 10, p. 3269-3278, 1990 Oct.

NUNES, E. A.; MEDEIROS, L. F.; DE FREITAS, J. S.; MACEDO, I. C.; KUO, J.; DE SOUZA, A.; ROZISKY, J. R.; CAUMO, W.; TORRES, I. L. S.; Morphine exposure during early life alters thermal and mechanical thresholds in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 60, p. 78-85, 2017 Aug.

NYENGAARD, J. R.; IDO, Y.; KILO, C.; WILLIAMSON, J. R. Interactions between hyperglycemia and hypoxia: implications for diabetic retinopathy. **Diabetes**. v. 53, n. 11, p. 2931-2938, 2004 Nov.

OGATA, N.; TATEBAYASHI, H. Kinetic analysis of two types of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglia. **The Journal of Physiology**. v. 466, p. 9-37, 1993 Jul.

OLSSON, I.; LANTZ, M.; NILSSON, E.; PEETRE, C.; THYSELL, H.; GRUBB, A.; ADOLF, G. Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine. **European Journal of Haematology**. v. 42, n. 3, p. 270-275, 1989 Mar.

O'MALLEY, W. E.; ACHINSTEIN, B.; SHEAR, M. J. Journal of the National Cancer Institute, Vol. 29, 1962: Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. **Nutrition Reviews**. v. 46, n. 11, p. 389-391, 1988 Nov.

ORTSMANN, K. L.; CHATTOPADHYAY, M. Decrease in neuroimmune activation by HSV-mediated gene transfer of TNF α soluble receptor alleviates pain in rats with diabetic neuropathy. **Brain, Behavior and Immunity**. v. 41, p. 144-151. 2014 Oct.

OSSIPOV, M. H.; BIAN, D.; MALAN, T. P. JR.; LAI, J.; PORRECA, F. Lack of involvement of capsaicin-sensitive primary afferents in nerve-ligation injury induced tactile allodynia in rats. **Pain**. v. 79, n. 2-3, p. 127-133, 1999 Feb.

OZAKTAY, A. C.; KALLAKURI, S.; TAKEBAYASHI, T.; CAVANAUGH, J. M.; ASIK, I.; DELEO, J. A.; WEINSTEIN, J. N. Effects of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor on sensitivity of dorsal root ganglion and peripheral receptive fields in rats. **Europe Spine Journal**. v. 15, n. 10, p. 1529-1537, 2006 Oct.

OZAWA, Y.; KURIHARA, T.; SASAKI, M.; BAN, N.; YUKI, K.; KUBOTA, S.; TSUBOTA, K. Neural degeneration in the retina of the streptozotocin-induced type 1 diabetes model. **Experimental Diabetes Research**, 2011 Nov.

PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E. A.; MOLDAWER, L. L. Anti-TNF α therapies: the next generation. **Nature Reviews. Drug Discovery**. v. 2, n. 9, p. 736-746, 2003 Sep.

PALMER, B. F.; CLEGG, D. J. Electrolyte and Acid-Base Disturbances in Diabetes Mellitus. **The New English Journal of Medicine**. v. 373, n. 25, p. 2482-2483, 2015 Dec.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**. v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010 Sep.

PATAPOUTIAN, A.; PEIER, A. M.; STORY, G. M.; VISWANATH, V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. **Nature Reviews. Neuroscience**. v. 4, n. 7, p. 529-539, 2003 Jul.

PAYANDEH, J.; SCHEUER, T.; ZHENG, N.; CATTERALL, W. A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. **Nature**. v. 475, n. 7356, p. 353-358, 2011 Jul.

PAYANDEH, J.; GAMAL EL-DIN, T. M.; SCHEUER, T.; ZHENG, N.; CATTERALL, W. A. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. **Nature**. v. 486, n. 7401, p. 135-139, 2012 May.

PEDROSA, H. C. Capítulo 02 – Neuropatia diabética periférica, 2014. Disponível em: < <http://www.diabetes.org.br/ebook/component/k2/item/39-neuropatia-diabetica-periferica> >. Acesso em: 10 de mai. 2017.

PENNICA, D.; HAYFLICK, J. S.; BRINGMAN, T. S.; PALLADINO, M. A.; GOEDEL, D. V. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 82, n. 18, p. 6060-6064, 1985 Sep.

PERSSON, A. K.; GASSER, A.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. Nav1.7 accumulates and co-localizes with phosphorylated ERK1/2 within transected axons in early experimental neuromas. **Experimental Neurology**. v. 230, n. 2, p. 273-279, 2011 Aug.

PFEFFER, K.; MATSUYAMA, T.; KUNDIG, T. M.; WAKEHAM, A.; KISHIHARA, K.; SHAHINIAN, A.; WIEGMANN, K.; OHASHI, P. S.; KRÖNKE, M.; MAK, T. W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. **Cell**. v. 73, n. 3, p. 457–467, 1993 May.

PHILLIPS, L. K.; PRINS, J. B. The link between abdominal obesity and the metabolic syndrome. **Current Hypertension Reports**. v. 10, n. 2, p. 156–164, 2008 Apr.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A. JR.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**. v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017 Jan.

POP-BUSUI, R.; LU, J.; BROOKS, M. M.; ALBERT, S.; ALTHOUSE, A. D.; ESCOBEDO, J.; GREEN, J.; PALUMBO, P.; PERKINS, B. A.; WHITEHOUSE, F.; JONES, T. L.; BARI 2D STUDY GROUP. Impact of glycemic control strategies on the progression of diabetic peripheral neuropathy in the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes (BARI 2D) Cohort. **Diabetes Care**. v. 36, n. 10, p. 3208–3215, 2013 Oct.

POP-BUSUI, R.; BOULTON, A. J.; FELDMAN, E. L.; BRIL, V.; FREEMAN, R.; MALIK, R. A.; SOSENKO, J. M.; ZIEGLER, D. Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 40, n. 1, p. 136-154, 2017 Jan.

PORTH, C. M. Diabetes Mellitus and the Metabolic Syndrome. In: _____. *Essentials of Pathophysiology Concepts of Altered Health States*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer, 2015. p. 805.

PURVES, T.; MIDDLEMAS, A.; AGTHONG, S.; JUDE, E. B.; BOULTON, A. J.; FERNYHOUGH, P.; TOMLINSON, D. R. A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. **FASEB Journal**. v. 15, n. 13, p. 2508-2514, 2001 Nov.

PURWATA, T. E. High TNF-alpha plasma levels and macrophages iNOS and TNF-alpha expression as risk factors for painful diabetic neuropathy. **Journal of Pain Research**. v. 4, p. 169-175, 2011 Jun.

QIU, H.; NOVIKOV, A.; VALLON, V. Ketosis and diabetic ketoacidosis in response to SGLT2 inhibitors: Basic mechanisms and therapeutic perspectives. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. v. 33, n. 5, 2017 Jul.

QU, S. Y.; YANG, Y. K.; LI, J. Y.; ZENG, Q.; GANTZ, I. Agouti-related protein is a mediator of diabetic hyperphagia. **Regulatory Peptides**. v. 98, n. 1-2, p. 69-75, 2001 Apr.

QUATTRINI, C.; TESFAYE, S. Understanding the impact of painful diabetic neuropathy. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. v. 19, Suppl 1:S2-8, 2003 Jan-Feb.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARNI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 29, p. 91-98, 1963 May.

RAMANA, K. V.; CHANDRA, D.; SRIVASTAVA, S.; BHATNAGAR, A.; SRIVASTAVA, S. K. Nitric oxide regulates the polyol pathway of glucose metabolism in vascular smooth muscle cells. **FASEB Journal**. v. 17, n. 3, p. 417-425, 2003 Mar.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archive of International Pharmacodynamics and Therapeutics**. v. 111, p. 409–419, 1957.

REDDY, A. B.; RAMANA, K. V.; SRIVASTAVA, S.; BHATNAGAR, A.; SRIVASTAVA, S. K. Aldose reductase regulates high glucose-induced ectodomain shedding of tumor necrosis factor (TNF)-alpha via protein kinase C-delta and TNF-alpha converting enzyme in vascular smooth muscle cells. **Endocrinology**. v. 150, n. 1, p. 63-74, 2009 Jan.

REYNOLDS, M. L.; FITZGERALD, M. Long-term sensory hyperinnervation following neonatal skin wounds. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 358, n. 4, p. 487-498, 1995 Aug.

RICHEZ, C.; BLANCO, P.; LAGUENY, A.; SCHAEVERBEKE, T.; DEHAIS, J. Neuropathy resembling CIDP in patients receiving tumor necrosis factor-alpha blockers. **Neurology**. v. 26, n. 64, p. 1468-1470, 2005 Apr.

RICHMOND, J. E.; FEATHERSTONE, D. E.; HARTMANN, H. A.; RUBEN, P. C. Slow inactivation in human cardiac sodium channels. **Biophysical Journal**. v. 74, n. 6, p. 2945-2952, 1998 Jun.

RIRIE, D. G.; VERNON, T. L.; TOBIN, J. R.; EISENACH, J. C. Age-dependent responses to thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in a rat model of acute postoperative pain. **Anesthesiology**. v. 99, n. 2, p. 443-448, 2003 Aug.

RIVAT, C.; RICHEBÉ, P.; LABOUREYRAS, E.; LAULIN, J. P.; HAVOUIIS, R.; NOBLE, F.; MOULINOX, J. P.; SIMONNET, G. Polyamine deficient diet to relieve pain hypersensitivity. **Pain**. v. 137, n. 1, p. 125-137, 2008 Jul.

ROBINSON, A. M.; WILLIAMSON, D. H. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. **Physiological Reviews**. v. 60, n. 1, p. 143-187, 1980 Jan.

ROMANOVSKY, D.; HASTINGS, S. L.; STIMERS, J. R.; DOBRETSOV, M. Relevance of hyperglycemia to early mechanical hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetes. **Journal of Peripheral Nervous System**. v. 9, n. 2, p. 62-69, 2004 Jun.

ROY, M. L.; NARAHASHI, T. Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Neuroscience**. v. 12, n. 6, p. 2104-2111, 1992 Jun.

RUSH, A. M.; CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Physiology**. v. 579, n. 1, p. 1-14, 2007 Feb.

RUSSO, C.; POLOSA, R. TNF-alpha as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. **Clinical Science**. v. 109, n. 2, p. 135-142, 2005 Aug.

SAHU, A.; SNINSKY, C. A.; KALRA, S. P. Evidence that hypothalamic neuropeptide Y gene expression and NPY levels in the paraventricular nucleus increase before the onset of hyperphagia in experimental diabetes. **Brain Research**. v. 755, n. 2, p. 339-342, 1997 May.

SAID, G. Diabetic neuropathy: an update. **Journal of Neurology**. v. 243, n. 6, p. 431-440, 1996 Jun.

SANGAMESWARAN, L.; FISH, L. M.; KOCH, B. D.; RABERT, D. K.; DELGADO, S. G.; ILNICKA, M.; JAKEMAN, L. B.; NOVAKOVIC, S.; WONG, K.; SZE, P.; TZOUMAKA, E.; STEWART, G. R.; HERMAN, R. C.; CHAN, H.; EGLIN, R. M.; HUNTER, J. C. A novel tetrodotoxin-sensitive, voltage-gated sodium channel expressed in rat and human dorsal root ganglia. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 23, p. 14805-14809, 1997 Jun.

SATIN, J.; KYLE, J. W.; CHEN, M.; BELL, P.; CRIBBS, L. L.; FOZZARD, H. A.; ROGART, R. B. A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. **Science**. v. 256, n. 5060, p. 1202-1205, 1992 May.

SCHALL, T. J.; LEWIS, M.; KOLLER, K. J.; LEE, A.; RICE, G. C.; WONG, G. H.; GATANAGA, T.; GRANGER, G. A.; LENTZ, R.; RAAB, H. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. **Cell**. v. 61, n. 2, p. 361-370, 1990 Apr.

SCHLAEPFER, W. W.; BUNGE, R. P. Effects of calcium ion concentration on the degeneration of amputated axons in tissue culture. **Journal of Cell Biology**. v. 59, n. 2, p. 456-470, 1973 Nov.

SCHMIDT, R. E.; DORSEY, D. A.; BEAUDET, L. N.; PARVIN, C. A.; ZHANG, W.; SIMA, A. A. Experimental rat models of types 1 and 2 diabetes differ in sympathetic neuroaxonal dystrophy. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**. v. 63, n. 5, p. 450-460, 2004 May.

SCHNEDL, W. J.; FERBER, S.; JOHNSON, J. H.; NEWGARD, C. B. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes**, v. 43, n. 11, p. 1326-1333, 1994 Nov.

SCHREIBER, A. K.; NONES, C. F.; REIS, R. C.; CHICHORRO, J. G.; CUNHA, J. M.; Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. **World Journal of Diabetes**. v. 15, n. 3, p. 432-444, 2015 Apr.

SECKINGER, P.; ISAAZ, S.; DAYER, J. M. Purification and biologic characterization of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 264, n. 20, p. 11966-11976, 1989 Jul.

SHUTOV, L.; KRUGLIKOV, I.; GRYSHCHENKO, O.; KHOMULA, E.; VIATCHENKO-KARPINSKI, V.; BELAN, P.; VOITENKO, N. The effect of nimodipine on calcium homeostasis and pain sensitivity in diabetic rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**. v. 26, n. 7-8, p. 1541-1557, 2006 Oct-Nov.

SIVILOTTI, L.; OKUSE, K.; AKOPIAN, A. N.; MOSS, S.; WOOD, J. N. A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS. **FEBS Letters**. v. 409, n. 1, p. 49-52, 1997 Jun.

SLEIGH, J. N.; WEIR, G. A.; SCHIAVO, G. A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia. **BMC Research Notes**. v. 9, n. 82, 2016 Feb.

SMITH, M. R.; GOLDIN, A. L. Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. **Biophysical Journal**. v. 73, n. 4, p. 1885-1895, 1997 Out.

SPICAROVA, D.; NERANDZIC, V.; PALECEK, J. Modulation of spinal cord synaptic activity by tumor necrosis factor α in a model of peripheral neuropathy. **Journal of Neuroinflammation**. v. 8, n. 177, 2011 Dec.

STAMBOULIAN, S.; CHOI, J. S.; AHN, H. S.; CHANG, Y. W.; TYRRELL, L.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G.; DIB-HAJJ, S. D. ERK1/2 mitogen-activated protein kinase phosphorylates sodium channel Na(v)1.7 and alters its gating properties. **The Journal of Neuroscience**. v. 30, n. 5, p. 1637-1647, 2010 Feb.

STEVENS, M. J.; ZHANG, W.; LI, F.; SIMA, A. A. C-peptide corrects endoneurial blood flow but not oxidative stress in type 1 BB/Wor rats. **American Journal of Physiological Endocrinology and Metabolism**. v. 287, n. 3, p. 497-505, 2004 Sep.

STEWART, M. A.; SHERMAN, W. R.; KURIEN, M. M.; MOONSAMMY, G. I.; WISGERHOF, M. Polyol accumulations in nervous tissue of rats with experimental diabetes and galactosaemia. **Journal of Neurochemistry**. v. 14, n. 11, p.1057-1066, 1967 Nov.

SUGIMOTO, K.; BABA, M.; SUZUKI, S.; YAGIHASHI, S. The impact of low-dose insulin on peripheral nerve insulin receptor signaling in streptozotocin-induced diabetic rats. **PLoS One**. v. 30, n. 8, p. 74247, 2013 Aug.

SUN, W.; MIAO, B.; WANG, X. C.; DUAN, J. H.; WANG, W. T.; KUANG, F.; XIE, R. G.; XING, J. L.; XU, H.; SONG, X. J.; LUO, C.; HU, S. J. Reduced conduction failure of the main axon of polymodal nociceptive C-fibres contributes to painful diabetic neuropathy in rats. **Brain**. v. 135, n. 2, p. 359-375, 2012 Feb.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Prostaglandin effects after elimination of indirect hyperalgesic mechanisms in the skin of the rat. **Brain Research**. v. 492, n. 1-2, p. 397-399, 1989 Jul.

TAMURA, R.; NEMOTO, T.; MARUTA, T.; ONIZUKA, S.; YANAGITA, T.; WADA, A.; MURAKAMI, M.; TSUNEYOSHI, I. Up-regulation of NaV1.7 sodium channel expression by tumor necrosis factor- α in cultured bovine adrenal chromaffin cells and rat dorsal root ganglion neurons. **Anesthesia and Analgesia**. v. 118, n. 2, p. 318-324, 2014 Feb.

TANAKA, T.; MINAMI, M.; NAKAGAWA, T.; SATOH, M. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. **Neuroscience Research**. v. 48, n. 4, p. 463-469, 2004 Apr.

TESFAYE, S.; STEVENS, L. K.; STEPHENSON, J. M.; FULLER, J. H.; PLATER, M.; IONESCU-TIRGOVISTE, C.; NUBER, A.; POZZA, G.; WARD, J. D. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. **Diabetologia**. v. 39, n. 11, p. 1377-1384, 1996 Nov.

TESFAYE, S.; CHATURVEDI, N. EATON, S. E.; WARD, J. D.; MANES, C.; IONESCU-TIRGOVISTE, C.; WITTE, D. R.; FULLER, J. H.; EURODIAB PROSPECTIVE COMPLICATIONS STUDY GROUP. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. **New England Journal Medicine**. v. 352, n. 3, p. 341-350, 2005 Jan.

TESFAYE, S.; BOULTON, A. J.; DICKENSON, A. H. Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. **Diabetes Care**. v. 36, n. 9, p. 2456-2465, 2013 Sep.

THULESEN, J.; ORSKOV, C.; HOLST, J. J.; POULSEN, S. S. Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. **Endocrinology**, v. 138, n.1, p. 62-68, 1997 Jan.

TODD, A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Review. Neuroscience**. v. 11, n. 12, p. 823-836, 2010 Dec.

TOLEDO-ARAL, J. J.; MOSS, B. L.; HE, Z. J.; KOSZOWSKI, A. G.; WHISENAND, T.; LEVINSON, S. R.; WOLF, J. J.; SILOS-SANTIAGO, I.; HALEGOUA, S.; MANDEL, G. Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 94, n. 4, p. 1527-1532, 1997 Feb.

TUCK, R. R.; SCHMELZER, J. D.; LOW, P. A. Endoneurial blood flow and oxygen tension in the sciatic nerves of rats with experimental diabetic neuropathy. **Brain**. v. 107, p. 935-950, 1984 Sep.

UÇEYLER, N.; ROGAUSCH, J. P.; TOYKA, K. V.; SOMMER, C. Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. **Neurology**. v. 69, n. 1, p. 42-49, 2007 Jul.

UÇEYLER, N.; SOMMER, C. Status of immune mediators in painful neuropathies. **Current Pain and Headache Reports**. v. 12, n. 3, p.159-164, 2008 Jun.

UÇEYLER, N.; SCHÄFERS, M.; SOMMER, C. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. **Experimental Brain Research**. v. 196, n. 1, p. 67-78, 2009 Jun.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of

complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**. v. 352, n. 9131, p. 837-853, 1998 Sep.

VAN ZEE, K. J.; KOHNO, T.; FISCHER, E.; ROCK, C. S.; MOLDAWER, L. L.; LOWRY, S. F. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America**. v. 89, n. 11, p. 4845-4849, 1992 Jun.

VANDENABEELE, P.; DECLERCQ, W.; BEYAERT, R.; FIERIS, W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. **Trends in Cell Biology**. v. 5, n. 10, p. 392-399, 1995 Oct.

VASSILEV, P. M.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W. A. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. **Science**. v. 241, n. 4873, p. 1658-1661, 1988 Sep.

VELOSO, C. A.; FERNANDES, J. S.; VOLPE, C. M.; FAGUNDES-NETTO, F. S.; REIS, J. S.; CHAVES, M. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A. TLR4 and RAGE: similar routes leading to inflammation in type 2 diabetic patients. **Diabetes & Metbolism**. v. 37, n. 4, p. 336-342, 2011 Sep.

VIJAYARAGAVAN, K.; O'LEARY, M. E.; CHAHINE, M. Gating properties of Na(v)1.7 and Na(v)1.8 peripheral nerve sodium channels. **The Journal of Neuroscience**. v. 21, n. 20, p. 7909-7918, 2001 Oct.

VIJAYARAGAVAN, K.; BOUTJDIR, M.; CHAHINE, M. Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C. **Journal of Neurophysiology**. v. 91, n. 4, p. 1556-1569, 2004 Apr.

VON JAGOW, B.; KOHNEN, T. Anterior optic neuropathy associated with adalimumab. **Ophthalmologica**. v. 222, n. 4, p. 292-294, 2008.

WAJANT, H.; HENKLER, F.; SCHEURICH, P. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. **Cell Signalling**. v. 13, n. 6, p. 389-400, 2001 Jun.

WALLACH, D.; ENGELMANN, H.; NOPHAR, Y.; ADERKA, D.; KEMPER, O.; HORNIK, V.; HOLTMANN, H.; BRAKEBUSCH, C. Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. **Agents and Actions. Supplements**. v. 35, p. 51-57, 1991.

WAXMAN, S. G.; RANSOM, B. R.; STYS, P. K. Non-synaptic mechanisms of Ca(2+)-mediated injury in CNS white matter. **Trends in Neuroscience**. v. 14, n. 10, p. 461-468, 1991 Oct.

WAXMAN, S. G.; DIB-HAJJ, S. Erythralgia: molecular basis for an inherited pain syndrome. **Trends in Molecular Medicine**. v. 11, n. 12, p. 555-562, 2005 Dec.

WEIS, J.; DIMPFEL, W.; SCHRÖDER, J. M. Nerve conduction changes and fine structural alterations of extra- and intrafusal muscle and nerve fibers in streptozotocin diabetic rats. **Muscle & Nerve**. v. 18, n. 2, p. 175-184, 1995 Feb.

WEST, J. W.; PATTON, D. E.; SCHEUER, T.; WANG, Y.; GOLDIN, A. L.; CATTERALL, W. A. A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America**. v. 89, n. 22, p. 10910-10914, 1992 Nov.

WIEMANN, B.; STARNES, C. O. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. **Pharmacology & therapeutics**. v. 64, n. 3, p. 529-564, 1994.

WOOLF, C. J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. **British Journal of Pharmacology**. v. 121, n. 3, p. 417-424, 1997 Jun.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases**, 2014a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012**, 2014b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/. Acesso em: 09/09/2015.

WRIGHT, A.; NUKADA, H. Sciatic nerve morphology and morphometry in mature rats with streptozocin-induced diabetes. **Acta Neuropathologica**. v. 88, n. 6, p. 571-578, 1994.

WUARIN-BIERMAN, L.; ZAHND, G. R.; KAUFMANN, F.; BURCKLEN, L.; ADLER J. Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. **Diabetologia**. v. 30, n. 8, p. 653-658, 1987 Aug.

YAMAKAWA, I.; KOJIMA, H.; TERASHIMA, T.; KATAGI, M.; OI, J.; URABE, H.; SANADA, M.; KAWAI, H.; CHAN, L.; YASUDA, H.; MAEGAWA, H.; KIMURA, H. Inactivation of TNF- α ameliorates diabetic neuropathy in mice. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**. v. 301, n. 5, p. 844-852, 2011 Nov.

YANARDAG, R.; OZSOY-SACAN, O.; BOLKENT, S.; ORAK, H.; KARABULUT-BULAN, O. Protective effects of metformin treatment on the liver injury of streptozotocin-diabetic rats. **Human & Experimental Toxicology**. v. 24, n. 3, p. 129-135, 2005 Mar.

YAROV-YAROVOY, V.; BAKER, D.; CATTERALL, W. A. Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America**. v. 103, n. 19, p. 7292-7297, 2006 May.

YAROV-YAROVOY, V.; DECAEN, P. G.; WESTENBROEK, R. E.; PAN, C. Y.; SCHEUER, T.; BAKER, D.; CATTERALL, W. A. Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America**. v. 109, n. 2, p. 93-102, 2012 Jan.

YERNENI, K. K.; BAI, W.; KHAN, B. V.; MEDFORD, R. M.; NATARAJAN, R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. **Diabetes**. v. 48, n. 4, p. 855-864, 1999 Apr.

YOSHIDA, S.; MATSUDA, Y. Studies on sensory neurons of the mouse with intracellular-recording and horseradish peroxidase-injection techniques. **Journal of Neurophysiology**. v. 42, n. 4, p. 1134-1145, 1979 Jul.

YOUNG, M. J.; BOULTON, A. J.; MACLEOD, A. F.; WILLIAMS, D. R.; SONKSEN, P. H. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. **Diabetologia**. v. 36, n. 2, p. 150-154, 1993 Feb.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. Overview of the voltage-gated sodium channel family. **Genome Biology**. v. 4, n. 3, p. 207, 2003 Feb.

ZHANG, J. L.; YANG, J. P.; ZHANG, J. R.; LI, R. Q.; WANG, J.; JAN, J. J.; ZHUANG, Q. Gabapentin reduces allodynia and hyperalgesia in painful diabetic neuropathy rats by decreasing expression level of Nav1.7 and p-ERK1/2 in DRG neurons. **Brain Research**. v. 1493, p. 13-18, 2013 Feb.

ZHANG, Y.; SHAFFER, A.; PORTANOVA, J.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P. C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**. v. 283, n. 3, p. 1069-1075, 1997 Dec

ZIEGLER, D.; RATHMANN, W.; DICKHAUS, T.; MEISINGER, C.; MIELCK, A.; KORA STUDY GROUP. Neuropathic pain in diabetes, prediabetes and normal glucose tolerance: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. **Pain Medicine**. v. 10, n. 2, p. 393-400, 2009 Mar.

ZOCHODNE, D. W.; RAMJI, N.; TOTH, C. Neuronal targeting in diabetes mellitus: a story of sensory neurons and motor neurons. **The Neuroscientist**. v. 14, n. 4, p. 311-318, 2008 Aug.